

# ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ BẤT HOẠT VIRUS LỞ MỒM LONG MÓNG CỦA BINARY ETHYLENEIMINE TRONG SẢN SUẤT VACXIN THƯƠNG MẠI

*Lê Thị Xiêm<sup>1</sup>, Cao Văn Hùng<sup>1</sup>, Lại Văn Đàm<sup>4</sup>, Ngô Thị Thu Thảo<sup>3</sup>, Phạm Hồng Trang<sup>2</sup>, Lại Thị Lan Hương<sup>2</sup>, Bùi Trần Anh Đào<sup>2</sup>, Tô Long Thành<sup>2</sup>*

## TÓM TẮT

Nhằm xác định nồng độ binary ethyleneimine (BEI) phù hợp cho sản xuất vacxin lở mồm long móng type O trên quy mô công nghiệp, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm đánh giá ảnh hưởng của nồng độ BEI đến mức độ giảm hiệu giá virus, thời gian bất hoạt hoàn toàn và tính an toàn theo thời gian bất hoạt. Kết quả thử nghiệm với 4 nồng độ BEI (0,5; 1; 1,5 và 2 mM) cho thấy mức độ giảm hiệu giá virus dao động trong khoảng 0,2 đến 0,8 lg TCID<sub>50</sub>/ml/giờ. Thời gian bất hoạt hoàn toàn giảm dần khi nồng độ BEI tăng lên tương ứng với 49 giờ ở nồng độ 0,5 mM và rút ngắn còn dưới 22 giờ ở nồng độ trên 1 mM. Đánh giá thời điểm an toàn trên tế bào BHK21, lô xử lý BEI nồng độ 0,5 mM cho kết quả an toàn sau 32 giờ bất hoạt. Thời gian đạt chỉ tiêu an toàn là 20 giờ đối với lô xử lý BEI nồng độ trên 1 mM. Đồng thời với nồng độ trên 1 mM, thời điểm an toàn được xác định là không có sự thay đổi đáng kể. Như vậy, chúng tôi khuyến cáo sử dụng BEI nồng độ 1 mM trong bất hoạt virus LMLM đối với quy mô sản xuất vacxin công nghiệp sẽ cho hiệu quả bất hoạt tối ưu.

*Từ khóa:* Lở mồm long móng, type O, binary ethyleneimine, bất hoạt, vacxin.

## Evaluation on foot and mouth virus inactivation efficacy of binary ethyleneimine (BEI) in commercial vaccine production

*Le Thi Xiem, Cao Van Hung, Lai Van Dam, Ngo Thi Thu Thao, Pham Hong Trang, Lai Thi Lan Huong, Bui Tran Anh Dao, To Long Thanh*

## SUMMARY

Titration curve, complete inactivation time and safety efficacy were assessed for defining the concentration of binary ethyleneimine (BEI) in inactivation of foot-and-mouth disease virus, type O in commercial vaccine production. The inactivation rate ranged from 0.2 to 0.8 lg TCID<sub>50</sub>/ml/hour were obtained using BEI with morality 0.5, 1, 1.5 and 2 mM. The complete inactivation time reduced corresponding to the higher concentration of BEI, it was occurred at 49 hours post inactivation using 0.5 mM BEI and shortened to less than 22 hours at concentration above 1 mM. Safety assessment on BHK21 cells revealed the compatible results. The durations to reach safety target were 32 and 20 hours after inactivation using BEI with concentration of 0.5. and 1 mM, respectively. Moreover, there were no significant different results achieved when increasing concentration of BEI. We recommend using BEI with morality 1 mM for optimal inactivation efficiency in FMD industrial vaccine production scale.

*Keywords:* Foot and mouth disease, type O, binary ethyleneimine, inactivation, vaccine.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh lở mồm long móng (LMLM) là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm của động vật móng guốc chẵn như trâu, bò, lợn, dê, cừu, hươu, nai,...(OIE,

2018). Bệnh do virus LMLM gây ra, là một RNA virus không có vỏ bọc thuộc họ *Picornaviridae*, chi *Aphthovirus*. Quan sát dưới kính hiển vi điện tử, virus LMLM có đường kính khoảng 25 nm (Bachrach, 1968). Bằng phương pháp huyết thanh học, đã xác định được 7 serotype virus LMLM bao

<sup>1</sup>. Công ty RTD

<sup>2</sup>. Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>3</sup>. Học viên cao học K28, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>4</sup>. Đại học Thú y, Đại học Quốc gia Chungbuk

gồm O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia1 và nhiều subtype khác của mỗi serotype (Bachrach, 1968; Knowles và Samuel, 2003). Tỷ lệ đột biến cao của virus LMLM cùng sự gia tăng nhanh chóng quần thể virus là do polymerase mã hoá RNA của virus thiếu cơ chế đọc sửa, đây được cho là nguyên nhân dẫn tới sự tiến hoá nhanh chóng của virus này (Haydon *et al.*, 2001; Domingo *et al.*, 2002; Domingo *et al.*, 2005). Brehm và cs. (2008) cho thấy rằng vaccin LMLM không có khả năng tạo miễn dịch chéo, do đó không có khả năng bảo hộ con vật chống lại chủng virus LMLM khác với chủng virus vaccin. Vì vậy, quá trình phát triển vaccin LMLM cần phải cân nhắc đến khả năng đột biến cao dẫn đến sự đa dạng kháng nguyên của virus LMLM (Klein, 2009).

Tại Việt Nam, dịch bệnh LMLM xảy ra thường xuyên với diễn biến phức tạp gây thiệt hại lớn về kinh tế, xã hội. Nguyễn Thu Thủy và cs. (2014) đã phân tích bộ gen của virus LMLM lưu hành tại 3 tỉnh Lạng Sơn, Nghệ An và Kontum cho thấy sự lưu hành của serotype O và A. Báo cáo thống kê sự lưu hành của virus LMLM trên đàn trâu bò tại Việt Nam từ 2016 đến 2019 của Cục Thú y cho thấy có sự lưu hành của 3 serotype O, A và Asia 1, trong đó serotype O là phổ biến nhất với 3 subtype đã được xác định là O-Cathay, O-SAE/Mya-98 và O-ME-SA/PanAsia (Công văn số 12/TY-DT ngày 3/1/2019 của Cục Thú y). Những kết quả này tạo nguồn virus dự trữ phục vụ cho công tác sản xuất vaccin.

Vấn đề hiệu quả bảo hộ của vaccin LMLM là một thách thức lớn đối với các nhà khoa học trên thế giới trong đó có Việt Nam. Vaccin tiểu phần hoặc vaccin vô khuẩn khiết của virus LMLM đã được chứng minh là kém hiệu quả hơn so với vaccin toàn phần sản xuất từ virus sống bất hoạt (Keeling *et al.*, 2003; Grubman, 2005; Paton *et al.*, 2005; Paton *et al.*, 2006; Arnold *et al.*, 2007; Brehm *et al.*, 2008; Uttenthal *et al.*, 2010). Các chất bất hoạt được sử dụng phổ biến hiện nay như ethyleneimine, N-acetyl ethyleneimine hoặc binary ethyleneimine - BEI (Bahnmann, 1974). Kamel *et al.* (2019) cho biết vaccin bất hoạt sử dụng BEI có khả năng sinh miễn dịch tương đương với vaccin bất

hoạt bằng các chất bất hoạt khác. Ngoài virus LMLM, BEI được biết đến như là một chất bất hoạt cho rất nhiều virus khác như Ross river virus (RRV) (Aaskov *et al.*, 1997), sheep pox virus (Awad *et al.*, 2003), Newcastle disease virus (Buonavoglia *et al.*, 1988).

Trong khuôn khổ chương trình sản xuất vaccin LMLM, chúng tôi tiến hành xác định ảnh hưởng của BEI đến tính kháng nguyên của virus LMLM thông qua đánh giá đường cong bất hoạt của virus ở các nồng độ BEI khác nhau, từ đó xây dựng quy trình bất hoạt virus LMLM trong sản xuất vaccin thương mại.

## II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu nồng độ hóa chất bất hoạt phù hợp với quy trình sản xuất quy mô công nghiệp.

- Nghiên cứu thời gian bất hoạt tối ưu phù hợp với quy trình sản xuất quy mô công nghiệp.

### 2.2. Nguyên liệu

- Giống virus LMLM: O/FMD/Avac-3 (ký hiệu O3)

- Hoá chất sử dụng trong nghiên cứu: 2-Bromoethylamine hydrobromide (BEA) 95%, NaOH 0,2N; Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Merck, Đức).

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Sản xuất kháng nguyên

Gây nhiễm tế bào Baby Hamster Kidney (BHK21) dạng treo bằng giống virus O3 ở điều kiện 36°C, pH=7,2 – 7,6. Sau 18 - 24 giờ, quan sát tế bào có bệnh tích (Cytopathic effect - CPE) đạt khoảng 90 - 100% thì dừng nuôi cấy và thu hoạch huyền dịch virus. Hiệu giá virus được tính bằng liều gây nhiễm 50% tế bào BHK21 (TCID<sub>50</sub>/ml) theo công thức của Kärber (1931). Những mẻ có hiệu giá virus tối thiểu 7lg TCID<sub>50</sub> (Lê Đình Quyền, 2017) được sử dụng để bất hoạt với các nồng độ BEI khác nhau.

### 2.3.2. Bất hoạt virus bằng BEI (Bahnemann, 1975)

Dung dịch BEI được chuẩn bị bằng cách thêm muối BEA vào dung dịch NaOH 0,2N đã được làm ấm trước.

Huyền dịch virus LMLM (7lg TCID<sub>50</sub>) được trộn với dung dịch BEI đảm bảo đạt các nồng độ 0,5 mM; 1 mM; 1,5 mM và 2 mM. Sau đó huyền dịch virus và BEI được khuấy đều ở nhiệt độ 37°C trong 36 giờ. Mẫu virus được thu thập sau mỗi 4 giờ, mẫu virus được trung hòa lượng BEI còn tồn dư bằng Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> và lắc đều trong 1 giờ, mẫu được giữ lạnh 4°C cho đến khi tiến hành thử nghiệm tiếp theo.

### 2.3.3. Kiểm tra hiệu giá virus theo thời gian vô hoạt

Tế bào BHK21 một lớp được chuẩn bị trên khay 96 giếng. Mẫu virus cần xác định hiệu giá được pha loãng theo cơ số 10 rồi đem gây nhiễm 50μl/giếng. Sau 1 giờ ủ, bổ sung môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM - Gibco, USA), 10% fetal bovine serum (FBS - Gibco, USA).

Theo dõi CPE 2 lần/ngày bằng kính hiển vi soi ngược (Optical, Italia). Giá trị TCID<sub>50</sub> được tính theo phương pháp Spearman-Kärber (1931).

### 2.3.4. Xét nghiệm tính vô hại

Để kiểm nghiệm kết quả vô hoạt, tiến hành lấy mẫu trước khi vô hoạt và sau mỗi 4 giờ trong quá trình vô hoạt. Mẫu virus được trung hòa và giữ lạnh 4°C trong khi chờ thử nghiệm. Mẫu virus gây nhiễm lên tế bào BHK21 một lớp và đánh giá CPE, huyền dịch virus được coi là vô hoạt hoàn toàn nếu không có khả năng gây bệnh tích tế bào trong 2 đời cấy chuyển liên tiếp.

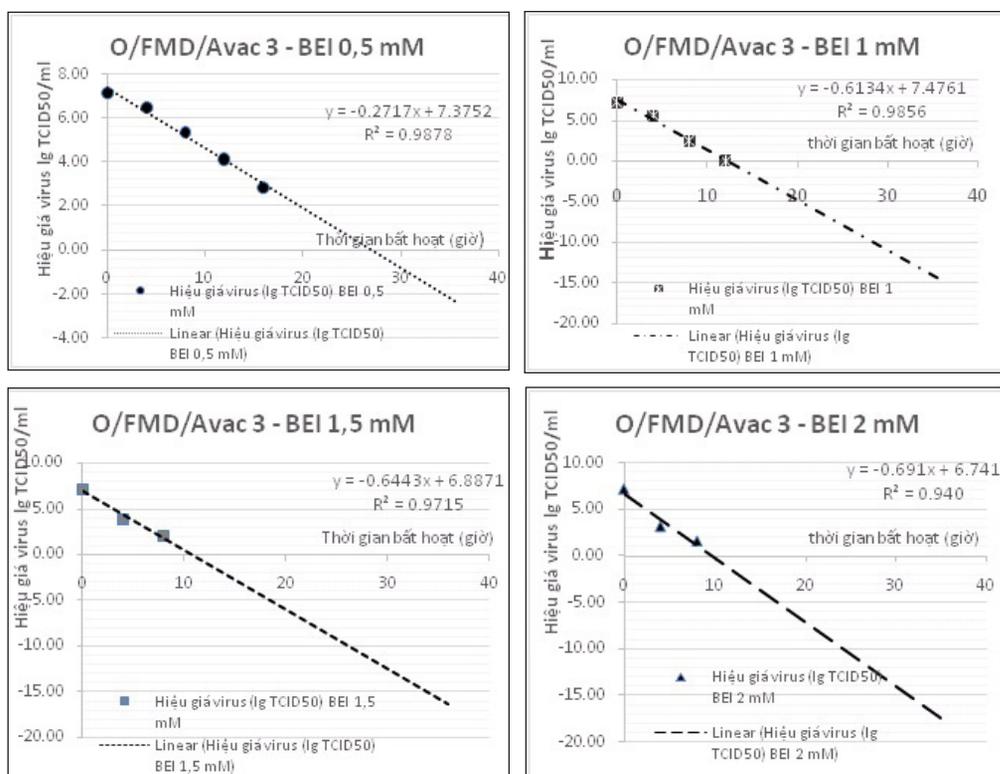
### 2.3.5. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phương pháp thống kê sinh học sử dụng phần mềm Excel.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả hiệu giá virus theo thời gian vô hoạt

Kết quả hiệu giá virus theo giờ vô hoạt với các nồng độ BEI khác nhau được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Hiệu giá virus LMLM theo thời gian vô hoạt

Kết quả đường tuyến tính cho thấy, nồng độ BEI càng cao thì mức độ giảm hiệu giá virus càng nhanh. Ở nồng độ 0,5 mM; tốc độ giảm hiệu giá virus LMLM từ 0,2lg TCID<sub>50</sub>/ml/giờ đến 0,3lg TCID<sub>50</sub>/ml/giờ; ở nồng độ 1 mM tốc độ giảm hiệu giá virus LMLM từ 0,5lg TCID<sub>50</sub>/ml/giờ đến 0,7lg TCID<sub>50</sub>/ml/giờ; ở nồng độ 1,5 mM tốc độ giảm hiệu giá virus LMLM từ 0,6lg TCID<sub>50</sub>/ml/giờ đến 0,7lg TCID<sub>50</sub>/ml/giờ; ở nồng độ 2 mM tốc độ giảm hiệu giá virus LMLM từ 0,6lg TCID<sub>50</sub>/ml/giờ đến 0,8lg TCID<sub>50</sub>/ml/giờ.

Thử nghiệm đánh giá thời gian và hiệu quả bất hoạt của BEI với virus LMLM đã được nhiều nhà khoa học thực hiện trên nhiều chủng virus LMLM lưu hành khác nhau (Barteling và Cassim, 2004; Aarathi *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2009; Soliman *et al.*, 2013; Ismail *et al.*, 2013). Barteling và Cassim (2004) cho biết trong điều kiện tối ưu, độ giảm hiệu giá khi sử dụng BEI khoảng 0,5 - 1 lg/giờ và để đảm bảo bất hoạt hoàn toàn virus thì quá trình sẽ kéo dài 40 - 48

giờ. Thử nghiệm bất hoạt virus LMLM SAT2, Aarathi và cs. (2004) thấy rằng ở hai nồng độ BEI là 0,4 và 1,6 mM; sự khác biệt của hiệu quả bất hoạt là có ý nghĩa thống kê. Đồng thời, nhóm tác giả cũng cho thấy nồng độ của BEI trên 1,6 mM không có tác dụng trong việc rút ngắn thời gian bất hoạt hoàn toàn virus. Một thí nghiệm khác được thực hiện trên chủng SAT2 (Ismail *et al.*, 2013) sử dụng BEI ở các nồng độ 0,1; 0,4; 0,8; 1,2 và 1,6 mM cho thấy độ giảm hiệu giá vào khoảng 0,53 - 1,15 lg/giờ. Như vậy, kết quả nghiên cứu về độ giảm hiệu giá khi sử dụng BEI của chúng tôi phù hợp với nhiều nghiên cứu khác đã được công bố trên thế giới.

Thời gian bất hoạt 1/2 virus giảm nhanh chóng khi tăng nồng độ BEI (bảng 1). Thời gian dự đoán hoàn thành bất hoạt khoảng 48,9 giờ với nồng độ BEI 0,5 mM. Ở nồng độ BEI cao hơn, thời gian bất hoạt dự đoán sẽ rút ngắn còn khoảng 22 đến 19 giờ.

**Bảng 1. Kết quả kiểm tra hiệu giá virus LMLM trong quá trình bất hoạt**

Chỉ tiêu kiểm tra	Nồng độ BEI (mM)			
	0,5	1,0	1,5	2,0
Thời gian bất hoạt ½ virus (giờ)	1,1	0,59	0,47	0,43
Tốc độ giảm hiệu giá (lg TCID <sub>50</sub> /ml)	-0,2717	-0,6134	-0,6443	0,6912
Thời gian bất hoạt hoàn toàn (giờ)	48,9	21,7	20,6	19,2

Thời gian bất hoạt hoàn toàn là một trong những chỉ tiêu cần được xem xét bởi nó không chỉ phản ánh hiệu quả của chất/hợp chất bất hoạt đồng thời quyết định tốc độ hoàn thành của toàn bộ quy trình (Aarathi *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2009; Ismail *et al.*, 2013). Khi sử dụng BEI ở nồng độ 0,1 mM/37°C, một số nghiên cứu cho thấy thời gian bất hoạt hoàn toàn dao động trong khoảng 15 - 16 giờ (Ali *et al.*, 2009; Soliman *et al.*, 2013; Ismail *et al.*, 2013). Ngoài ra, thời gian bất hoạt hoàn toàn khi sử dụng nồng độ 1,2 mM sẽ giảm khoảng 8 giờ so với nồng độ 0,1 mM (Aarathi *et al.*, 2004; Ismail *et al.*, 2013).

Kết quả của chúng tôi cho thấy sự tương

đồng về rút ngắn thời gian bất hoạt hoàn toàn khi nồng độ BEI tăng lên. Thời gian bất hoạt hoàn toàn của chúng tôi dài hơn so với một số kết quả đã công bố. Điều này có thể do chúng tôi sử dụng mẫu trích xuất trong quy trình sản xuất vacxin công nghiệp, vì vậy dung lượng xử lý mỗi lô lớn hơn rất nhiều so với dung lượng thí nghiệm của các nghiên cứu khác (200 - 500 lít/mẻ). Mặt khác, do quy định kiểm soát trong quá trình sản xuất, các lô vacxin thương mại phải có ít hơn 1 hạt virus trong 10.000 lít vacxin với lô sản xuất lớn trên 1000 lít (OIE, 2018; Bahnemann, 1975), chúng tôi cần thêm từ 8,9 giờ đến 22 giờ với nồng độ bất hoạt tương ứng từ 2 mM xuống 0,5 mM. Thêm vào đó, sự dao

động về thời gian bất hoạt hoàn toàn có thể khác nhau chịu ảnh hưởng bởi yếu tố nội thân của virus - serotype khác nhau có thể yêu cầu thời gian bất hoạt hoàn toàn khác nhau.

### 3.2. Xét nghiệm về tính vô hại (Innocuity)

Để đảm bảo an toàn, virus cần được bất hoạt hoàn toàn. Để có thể khẳng định lại quá trình

bất hoạt và xác định thời điểm bất hoạt hoàn toàn khi thực hiện bất hoạt bằng BEI ở các nồng độ khác nhau, chúng tôi thực hiện xét nghiệm tính vô hại (Innocuity) trên môi trường tế bào BHK21 theo quy trình đã mô tả trong phần phương pháp thí nghiệm (2.3.4), kết quả được thể hiện trong bảng 2.

**Bảng 2. Kết quả kiểm tra tính vô hại khi sử dụng BEI**

Thời gian bất hoạt (giờ)	0,5 mM			1 mM			1,5 mM			2 mM		
	lô 1	lô 2	lô 3	lô 1	lô 2	lô 3	lô 1	lô 2	lô 3	lô 1	lô 2	lô 3
0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
16	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
20	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: (-) âm tính: không có bệnh tích tế bào (CPE) khi cấy chuyển 2 lần  
(+) dương tính: có bệnh tích tế bào khi cấy chuyển 2 lần.

Đối với các nồng độ BEI khác nhau, bên cạnh các chỉ tiêu như thời gian bất hoạt hoàn toàn hoặc độ giảm hiệu giá virus theo thời gian bất hoạt thì độ an toàn là một chỉ tiêu quan trọng cần phải được đánh giá nhằm xác định được nồng độ tối ưu cho bất hoạt virus LMLM. Đối tượng thử nghiệm an toàn khác nhau tùy thuộc vào từng thiết kế thí nghiệm khác nhau như tế bào BHK21 hoặc chuột lang (Soliman *et al.*, 2013; Ismail *et al.*, 2013). Từ kết quả bảng 2 cho thấy, ở nồng độ BEI 0,5 mM, các lô kháng nguyên đạt tính vô hại sau 32 giờ bất hoạt, ở nồng độ BEI cao hơn từ 1 mM đến 2 mM, virus được bất hoạt hoàn toàn nhanh hơn. Sau 20 giờ bất hoạt, các lô kháng nguyên bất hoạt đã đạt xét nghiệm tính vô hại cho các lô sản xuất vacxin thương mại.

## IV. KẾT LUẬN

Thời gian bất hoạt hoàn toàn virus LMLM bằng BEI giảm dần khi tăng nồng độ BEI từ 0,5 mM đến 2 mM. Ở nồng độ 1mM, virus LMLM bị bất hoạt hoàn toàn sau 21,7 giờ và đạt yêu cầu tính vô hại sau 20 giờ. Kết quả này có thể được sử dụng như một hướng dẫn để kiểm soát chất lượng trong quá trình sản xuất vacxin LMLM.

**Lời cảm ơn:** Các nghiên cứu này dựa trên đề tài: “Hoàn thiện quy trình sản xuất vacxin vô hoạt nhũ dầu quy mô công nghiệp phòng bệnh lở mồm long móng typ O” do Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam tài trợ, chúng tôi xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam, công ty cổ phần và phát triển công nghệ nông thôn (RTD) và các tổ chức cá nhân tận tình giúp đỡ để hoàn thành nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aarathi, D., K.A. Rao, R. Robinson and V.A Srinivasan., 2004. Validation of binary ethyleneimine (BEI) used as an inactivant for foot and mouth disease tissue culture vaccine. *Biologicals* 32(3): 153-156.
2. Aaskov, J., Williams, L., & Yu, S., 1997. A candidate Ross River virus vaccine: preclinical evaluation. *Vaccine*, 15(12-13), 1396-1404.
3. Ali, SM., Abd El-Aty, MM., Elnakasy, SA., El-Kilany, AS., 2009. In activation of FMDV (Type A and O) by using a combination of binary ethyleneimine and formaldehyde. *3<sup>rd</sup> Sci Cong.*, Faculty of Kafr El-Shek. 962-973
4. Arnold M. E., Paton D. J., Ryan E., Cox S. J., Wilesmith J. W., 2008. Modelling studies to estimate the prevalence of foot-and-mouth disease carriers after reactive vaccination. *Proc. R. Soc. B* 275, 107–11510.1098/rspb.2007.1154
5. Awad, M., Michael, A., Soliman, S. M., Samir, S. S., & Daoud, A. M., 2003. Trials for preparation of inactivated sheep pox vaccine using binary ethyleneimine. *The Egyptian journal of immunology*, 10(2), 67-72.
6. Bachrach, H. L., 1968. Foot-and-mouth disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 22:201-244.
7. Bahneman, HG., 1975. Binary ethyleneimine as an inactivator for FMDV and its application for vaccine production. *Arch Virol.* 47:47-56
8. Barteling, SJ. and NI Cassim, 2004. Very fast (and safe) inactivation of foot-and-mouth disease virus and enteroviruses by a combination of binary ethyleneimine and formaldehyde. *Dev Biol (Basel)*. 119:449-55
9. Buonavoglia, C., Fioretti, A., Tollis, M., Menna, F., & Papparella, V., 1988. A preliminary vaccine potency trial of a Newcastle disease virus inactivated with binary ethyleneimine. *Veterinary research communications*, 12(2-3), 195-197.
10. Brehm KE, Kumar N, Thulke HH and Haas B., 2008. High potency vaccines induce protection against heterologous challenge with foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 26, 1681–168710.1016/j.vaccine.2008.01.038
11. Domingo, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Sierra, S., Arias, A., Pariente, N., Baranowski, E. and Escarmis, C., 2002. Emergence and selection of RNA virus variants: memory and extinction. *Virus Res.* 82:39–44.
12. Domingo, E., Pariente, N., Airaksinen, A., Gonzalez-Lopez, C., Sierra, S., Herrera, M., Grande-Perez, A., Lowenstein, P.R., Manrubia, S.C., Lazaro, E. and Escarmis, C., 2005. Foot-and-mouth disease virus evolution: exploring pathways towards virus extinction. *Curr Top Microbiol Immunol.* 288:149–73.
13. Grubman M. J., 2005. Development of novel strategies to control foot-and-mouth disease: marker vaccines and antivirals. *Biologicals* 33, 227–23410.1016/j.biologicals.2005.08.009
14. Ismail, AH., El-Mahdy, SA, Mossad, WG., Abd El-Krim, AS., Abou El-Yazid, M. and Ali, SM., 2013. Optimization of the inactivation process of FMD virus serotype SAT-2 by binary ethyleneimine (BEI). *J Vet Adv.* 3(3):117-124.
15. Haydon, D.T., Samuel, A.R. and Knowles, N.J., 2001. The generation and persistence of genetic variation in foot-and-mouth disease virus. *Prev Vet Med.* 51:111–24.
16. Kärber, G., 1993. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle pathologie und pharmakologie* 162(4): 480-483.
17. Keeling M. J., Woolhouse M. E., May R. M., Davies G., Grenfell B. T., 2003. Modelling vaccination strategies against foot-and-mouth disease. *Nature* 421, 136–14210.1038/nature01343
18. Klein, J., 2009. Understanding the molecular epidemiology of foot-and-mouth-disease virus. *Infect Genet Evol.* 9:153–61.
19. Knowles, N.J. and Samuel, A.R., 2003. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* 91:65–80.
20. Lê Đình Quyền, 2017. Nghiên cứu hàm lượng virus thích hợp cho một liều vaccin được sản xuất từ chủng virus vaccin LMLM type O-3. *Báo cáo chuyên đề: Nghiên cứu, chế tạo vaccin vô hoạt nhũ dầu phòng bệnh LMLM type O cho gia súc, Hà Nội.*
21. M. Kamel, A. El-Sayed and H.C. Vazquez., 2019. Foot-and-mouth disease vaccines: recent update and future perspectives. *Archives of Virology.* 164:1501-1513
22. Nguyễn Thu Thủy, Nguyễn Văn Long, Phan Quang Minh, Trần Thị Thu Phương, Nguyễn Quang Anh, Nguyễn Ngọc Tiên, Nguyễn Đăng Thọ, Ngô Thanh Long và Nguyễn Bá Hiền, 2014. Mức độ lưu hành virus lở mồm long móng và các yếu tố nguy cơ tại một số tỉnh trọng điểm từ tháng 10 đến tháng 12 năm 2012. *Tạp chí Khoa học và Phát triển.* 12. 3:345-353
23. OIE, 2018. *Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus)*. Chapter 3.1.8: 32.
24. Paton D. J., Valarcher J-F., Bergmann I., Matlho O. G., Zakharov V. M., Palma E. L., Thomson G. R., 2005. Selection of foot-and-mouth disease vaccine strains - a review. *Sci. Tech. Rev.* 24, 981–993
25. Paton D. J., De Clercq K., Greiner M., Dekker A., Brocchi E., Bergmann I., Sammin D. J., Gubbins S., Parida S., 2006. Application of non-structural protein antibody tests in substantiating freedom from foot-and-mouth disease virus infection after emergency vaccination of cattle. *Vaccine* 24, 6503–651210.1016/j.vaccine.2006.06.032
26. Soliman, EM., Mahdy, SE., Mossad, WG., Hassanin, AI. and El-Sayed, EL., 2013. Effect of different inactivators on the efficacy of Egyptian foot and mouth disease SAT2 vaccine. *J Anim Sci Adv.* 3(8):392-399.
27. Uttenthal A., Parida S., Rasmussen T. B., Paton D. J., Haas B., Dundon W. G., 2010. Strategies for differentiating infection in vaccinated animals (DIVA) for foot-and-mouth disease, classical swine fever and avian influenza. *Exp. Rev. Vaccines* 9, 73–8710.1586/erv.09.130

Ngày nhận 9-3-2021

Ngày phản biện 11-4-2021

Ngày đăng 1-7-2021