

## **ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA VACCIN TÁI TỔ HỢP ĐỘC TỐ PMT PHÒNG BỆNH TỤ HUYẾT TRÙNG DO VI KHUẨN *PASTEURELLA MULTOCIDA* GÂY RA Ở LỢN**

*Vũ Khắc Hùng, Trịnh Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Thu Thủy,  
Nguyễn Thị Thu Giang, Nguyễn Xuân Trường, Nguyễn Thị Thịnh*  
Bộ môn Công nghệ sinh học, Phân viện Thú y miền Trung

### **TÓM TẮT**

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng sinh đáp ứng miễn dịch ở lợn khi được tiêm vaccin tái tổ hợp phòng bệnh tụ huyết trùng R-PasVAC dựa trên kháng nguyên của độc tố PMT, Tox1 và tPMT-C780. Kháng nguyên Tox1 và tPMT-C780 sau khi tinh sạch từ vi khuẩn *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp được phối trộn với chất bổ trợ nhũ dầu Montanide ISA 201 để đạt nồng độ cuối cùng của mỗi kháng nguyên trong vaccin thành phẩm là 250µg/ml và chất bổ trợ chiếm 50% thể tích. Kết quả đánh giá hiệu lực của vaccin cho thấy vaccin có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch thể kháng độc tố PMT mạnh và bảo hộ cao ở lợn trước vi khuẩn *P. multocida* sản sinh độc tố PMT. Liều miễn dịch tối ưu của vaccin là 0,1ml, tiêm dưới da cho 1 con chuột, liều tiêm này được tiêm nhắc lại sau 14 ngày đã cho tỷ lệ bảo hộ là 100%, và liều vaccin 1ml, tiêm bắp cho 1 con lợn 3-4 tuần tuổi (không cần tiêm nhắc lại) đã cho tỷ lệ bảo hộ là 90%. Đây là những kết quả nghiên cứu ban đầu để làm cơ sở cho việc tiếp tục phát triển sản xuất vaccin tái tổ hợp phòng bệnh tụ huyết trùng ở lợn dựa trên hai kháng nguyên Tox1 và tPMT-C780 từ độc tố PMT của chủng vi khuẩn *Pasteurella multocida* phân lập tại Việt Nam.

*Từ khóa:* Tox1, tPMT-C780, PMT, *Pasteurella multocida*, R-PasVAC.

### **Immune response stimulated by recombinant PMT vaccine against Pasteurellosis caused by *Pasteurella multocida* in pig**

*Vu Khắc Hùng, Trịnh Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Thu Thủy,  
Nguyễn Thị Thu Giang, Nguyễn Xuân Trường, Nguyễn Thị Thịnh*

### **SUMMARY**

In this study, we assessed the ability in creating immune response in pig, stimulated by R-PasVAC vaccine against Pasteurellosis from PMT based antigens, including Tox1 and tPMT-C780. The purified antigens were mixed with Montanide ISA 201 adjuvant to make the vaccine in which the final concentration of each antigen was 250µg/ml and the adjuvant concentration was 50% v/v. The results of vaccine efficacy assessment showed that the vaccine strongly stimulated the specific humoral immune response against PMT demonecrotic toxin and protected well mice and pigs against *P. multocida* bacteria. The optimized doses of vaccine that were determined to be 0.1ml per mouse by subcutaneous route, twice at 2 week interval, and 1ml per 3-4 week old pig by intramuscular route without a booster dose, exhibited high protection efficacy up to 100% on mice and 90% on pigs. These studied results are very important for further developing R-PasVAC vaccine against Pasteurellosis in pigs based on PMT antigens of *Pasteurella multocida* strain isolated in Vietnam.

*Keywords:* Tox1, tPMT-C780, PMT, *Pasteurella multocida*, R-PasVAC.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Một trong những bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng đối với ngành chăn nuôi lợn là bệnh tụ huyết trùng do vi khuẩn *Pasteurella multocida* gây ra. Ở Việt Nam, trong những năm 1970, bệnh có xu hướng xảy ra cục bộ ở các tỉnh phía Nam, vì theo số liệu thống kê, 80% ổ dịch và 84% gia súc thiệt hại do bệnh tụ huyết trùng thuộc về các tỉnh phía Nam. Đến năm 1990, phân bố địa lý của bệnh có xu hướng tăng dần ở các tỉnh phía Bắc, số địa phương có dịch tụ huyết trùng cũng tăng lên nhiều, hàng năm có tới 20 - 25 tỉnh thông báo có bệnh lưu hành. Trong các năm từ 1996-1998, trên cả nước đã xảy ra 620 ổ dịch tụ huyết trùng với 145.337 lợn mắc bệnh (Rorbertson, 1999). Những năm gần đây, nhờ áp dụng tốt công tác phòng bệnh cũng như sử dụng vaccin phòng bệnh hiệu quả, mặc dù không bùng phát thành dịch lớn, song hàng năm các ổ dịch tụ huyết trùng vẫn xảy ra và để lại hậu quả không nhỏ cho ngành chăn nuôi.

Hiện nay, có nhiều loại vaccin phòng tụ huyết trùng lợn do nước ngoài hoặc trong nước sản xuất, được lưu hành rộng rãi trên thị trường. Các vaccin này đều là vaccin vô hoạt có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tốt trên lợn, tuy nhiên lại có một số hạn chế là khả năng gây đáp ứng miễn dịch chậm, thời gian bảo hộ ngắn, do đó hiệu quả phòng bệnh của vaccin bị hạn chế (Qureshi và Saxena, 2014). Nhờ sự tiến bộ của các kỹ thuật sinh học phân tử và công nghệ gen, các loại vaccin thế hệ mới đã ra đời, trong đó nhiều triển vọng nhất là vaccin protein tái tổ hợp. Ưu điểm của vaccin này là an toàn hơn vaccin vô hoạt hay vaccin sống nhược độc do các thành phần gây ra phản ứng có hại đã được loại bỏ (Jorge và Dellagostin, 2017).

Hiện nay, có nhiều nhóm nghiên cứu đang nỗ lực tìm kiếm các kháng nguyên có khả năng gây đáp ứng bảo vệ mạnh chống lại vi khuẩn *Pasteurella multocida* để sản xuất vaccin tái tổ hợp phòng bệnh tụ huyết trùng trên động vật nuôi (Liao và cs, 2006). Trong hai nghiên cứu trước, chúng tôi đã tiến hành biểu hiện và tinh sạch thành công hai đoạn protein đầu N (aa1-

485; Tox1) (Vũ-Khắc và cs, 2019b), và protein đầu C (aa506-1285, tPMT-C780) (Vũ-Khắc và cs, 2019a) của độc tố PMT. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành sản xuất thử nghiệm vaccin phòng bệnh tụ huyết trùng dựa trên kháng nguyên Tox1 và tPMT-C780 với chất bổ trợ là nhũ dầu Montanide ISA 201. Hiệu lực của vaccin đã được xác định trên chuột nhắt trắng, trên lợn ở quy mô phòng thí nghiệm.

## II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

#### *Chủng vi sinh vật*

*E.coli* BL21/pET32b/Tox1: Chủng vi khuẩn biểu hiện protein đầu N (Tox1) của độc tố PMT, aa1-aa485, đã được tạo dòng trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Vũ-Khắc và cs, 2019b).

*E.coli* BL21/pRSETA/tPMT-C780: Chủng vi khuẩn biểu hiện protein đầu C (tPMT-C780) của độc tố PMT, aa506-aa1285; đã được tạo dòng trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Vũ-Khắc và cs, 2019a).

Chủng vi khuẩn *Pasteurella multocida* PMT-8 cường độc, sản sinh độc tố PMT được phân lập từ lợn mắc bệnh tụ huyết trùng ở Việt Nam. Chủng vi khuẩn này đang được lưu giữ tại Phân viện Thú y miền Trung.

#### *Động vật thí nghiệm*

Chuột nhắt trắng, trọng lượng trung bình 20g, âm tính với kháng thể kháng PMT, được cung cấp bởi Viện vaccin và sinh phẩm y tế, Nha Trang, Khánh Hòa.

Lợn con sau cai sữa 3-4 tuần tuổi (7-10kg), âm tính với kháng thể kháng PMT.

Bộ kit xác định hiệu giá kháng thể đặc hiệu với độc tố PMT (Accessorry Reagents for PMT Serology EN K003811-9, Oxoid Ltd, Wade Road, Hamsphire, UK).

### 2.2. Chế tạo thử nghiệm vaccin

#### *Chuẩn bị kháng nguyên*

Kháng nguyên Tox1 và tPMT-C780 được tinh sạch từ sinh khối của 2 chủng vi khuẩn tái tổ hợp *E. coli* BL21/pET32b/Tox1 và *E. coli* BL21/pRSETA/tPMT-C780 đã được lên men, cảm ứng biểu hiện protein theo như mô tả ở hai nghiên cứu trước (Vũ-Khắc và cs, 2019a; Vũ-Khắc và cs, 2019b). Dịch protein tinh sạch sau đó được thẩm tích lần lượt trong các dung dịch urea có nồng độ giảm dần từ 3M - 0M để loại bỏ urea.

#### **Xác định nồng độ kháng nguyên**

Nồng độ kháng nguyên Tox1 và tPMT-C780 được xác định bằng bộ kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific) sử dụng chất chuẩn BSA 2mg/ml.

#### **Phối trộn vaccin**

Dung dịch kháng nguyên Tox1 và tPMT-C780 được pha loãng đạt nồng độ 1mg/ml để phối trộn với chất bổ trợ nhũ dầu Montanide ISA 201 (SEPPIC, France) theo tỷ lệ Tox1: tPMT-C780: Montanide ISA 201 = 1: 1: 2 để vaccin thành phẩm có nồng độ cuối cùng của mỗi kháng nguyên là 250µg/ml và chất bổ trợ nhũ dầu Montanide ISA 201 chiếm 50% thể tích. Trộn đều hỗn hợp bằng máy trộn ULTRA-TURRAX® T25 basic IKA®-WERKE với tốc độ 24.000 vòng/phút trong 10 phút để tạo thành dung dịch đồng nhất. Kiểm tra vô trùng, phân liều và ra chai 20ml, đóng nút, nắp và bảo quản ở 2-8°C.

#### **2.3. Kiểm tra vô trùng và an toàn của vaccin R-PasVAC**

Vaccin được kiểm tra vô trùng theo tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8684:2011 “Vaccin và chế phẩm sinh học dùng trong thú y - Phép thử thuần khiết”.

Vaccin được kiểm tra an toàn trên chuột và lợn với liều gấp đôi liều gây miễn dịch. Lợn và chuột sau đó được theo dõi trong thời gian 14 ngày. Lô vaccin được coi là đạt nếu tất cả chuột và lợn tiêm an toàn sống khỏe mạnh, không có phản ứng cục bộ nơi tiêm.

#### **2.4. Xác định hiệu giá kháng thể PMT bằng phản ứng ELISA**

Hiệu giá kháng thể đặc hiệu kháng PMT được xác định dựa trên lượng kháng nguyên còn lại sau khi các mẫu huyết thanh được ủ với một lượng kháng nguyên PMT như nhau. Mẫu huyết thanh chứa hiệu giá kháng thể PMT càng nhiều thì lượng kháng nguyên dư sau khi ủ càng ít, và khi tiến hành xác định bằng phản ứng ELISA, giá trị OD<sub>450nm</sub> thu được sẽ càng thấp. Phản ứng được tiến hành với bộ kit Accessorry Reagents for PMT Serology EN K003811-9 (Oxoid Ltd, Wade Road, Hamsphire, UK), các bước thực hiện được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Hiệu giá kháng thể (T) sẽ được tính theo công thức:

$$\ln T = \left( \frac{OD_{high} - OD_{cut\ off}}{OD_{high} - OD_{low}} \times \ln \frac{F_{low}}{F_{high}} \right) + \ln F_{high}$$

Trong đó:

ln là logarithm của cơ số tự nhiên (e)

$OD_{cut\ off} = 0,5 \times OD_{đôi\ chứng\ âm}$

$OD_{high}$  là giá trị OD cao hơn  $OD_{cut\ off}$

$OD_{low}$  là giá trị OD thấp hơn  $OD_{cut\ off}$

$F_{low}$  là độ pha loãng cho giá trị  $OD_{low}$

$F_{high}$  là độ pha loãng cho giá trị  $OD_{high}$ .

#### **2.5. Phương pháp công cường độc trên chuột nhắt trắng**

Chuột nhắt trắng đã được gây miễn dịch với vaccin R-PasVAC và chuột đối chứng được thử thách công cường độc bằng chủng vi khuẩn *P. multocida* PMT-8 với liều 13500 CFU/0,1ml/con, tiêm vào xoang phúc mạc. Theo dõi chuột trong vòng 14 ngày.

#### **2.6. Phương pháp công cường độc trên lợn**

Lợn đã được gây miễn dịch với vaccin R-PasVAC và lợn đối chứng được công cường độc bằng chủng *P. multocida* PMT-8 với liều

$5 \times 10^7$  CFU/1ml/con, tiêm vào xoang phúc mạc. Theo dõi lợn trong vòng 14 ngày.

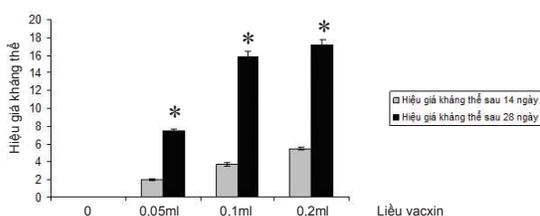
### 2.7. Xử lý số liệu

Tất cả các kết quả định lượng trong nghiên cứu này là đại diện cho ít nhất 3 lần lặp lại thí nghiệm. Hàm ANOVA được sử dụng để xác định sai số ngẫu nhiên của mỗi thí nghiệm. Hai kết quả được xác định là sai khác có ý nghĩa thống kê khi giá trị  $P < 0,05$ .

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Xác định liều của vaccin trên chuột nhắt trắng

Chuột nhắt trắng được chia thành 4 nhóm (10 con/nhóm). Nhóm 1, 2, 3 được tiêm vaccin R-PasVAC với liều tương ứng 0,05; 0,1; 0,2 ml/con/dưới da (tương đương với 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g và 100  $\mu$ g hỗn hợp protein tái tổ hợp/con). Nhóm 4 làm đối chứng. Sau 14 ngày, chuột ở mỗi nhóm được lấy máu để kiểm tra hiệu giá kháng thể. Ngày thứ 15, chuột ở nhóm 1, 2, 3 được tiêm nhắc lại với liều tiêm tương tự như lần 1. Ở ngày thứ 28, chuột tiếp tục được lấy máu, thu huyết thanh để xác định hiệu giá kháng thể. Kết quả xác định hiệu giá kháng thể ở các nhóm chuột là cơ sở để chúng tôi xác định liều tiêm tối ưu trên chuột nhắt trắng.



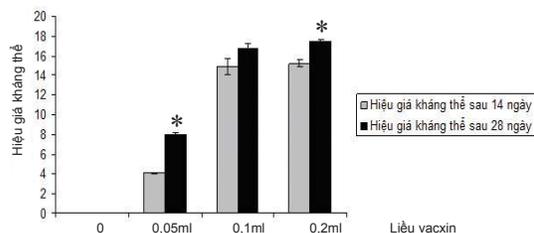
**Hình 1. Hiệu giá kháng thể kháng PMT ở chuột nhắt trắng khi gây miễn dịch với các liều khác nhau của vaccin R-PasVAC**  
Kết quả trên thể hiện sai số ( $\pm$ SD) của hai lần lặp lại thí nghiệm. \*:  $P < 0,05$ ; sai khác có ý nghĩa thống kê so với hiệu giá kháng thể sau 14 ngày.

Kết quả thể hiện ở hình 1 cho thấy, vaccin tái tổ hợp đã tạo được đáp ứng miễn dịch kháng

độc tố PMT mạnh, tỷ lệ thuận với liều tiêm của vaccin. Hiệu giá kháng thể kháng PMT sau khi được tiêm nhắc lại (ngày 28) thể hiện sự khác biệt rõ rệt so với thời điểm ngày 14, sau mũi tiêm thứ nhất. Với liều tiêm 0,1ml/con/dưới da sau mũi tiêm đầu tiên, hiệu giá kháng thể trên chuột đạt 3,754 đơn vị. Sau khi tiêm nhắc lại, hiệu giá kháng thể tăng lên 15,828 đơn vị. Đối với liều 0,2ml/con/dưới da, hiệu giá kháng thể ở lần tiêm đầu tiên và tiêm nhắc lại tuy cao hơn so với liều 0,1ml/con/dưới da, song không có sự khác biệt lớn. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn liều tiêm vaccin tối ưu trên chuột là 0,1ml/con/dưới da, nhắc lại sau 14 ngày.

### 3.2. Xác định liều vaccin trên lợn

Lợn con 3-4 tuần tuổi được chia thành 4 nhóm (5 con/nhóm). Nhóm 1, 2, 3 được tiêm vaccin R-PasVAC với liều tương ứng 0,5; 1; 2 ml/con, (tương đương với 250  $\mu$ g, 500  $\mu$ g, và 1000  $\mu$ g hỗn hợp protein tái tổ hợp/con), tiêm bắp. Nhóm 4 làm đối chứng. Ngày thứ 14, lợn được lấy máu để xác định hiệu giá kháng thể kháng PMT, đồng thời được tiêm nhắc lại với liều tiêm tương tự như lần 1. Ngày thứ 28, lợn được tiếp tục lấy máu để kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng PMT.



**Hình 2. Hiệu giá kháng thể kháng PMT ở lợn khi gây miễn dịch với các liều khác nhau của vaccin R-PasVAC**  
Kết quả trên thể hiện sai số ( $\pm$ SD) của hai lần lặp lại thí nghiệm. \*:  $P < 0,05$ ; sai khác có ý nghĩa thống kê so với hiệu giá kháng thể sau 14 ngày.

Kết quả ở hình 2 cho thấy cả 3 liều vaccin 0,5ml; 1ml; và 2ml đều có khả năng kích thích

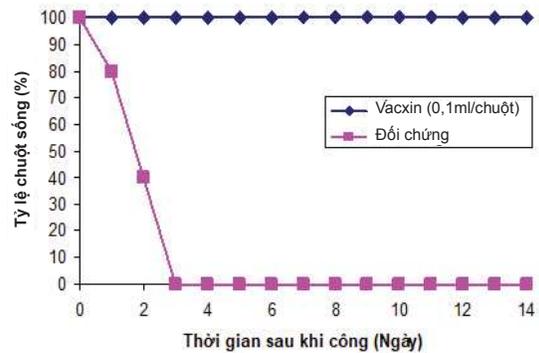
đáp ứng miễn dịch thể dịch kháng PMT mạnh mẽ ở lợn. Tuy nhiên, không giống như ở trên chuột nhắt trắng, hiệu giá kháng thể kháng PMT ở lợn trước và sau khi tiêm nhắc lại không có sự khác biệt lớn. Liều tiêm vaccin 1 ml và 2 ml/con đều cho hiệu giá kháng thể kháng PMT cao ( $\geq 14,859$ ) ngay ở lần tiêm thứ nhất. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn liều tiêm ở lợn là 1 ml/lợn/tiêm bắp, không cần tiêm nhắc lại.

Tác nhân chính gây nên các triệu chứng bệnh lý ở lợn trong quá trình lây nhiễm vi khuẩn *P. multocida* là độc tố chịu nhiệt PMT. Độc tố PMT được mã hóa bởi gen *toxA* (3858bp), gồm 1285 axit amin (~146 kDa), thuộc nhóm độc tố A-B, tác động lên các tế bào vật chủ thông qua cơ chế làm biến đổi cấu trúc và chức năng protein G của tế bào (Busch và cs, 2001). Bản thân PMT là một protein có tính kháng nguyên yếu (van Diemen và cs, 1994), thậm chí nó còn ức chế miễn dịch thể dịch và giảm khả năng sinh kháng thể khi được tiêm thử nghiệm trên chuột và lợn (Mullan và Lax, 1996). Ngược lại, khi cấu trúc nguyên thủy của PMT bị phá vỡ, tính kháng nguyên của nó lại tăng lên mạnh mẽ (van Diemen và cs, 1994), các mảnh protein được tách ra từ độc tố này lại là những phân tử có tính kháng nguyên cao (Liao và cs, 2006). Tương tự như các nghiên cứu trước đây, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy hai mảnh kháng nguyên Tox1 và tPMT-C780 của độc tố PMT đã kích thích đáp ứng miễn dịch thể dịch kháng độc tố PMT mạnh mẽ ở trên chuột nhắt trắng và trên lợn. Kết quả này một lần nữa khẳng định các mảnh kháng nguyên từ độc tố PMT thực sự là những ứng viên triển vọng để phát triển vaccin tái tổ hợp phòng bệnh tụ huyết trùng ở lợn.

### 3.3. Đánh giá hiệu lực của vaccin trên chuột nhắt trắng

Chuột nhắt trắng được chia làm 2 nhóm (10 con/nhóm). Nhóm 1 được tiêm vaccin R-PasVAC với liều 0,1ml/con, dưới da. Nhóm 2 làm đối chứng. Sau 14 ngày, chuột được tiêm nhắc lại với liều tương tự. Ngày thứ 28, chuột được công cường độc với chủng *P. multocida*

PMT-8 với liều 13500 CFU/chuột, tiêm phúc mạc. Tỷ lệ chuột sống ở 2 nhóm được theo dõi trong vòng 14 ngày.



**Hình 3. Kết quả theo dõi chuột nhắt trắng đã được gây miễn dịch với vaccin R-PasVAC và chuột đối chứng sau khi công cường độc với chủng *P. multocida* PMT-8 (13500 CFU/chuột)**

Kết quả theo dõi tỷ lệ chuột sống ở 2 nhóm sau khi công cường độc, chuột ở nhóm đối chứng bắt đầu chết sau khi công 1 ngày. Sau 3 ngày, chuột ở nhóm đối chứng đã chết hết. Trong khi đó, chuột ở nhóm tiêm vaccin hoàn toàn khỏe mạnh, và sau 14 ngày theo dõi, 100% chuột tiêm vaccin đều sống sót và khỏe mạnh (hình 3). Kết quả này cho thấy, chuột nhắt trắng khi được gây miễn dịch với vaccin R-PasVAC với liều là 0,1ml/chuột/dưới da, tiêm nhắc lại sau 14 ngày, được bảo hộ 100% khi công cường độc với chủng *P. multocida* PMT-8.

Nhiều nhóm tác giả đã nghiên cứu sử dụng các kháng nguyên từ độc tố PMT để sản xuất vaccin phòng bệnh tụ huyết trùng trên lợn. Các nghiên cứu này cho thấy rằng, hầu hết các trình tự kháng nguyên của độc tố PMT đều có khả năng gây đáp ứng miễn dịch trên lợn, song chỉ có trình tự protein đầu C (aa505-1285) có khả năng bảo hộ chống lại vi khuẩn *P. multocida* mang gen mã hóa độc tố PMT (Lee và Woo, 2010; Seo và cs, 2009). Vì vậy, hầu hết các nghiên cứu này chỉ sử dụng trình tự protein đầu C để nghiên cứu sản xuất vaccin. Trong nghiên cứu này, chúng

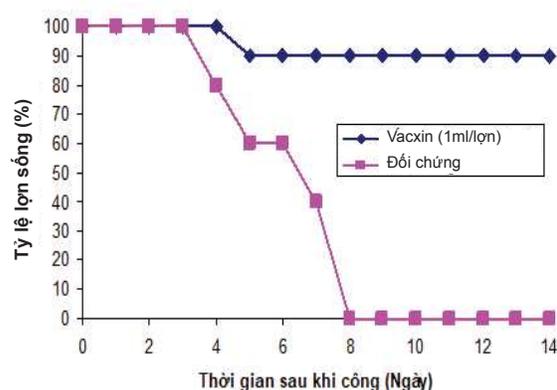
tôi thấy rằng việc kết hợp cả 2 kháng nguyên, trình tự protein đầu N (Tox1) và trình tự protein đầu C (tPMT-C780) giúp tăng cường khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch cũng như khả năng bảo hộ của vaccin trên động vật so với chỉ sử dụng kháng nguyên tPMT-C780. Năm 2012, Lee và cs. đã nghiên cứu vaccin tái tổ hợp bằng cách sử dụng protein đầu C với liều 50 µg kết hợp với chất bổ trợ Freund tiêm miễn dịch cho chuột nhắt trắng và so sánh hiệu lực với vaccin vô hoạt và vaccin độc tố PMT. Kết quả cho thấy, bằng phản ứng trung hòa, hiệu giá kháng thể kháng độc tố PMT của chuột được tiêm vaccin tái tổ hợp đạt 1:240, trong khi đó hiệu giá kháng thể của chuột được tiêm vaccin vô hoạt chỉ đạt 1:40 và vaccin độc tố PMT chỉ đạt 1:120. Mặt khác, kết quả công cường độc cho thấy tỷ lệ bảo hộ của vaccin tái tổ hợp trên chuột đạt 90%, trong khi đó tỷ lệ bảo hộ của vaccin vô hoạt và vaccin độc tố lần lượt là 50% và 70%. Trong nghiên cứu của chúng tôi với liều 50 µg, hiệu giá kháng thể đạt 15,827 đơn vị khi sử dụng bộ kit thương mại. Mặt khác, khi công cường độc, tỷ lệ bảo hộ trên chuột đạt 100%, cao hơn so với nghiên cứu của Lee và cs (2012). Nguyên nhân có thể là chúng tôi kết hợp cả 2 kháng nguyên để sản xuất vaccin nên khả năng gây đáp ứng miễn dịch tốt hơn so với khi chỉ sử dụng một mình kháng nguyên là trình tự đầu C của độc tố PMT như trong các nghiên cứu trước đây.

### 3.4. Đánh giá hiệu lực của vaccin trên lợn

Lợn con 3-4 tuần tuổi được chia làm 2 nhóm. Nhóm 1 gồm 10 con được tiêm bắp vaccin R-PasVAC với liều 1ml/con. Nhóm 2 gồm 5 con làm đối chứng. Sau 14 ngày, lợn được công thử thách với chủng *P. multocida* PMT-8 với liều  $5 \times 10^7$  CFU/lợn theo đường tiêm phúc mạc. Lợn được theo dõi trong vòng 14 ngày sau khi công.

Lợn ở nhóm đối chứng sau khi công cường độc với chủng *P. multocida* PMT-8 có các triệu chứng mệt mỏi, tiêu ra máu, sốt nhẹ, chậm chạp, bỏ ăn. Kết quả thể hiện ở hình 4 cho thấy, lợn đối chứng bắt đầu chết từ ngày thứ 4 sau khi công cường độc. Ở các ngày tiếp theo, lợn chết rải rác. Sau 7 ngày, lợn ở nhóm đối chứng đã chết

hết. Trong khi đó, nhóm lợn được tiêm vaccin, 9 con vẫn rất linh hoạt, ăn tốt và không biểu hiện bất kỳ dấu hiệu bệnh lý nào, 1 con có biểu hiện sốt nhẹ, bỏ ăn. Sau 14 ngày theo dõi, nhóm lợn 9 con được tiêm vaccin vẫn hoàn toàn khỏe mạnh, một con bị ốm có dấu hiệu bình phục. Như vậy, lợn được gây miễn dịch với vaccin R-PasVAC với liều 1ml/lợn, tiêm bắp được bảo hộ 90% khi công với chủng *P. multocida* PMT-8.



**Hình 4. Kết quả theo dõi lợn tiêm vaccin R-PasVAC và lợn đối chứng sau khi công cường độc với chủng *P. multocida* PMT-8 ( $5 \times 10^7$  CFU/lợn)**

Năm 2006, Liao và cs đã thử nghiệm vaccin tái tổ hợp với protein đầu N (Tox1) với liều 2 mg kết hợp với gel hydroxyt nhôm cho lợn nái nhằm tạo miễn dịch chủ động truyền cho lợn con và so sánh với vaccin độc tố PMT. Lợn nái được tiêm vaccin sau đó kiểm tra kháng thể kháng độc tố PMT ở sữa đầu và ở lợn con 1 ngày tuổi (bằng phản ứng trung hòa kháng thể kháng độc tố PMT) sau đó dùng độc tố PMT công cường độc cho lợn con bằng 5 liều gây chết ( $200 \mu\text{g}/1\text{kg}$ ) ở lợn con 2 tuần tuổi và theo dõi đến tuần thứ 4. Kết quả cho thấy, hiệu giá kháng thể kháng PMT trong sữa đầu và huyết thanh của lợn con một ngày tuổi của nhóm tiêm vaccin tái tổ hợp đạt lần lượt là 1:80 và 1:79, trong khi đó nhóm lợn được tiêm vaccin độc tố PMT hiệu giá chỉ đạt 1:39 ở sữa đầu và 1:8 ở lợn con 1 ngày tuổi. Kết quả công cường độc bằng độc tố PMT cho thấy, tỷ lệ bảo hộ

của nhóm lợn con sinh ra từ lợn mẹ được tiêm vaccin tái tổ hợp là 60% trong khi đó nhóm lợn con sinh ra từ lợn mẹ được tiêm vaccin độc tố, tỷ lệ bảo hộ là 0%. Nhóm tác giả này nhận thấy rằng ở nhóm lợn con sinh ra từ lợn nái được tiêm vaccin tái tổ hợp thì đáp ứng miễn dịch tế bào cao hơn hẳn so với nhóm lợn con sinh ra từ lợn nái được tiêm vaccin độc tố. Trong một thí nghiệm khác, Lee và cs (2012) cũng tạo vaccin tái tổ hợp bằng protein đầu C (của độc tố PMT) kết hợp với gel hydroxyt nhôm tiêm miễn dịch 2 lần cho lợn nái ở tuần thứ 5 và thứ 2 trước khi sinh (15 mg protein tái tổ hợp/liều) để tạo kháng thể chủ động truyền cho lợn con, đồng thời cũng so sánh với vaccin vô hoạt và vaccin độc tố PMT. Lợn con sinh ra từ lợn nái miễn dịch được lấy máu ở tuần thứ 1, 3, 5, 8 và 12 sau khi sinh để kiểm tra kháng thể kháng độc tố PMT bằng phản ứng ELISA gián tiếp. Kết quả cho thấy, lợn con sinh ra từ nhóm lợn nái được tiêm vaccin tái tổ hợp có kháng thể kháng độc tố PMT cao hơn hẳn so với nhóm được tiêm vaccin vô hoạt và vaccin độc tố. Tương tự như kết quả của Liao và cs. (2006), Lee và cs. (2012) cũng nhận thấy, ở nhóm lợn con sinh ra từ lợn nái được tiêm vaccin tái tổ hợp có đáp ứng miễn dịch tế bào cao hơn hẳn so với nhóm lợn con sinh ra từ lợn nái được tiêm vaccin vô hoạt và vaccin độc tố. Trong nghiên cứu này, sau khi gây miễn dịch, chúng tôi kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng độc tố PMT bằng bộ kit thương mại, kết quả cho thấy lợn được tiêm vaccin tái tổ hợp có hiệu giá kháng thể rất cao, đạt 14,859 đơn vị khi được gây miễn dịch với chỉ 1 liều vaccin tương đương 500 $\mu$ g protein tái tổ hợp, không cần tiêm nhắc lại. Mặt khác, khi công cường độc với liều 5x10<sup>7</sup> CFU, tỷ lệ bảo hộ đạt 90%, có thể do chúng tôi kết hợp cả 2 protein đoạn đầu và đoạn cuối nên khả năng đáp ứng miễn dịch tế bào và thể dịch cao hơn so với nhóm tác giả Liao và cs. (2009), Lee và cs. (2012).

Cho đến nay, nhôm hydroxit vẫn là một chất bổ trợ vaccin đã được sử dụng rộng rãi trong thú y và đã chứng minh được hiệu quả của chúng (Li và cs, 2014). Nhũ dầu Montanide là chất bổ trợ mới, song nó đang thực sự thu hút các nhà nghiên cứu vì những ưu điểm nổi bật như khả năng kích thích cả đáp ứng miễn dịch thể dịch và miễn dịch tế bào (Bergado và cs, 2018), qua đó giúp tạo được trí nhớ miễn dịch lâu dài (Ibrahim và cs, 2015) do khả năng bảo hộ của các kháng nguyên độc tố PMT đã được chứng minh là bị chi phối bởi cả đáp ứng miễn dịch thể dịch và đáp ứng miễn dịch tế bào (Liao và cs, 2006). Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng chất bổ trợ nhũ dầu Montanide ISA 201 với mong muốn là tăng cường khả năng bảo hộ của vaccin cũng như để kéo dài trí nhớ miễn dịch tạo được. Kết quả cho thấy, vaccin R-PasVAC cho kết quả bảo hộ rất tốt, 100% khi thử nghiệm trên chuột nhất trắng và 90% trên lợn ở quy mô phòng thí nghiệm. Đây là những kết quả đáng mong đợi mà chúng tôi cho rằng là kết quả của việc áp dụng một công thức thông minh để tạo nên vaccin, đó là kết hợp nhiều kháng nguyên khác nhau với một chất bổ trợ phù hợp.

#### IV. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã sản xuất thành công vaccin tái tổ hợp phòng bệnh tụ huyết trùng lợn R-PasVAC dựa trên 2 kháng nguyên của độc tố PMT, Tox1 và tPMT-C780. Vaccin có nồng độ kháng nguyên là 250 $\mu$ g Tox1 + 250 $\mu$ g tPMT-C780/ml và 50% thể tích nhũ dầu Montanide ISA 201. Liều tiêm tối ưu của vaccin, 0,1ml/chuột/dưới da, tiêm nhắc lại sau 14 ngày, tỷ lệ bảo hộ là 100%, và 1ml/lợn/tiêm bắp, không cần tiêm nhắc lại, cho hiệu quả bảo hộ 90%.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Rorbertson, B.I. 1999. Đánh giá hệ thống không chế hiện hành, Báo cáo chuyên công tác thứ nhất của chuyên gia dịch tễ học và không chế dịch bệnh (20-8 đến 10-9), *Tài liệu báo cáo dự án tăng cường công tác thú y ở Việt Nam (ALA/96/20)*.

2. Vũ-Khắc, H., T.T. Nguyễn, T.T.H. Trịnh, T.T.T. Nguyễn, và X.T. Nguyễn. 2019a. Tạo dòng, biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp tPMT-C780 của *Pasteurella multocida*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*. Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh 18.
3. Vũ-Khắc, H., T.T.H. Trịnh, T.T.A. Đỗ, T.T.T. Nguyễn, và X.T. Nguyễn. 2019b. Tạo dòng, biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp đoạn đầu protein ToxA của *Pasteurella multocida*. *Tạp chí KHKT thú y*. 26:22-29.
4. Bergado, B.G., D.R. Hernández Fernández, Z. Mazorra Herrera, and B. Sánchez Ramírez. 2018. HER1-based vaccine: Simultaneous activation of humoral and cellular immune response. *Semin Oncol*. 45:75-83.
5. Busch, C., J. Orth, N. Djouder, and K. Aktories. 2001. Biological Activity of a C-Terminal Fragment of *Pasteurella multocida* Toxin. *Infect Immun*. 69:3628-2634.
6. Ibrahim, E.E.-S., W.M. Gamal, A.I. Hassan, S.E.-D. Mahdy, A.Z. Hegazy, and M.M. Abdel-Atty. 2015. Comparative study on the immunopotentiator effect of ISA 201, ISA 61, ISA 50, ISA 206 used in trivalent foot and mouth disease vaccine. *Vet World*. 8:1189-1198.
7. Jorge, S., and O.A. Dellagostin. 2017. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnology Research and Innovation*. 1:6-13.
8. Lee, J., and H. Woo. 2010. Antigenicity of partial fragments of recombinant *Pasteurella multocida* toxin. *J Microbiol Biotechnol*. 20:1756-1763.
9. Lee, J., Kang H-E, Woo H-J. 2012. Protective Immunity Conferred by the C-Terminal Fragment of Recombinant *Pasteurella multocida* Toxin. *Clin Vaccine Immunol*. 19(9):1526-1531.
10. Li, X., A.M. Aldayel, and Z. Cui. 2014. Aluminum hydroxide nanoparticles show a stronger vaccine adjuvant activity than traditional aluminum hydroxide microparticles. *J Control Release*. 173:148-157.
11. Liao, C., C. Huang, S. Hsuan, Z. Chen, W. Lee, C. Liu, J. Winton, and M. Chien. 2006. Immunogenicity and efficacy of three recombinant subunit *Pasteurella multocida* toxin vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. *Vaccine*. 24:27-35.
12. Mullan, P., and A. Lax. 1996. *Pasteurella multocida* toxin is a mitogen for bone cells in primary culture. *Infect Immun*. 64:959-965.
13. Qureshi, S., and H.M. Saxena. 2014. Estimation of titers of antibody against *Pasteurella multocida* in cattle vaccinated with haemorrhagic septicemia alum precipitated vaccine. *Veterinary World*. 7:224-228.
14. Seo, J., H. Pyo, S. Lee, J. Lee, and T. Kim. 2009. Expression of 4 truncated fragments of *Pasteurella multocida* toxin and their immunogenicity. *Can J Vet Res*. 73:184-189.
15. van Diemen, P., G. de Vries Reilingh, and H. Parmentier. 1994. Immune responses of piglets to *Pasteurella multocida* toxin and toxoid. *Vet Immunol Immunopathol*. 41:307-321.

Ngày nhận 25-11-2019

Ngày phản biện 17-12-2019

Ngày đăng 1-3-2020