

Nghiên cứu khoa học

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ PHÒNG BỆNH CỦA VACCIN DỊCH TẢ HEO CHÂU PHI NHƯỢC ĐỘC ĐÔNG KHÔ CHỦNG G-DELTA-I177L TRÊN HEO

Trần Xuân Hạnh¹, Nguyễn Văn Dung¹, Lê Thị Thu Phương¹, Nguyễn Quang Huy¹, Đỗ Thanh Thủy¹, Quách Vô Ngôn¹, Phạm Hào Quang¹, Nguyễn Tấn Liêm¹, Hồ Nguyễn Hải Vy¹, Huỳnh Thị Ngọc Ánh¹, Bùi Anh Thy¹, Trần Hữu Huy¹, Đào Huỳnh Thiên Thanh¹, Phạm Thị Yến Như¹, Nguyễn Đức Huy¹, Nguyễn Thanh Hoài¹, Đỗ Thị Thùy Dung¹, Trần Thu Lâm¹, Nguyễn Thị Thủy¹, Đoàn Ngọc Trung¹, Tạ Hoàng Long², Nguyễn Thị Thúy Hà², Hoàng Thị Thu Hương², Nguyễn Trung Tiến², Phạm Quang Trung², Bạch Đức Lưu³, Võ Văn Hùng³, Nguyễn Thanh Phương³, Cyril G. Gay⁴, Manuel V. Borca⁴, Douglas P. Gladue⁴

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá hiệu quả phòng bệnh DTHCP cho heo khi tiêm vaccin DTHCP nhược độc đông khô chủng G-delta-I177L. Kết quả nghiên cứu cho thấy vaccin DTHCP nhược độc đông khô chủng G-delta-I177L do công ty NAVETCO nghiên cứu, sản xuất đạt các tiêu chuẩn về vô trùng, an toàn và hiệu lực. Trong điều kiện phòng thí nghiệm, 100% heo tiêm vaccin của các lô khác nhau được bảo hộ chống lại virus cường độc DTHCP phân lập tại Việt Nam. Vaccin cũng an toàn khi tiêm thử nghiệm cho heo trong điều kiện sản xuất và 80 - 100% heo tiêm vaccin được bảo hộ khi công cường độc. Heo đạt được trạng thái miễn dịch bảo hộ sau 21 ngày tiêm vaccin, và không có sự khác nhau về khả năng đáp ứng kháng thể cũng như tỷ lệ bảo hộ ở heo lai giống ngoại Yorkshire×Landrace và heo giống địa phương được tiêm cùng loại vaccin trên.

Từ khóa: Vaccin nhược độc, dịch tả heo châu Phi, công cường độc.

Evaluation of preventive efficacy of an attenuated African swine fever virus G-delta-I177L strain lyophilized vaccine on pigs

Tran Xuan Hanh, Nguyen Van Dung, Le Thi Thu Phuong, Nguyen Quang Huy, Do Thanh Thuy, Quach Vo Ngon, Pham Hao Quang, Nguyen Tan Liem, Ho Nguyen Hai Vy, Huynh Thi Ngoc Anh, Bui Anh Thy, Tran Huu Huy, Dao Huynh Thien Thanh, Pham Thi Yen Nhu, Nguyen Duc Huy, Nguyen Thanh Hai, Do Thi Thuy Dung, Tran Thu Lam, Nguyen Thi Thuy, Doan Ngoc Trung, Ta Hoang Long, Nguyen Thi Thuy Ha, Hoang Thi Thu Huong, Nguyen Trung Tien, Pham Quang Trung, Bach Duc Luu, Vo Van Hung, Nguyen Thanh Phuong, Cyril G. Gay, Manuel V. Borca, Douglas P. Gladue

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the preventive efficacy against African swine fever virus (ASFV) of a lyophilized vaccine produced from the attenuated ASF virus G-delta-I177L strain on pigs. The studied results indicated that the G-delta-I177L strain-derived vaccine produced by NAVETCO met the requirements of sterility, safety and potency. Under the laboratory conditions, 100% of pigs vaccinated with different batches of the vaccine were protected from lethal doses of the virulent ASFV strain which was isolated in Viet Nam. The vaccine also showed safe for pigs in the field conditions and 80 - 100% of the vaccinated pigs were protected from challenging experiment with virulent strains on the 28th day

¹ Công ty Cổ phần thuốc thú y trung ương NAVETCO

² Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y trung ương 1

³ Chi cục thú y vùng 6

⁴ Trung tâm Nghiên cứu bệnh gia súc Plum Island, Hoa Kỳ

post-vaccination. From the 21st day post vaccination, the pigs could obtain a solid immune status and there was no different in the antibody response and protection efficacy between the Yorkshire×Landrace hybrid pigs and the local pigs that was vaccinated with the same above ASF vaccine.

Keywords: Attenuated vaccine, African swine fever (ASF), challenge test.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dịch tả heo châu Phi (DTHCP) là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm do virus thuộc họ *Asfarviridae* gây ra cho heo, có thể gây chết 100% số heo mắc bệnh. Virus gây bệnh dịch tả heo châu Phi (ASFV) là virus duy nhất thuộc họ *Asfarviridae*, là virus DNA có kích thước khoảng 170-190 kb, mã hóa cho hơn 160 protein.

Theo báo cáo của Cục Thú y, bệnh DTHCP được phát hiện đầu tiên ở Việt Nam vào tháng 2/2019 tại tỉnh Thái Bình và Hưng Yên. Bệnh sau đó lây nhanh trên diện rộng, gây thiệt hại nghiêm trọng cho nghề chăn nuôi heo. Chỉ tính từ đầu tháng 2/2019 đến 8/7/2019 đã có 5.422 xã thuộc 513 huyện của 62 tỉnh, thành phố có dịch, với tổng số heo tiêu hủy là 3.306.038 con (BNN & PTNT, 2019).

Những năm gần đây, một số công trình nghiên cứu về vaccin phòng bệnh DTHCP đã được công bố, bao gồm các vaccin vô hoạt, vaccin tái tổ hợp, vaccin DNA, vaccin sống nhược độc (Gaudreault và Richt, 2019; Yolanda và cs., 2017; Marisa và cs., 2017; Argilaguet và cs., 2012). Tuy nhiên cho đến nay vẫn chưa có vaccin DTHCP dùng phòng bệnh cho heo. Công tác phòng chống bệnh DTHCP vì vậy rất bị động, chủ yếu dùng các biện pháp cách ly, tiêu hủy và thực hiện an toàn sinh học.

Borca và cs. (2017, 2019) đã tạo thành công chủng virus DTHCP nhược độc G-delta-I177L (viết tắt là I177L), chủng virus đã được loại bỏ đoạn gen I177L bao gồm 112 nucleotide. Chủng virus này được đánh giá là an toàn và có đáp ứng miễn dịch tốt khi tiêm cho heo.

Căn cứ kết quả thu được khi nghiên cứu về chủng virus vaccin G-delta-I177L và yêu cầu của sản xuất cần thiết phải có vaccin phòng bệnh DTHCP ở Việt Nam, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sản xuất vaccin DTHCP. Bài báo này trình bày kết quả thử nghiệm đánh giá hiệu quả phòng bệnh cho heo của vaccin DTHCP nhược độc đồng khô từ chủng G-delta-I177L.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

2.1. Vật liệu thí nghiệm

- Giống virus DTHCP chủng G-delta-I177L

Virus DTHCP nhược độc chủng G-delta-I177L nhận từ Trung tâm nghiên cứu bệnh gia súc, Hoa Kỳ. Chủng này được nghiên cứu phát triển từ chủng gốc ASFV-G và loại bỏ gen I177L bao gồm 112 nucleotide, được Công ty NAVETCO nhập vào Việt Nam theo giấy phép số 1160/TY-QLT do Cục Thú y cấp ngày 29/7/2020 và giấy phép xuất khẩu của phía Hoa Kỳ số D120826, cấp ngày 6/7/2020.

- Giống virus cường độc

Virus cường độc DTHCP, phân lập từ heo bị bệnh dịch tả heo châu Phi tại Việt Nam, do Trung tâm kiểm nghiệm thuốc thú y TW 1 cung cấp, ký hiệu TTKN/ASFV/ĐN/2019.

- Môi trường và dụng cụ nuôi cấy tế bào

Môi trường RPMI 1640 Gibco, code 31800-089; huyết thanh bào thai bê Gibco, code 16000-044; đĩa 96 giếng Corning Primaria, code 353872; chai nuôi tế bào T150 có filter Cellbinding, code 3289; T75 Corning Primaria, code 353810; T150 filter, CellBinding, Corning code 3291.

ELISA phát hiện kháng thể: Kit ELISA phát hiện kháng thể ASFV Ingezim PPA Compac, Ingenas Spain, code 11.PPA.K.315.

- Động vật thí nghiệm

Heo 1,5 - 3 tháng tuổi, giống heo lai Yorkshire và Landrace (Y × L) và giống heo địa phương (giống heo Móng Cái), trọng lượng 20 - 30 kg, khỏe mạnh, chưa tiêm vaccin DTHCP hoặc không có kháng thể kháng DTHCP và âm tính với kháng nguyên DTHCP.

2.2. Phương pháp thí nghiệm

2.2.1. Sản xuất vaccin

Tế bào BMC (Bone Marrow Cell) và PBMC

(Peripheral Blood Mononuclear Cell) thu nhận từ heo và nuôi cấy theo quy trình của SCIRO Australian Animal Health Laboratory (AAHL, 2018; EU, 2018; Carrascosa và cs., 2011).

Phương pháp sản xuất vaccin được tóm tắt như sau: Virus DTHCP nhược độc chủng I177L được nhân lên trên tế bào BMC hay PBMC. Thu hoạch tại thời điểm 96 giờ sau gây nhiễm. Lấy mẫu kiểm tra vô trùng, thuần khiết và tiến hành chuẩn độ để xác định hiệu giá virus. Căn cứ vào hiệu giá virus, huyền dịch virus sẽ được tính toán và phối trộn với dung môi đông khô sao cho sau đông khô 1 liều vaccin chứa $10^{3,0}$ HAD₅₀. Vaccin được bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8°C.

2.2.2. Kiểm tra an toàn vaccin

Một lô vaccin dùng 3 - 5 heo. Heo kiểm tra an toàn có trọng lượng 20 - 30 kg, được tiêm với liều gấp 5, 10 liều sử dụng và 1 liều sử dụng nhưng với quy trình tiêm 2 mũi. Tiêm bắp thịt sau gốc tai. Theo dõi 14 ngày sau khi tiêm về thân nhiệt, biểu hiện lâm sàng, tình trạng sức khỏe. Vaccin đạt tiêu chuẩn an toàn nếu sau khi tiêm, vị trí tiêm không có phản ứng bất thường và trong thời gian theo dõi (14 ngày) tất cả heo sống khỏe mạnh, ăn uống, vận động và phát triển bình thường.

2.2.3. Kiểm tra hiệu lực vaccin

Một lô vaccin kiểm tra dùng 8 heo, trong đó nhóm thử nghiệm miễn dịch 5 heo được tiêm vaccin và nhóm đối chứng 3 heo còn lại không được tiêm vaccin. Nhóm 5 heo thử nghiệm được tiêm vaccin với 1 liều/con/tiêm bắp thịt. Đồng thời, nhóm 3 con đối chứng được tiêm dung dịch pha vaccin với 1 ml/con/tiêm bắp thịt.

Sau tiêm vaccin 28 ngày, tất cả heo tiêm vaccin và đối chứng được lấy máu kiểm tra đáp ứng kháng thể bằng phương pháp ELISA và tiến hành công cường độ chủng virus DTHCP độc lực cao TTKN/ASFV/ĐN/2019 do Trung tâm kiểm nghiệm thuốc thú y TW 1 cung cấp. Liều công độ: 1ml/con/tiêm bắp chứa 10^2 HAD₅₀.

Sau công độ, thân nhiệt và các biểu hiện lâm sàng của heo được theo dõi trong vòng 14 ngày. Tất cả các heo chết ở lô đối chứng và lô miễn dịch đều được mổ khám kiểm tra bệnh tích và lấy mẫu xác định nguyên nhân chết. Vaccin được đánh giá

đạt yêu cầu về hiệu lực nếu nhóm tiêm vaccin sống ít nhất 4/5 ($\geq 80\%$) trong khi ở nhóm đối chứng chết 3/3 (100%) hoặc chết 2/3 và 1/3 bị bệnh.

2.2.4. Khả năng bảo hộ của heo ở các thời điểm khác nhau sau tiêm vaccin

Heo giống lai Yorkshire và Landrace và giống heo địa phương (giống heo Móng Cái) được tiêm vaccin nhược độc DTHCP chủng I177L; 1 liều vaccin/con/tiêm bắp sau gốc tai. Theo dõi hàng ngày sau tiêm và ở các ngày 14, 21 và 28, heo miễn dịch cùng 3 heo đối chứng (không tiêm vaccin) cho mỗi lô được tiến hành thử thách với chủng DTHCP cường độ, liều 10^2 HAD₅₀/con/tiêm bắp. Đánh giá kết quả sau 14 ngày theo dõi.

III. KẾT QUẢ

Từ kết quả nghiên cứu về khả năng nhân lên của virus chủng I177L trên tế bào BMC, PBMC, xác định liều gây nhiễm tế bào và thời gian thu hoạch, cũng như căn cứ vào kết quả xác định liều bảo hộ 50% (PD₅₀) chúng tôi đã tiến hành xây dựng công thức phối trộn kháng nguyên và sản xuất thành công vaccin DTHCP ở dạng vaccin đông khô.

Để đánh giá chất lượng của các lô vaccin sản xuất, qua đó làm cơ sở xem xét, đánh giá tính phù hợp của quy trình sản xuất vaccin, chúng tôi tiến hành kiểm tra vaccin theo thông lệ quy định, với các tiêu chuẩn căn bản cần kiểm tra là vô trùng, an toàn và hiệu lực. Kết quả của các thí nghiệm kiểm tra này cũng là cơ sở khoa học và thực tiễn để xây dựng quy trình kiểm nghiệm vaccin DTHCP cơ sở của công ty, cũng như đề xuất để xây dựng phương pháp kiểm nghiệm quốc gia về vaccin này.

3.1. Kiểm tra vô trùng vaccin DTHCP nhược độc đông khô chủng I177L

Trước khi tiến hành kiểm tra vô trùng, mẫu vaccin kiểm tra được đặt trong tủ ấm 37°C trong 1 giờ. Chai vaccin sau đó được hoàn nguyên bằng dung dịch pha vaccin vô trùng. Sau khi lắc đều, dùng ống hút có chia vạch đã tiệt trùng hút dung dịch vaccin cần kiểm tra cấy vào các môi trường kiểm tra gồm thạch máu, thạch nấm, canh dinh dưỡng và canh yếm khí, mỗi loại 2 ống. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả kiểm tra vô trùng vaccin DTHCP nhược độc đông khô chủng I177L

Lô vaccin	Thạch máu	Nước thịt	Thioglycolate	Thạch nấm	Kết luận
	37°C, 7 ngày			(25°C, 10 ngày)	
01	2/2 (-)	2/2 (-)	2/2 (-)	2/2 (-)	Vô trùng
02	2/2 (-)	2/2 (-)	2/2 (-)	2/2 (-)	Vô trùng
03	2/2 (-)	2/2 (-)	2/2 (-)	2/2 (-)	Vô trùng
04	2/2 (-)	2/2 (-)	2/2 (-)	2/2 (-)	Vô trùng
05	2/2 (-)	2/2 (-)	2/2 (-)	2/2 (-)	Vô trùng

Ghi chú: (-): âm tính

Kết quả kiểm tra cho thấy sau thời gian theo dõi 10 ngày, không có vi khuẩn phát triển trên các môi trường kiểm tra. Tất cả các lô vaccin DTHCP kiểm tra đạt tiêu chuẩn vô trùng.

3.2. Kiểm tra an toàn vaccin DTHCP nhược độc đông khô chủng I177L

An toàn của vaccin DTHCP được kiểm tra trên

heo. Heo (động vật đích) 2 - 3 tháng tuổi có trọng lượng từ 25 - 30 kg, khỏe mạnh. Mỗi lô vaccin dùng từ 3 - 5 heo. Heo kiểm tra an toàn tiêm với các liều 5× hoặc 10× liều sử dụng. Vaccin cũng được kiểm tra an toàn theo quy trình tiêm 2 mũi, mũi 2 sau mũi 1 từ 14 - 21 ngày và tiêm 1 liều sử dụng/lần tiêm. Kết quả được trình bày tại bảng 2.

Bảng 2. Kiểm tra an toàn vaccin DTHCP nhược độc đông khô chủng I177L

Lô vaccin	Số lượng heo	ELISA dương trước vaccin	Liều tiêm (×)	Tiêm nhắc lại/liều	Số sống/tổng số và tình trạng sức khỏe	Kết luận
01	5	0/5	10	Không	5/5, khỏe mạnh	An toàn
02	3	0/3	5	Không	3/3, khỏe mạnh	An toàn
03	3	0/3	5	Không	3/3, khỏe mạnh	An toàn
04	3	0/3	10	Không	3/3, khỏe mạnh	An toàn
	5	0/5	1	Có/1 liều	5/5, khỏe mạnh	An toàn
05	3	0/3	10	Không	3/3, khỏe mạnh	An toàn

Như vậy, với việc tiêm mỗi heo thử nghiệm gấp 5 liều, 10 liều và 1 liều với quy trình tiêm 2 mũi, kết quả kiểm tra an toàn trên heo ghi nhận tất cả các heo được tiêm vaccin DTHCP ở tất cả các lô vaccin kiểm tra đều sống, khỏe mạnh trong thời gian theo dõi 14 ngày sau tiêm vaccin. Heo ăn uống và vận động bình thường. Nhìn chung không có sự khác nhau về biểu hiện bên ngoài (ăn uống, vận động, thể trạng) của heo giữa các heo được tiêm gấp 5, 10 và 1 liều sử dụng. Mặc dù vậy do đặc tính sinh học của từng cá thể, một số ít heo sau khi được tiêm vaccin cũng có thể có biểu hiện sốt nhẹ. Hiện tượng này không kéo dài và thân nhiệt trở về chỉ số bình thường sau khoảng 12 giờ. Đánh giá kết quả thu được sau khi kiểm tra an toàn cho thấy tất cả các lô

vaccin kiểm tra đạt tiêu chuẩn an toàn.

3.3. Kết quả kiểm tra hiệu lực vaccin DTHCP nhược độc đông khô chủng I177L

Cũng như chỉ tiêu vô trùng và an toàn, hiệu lực của vaccin cũng là một trong những chỉ tiêu quan trọng cần phải đánh giá kiểm tra. Kết quả kiểm tra hiệu lực của các lô vaccin được trình bày ở bảng 3.

Theo dõi về đáp ứng kháng thể sau tiêm vaccin, bằng phương pháp ELISA ở ngày thứ 7 chưa phát hiện được kháng thể kháng virus DTHCP. Heo có đáp ứng kháng thể ở các mức độ khác nhau có thể kiểm tra được ở ngày 14. Mức độ huyết thanh chuyển dương tăng dần ở ngày 21 và cao nhất ở

ngày 28. Tổng kết chung các lô vaccin kiểm tra ghi nhận ở ngày 14 có 52% heo tiêm vaccin có

huyết thanh dương tính. Tỷ lệ này tăng lên 80% ở ngày 21 và cao nhất ở ngày 28, đạt 96%.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra hiệu lực của vaccin DTHCP nhược độc đông khô chủng I177L

Lô vaccin	Nhóm TN*	Số lượng heo	ELISA dương trước vaccin	ELISA sau tiêm vaccin ở ngày (mẫu dương/tổng số)			Giá trị ELISA trung bình**	Số sống/tổng số công
				14	21	28		
01	MD	5	0/5	1/5	5/5	5/5	67,0±7,8	5/5
	ĐC	3	0/3	0/3	0/3	0/3	-	0/3
02	MD	5	0/5	5/5	5/5	5/5	69,6±2,9	5/5
	ĐC	3	0/3	0/3	0/3	0/3	-	0/3
03	MD	5	0/5	2/5	3/5	4/5	66,5±3,5	5/5
	ĐC	3	0/3	0/3	0/3	0/3	-	0/3
04	MD	5	0/5	3/5	3/5	5/5	77,0±14	5/5
	ĐC	3	0/3	0/3	0/3	0/3	-	0/3
05	MD	5	0/5	2/5	4/5	5/5	66,0±4,9	5/5
	ĐC	3	0/3	0/3	0/3	0/3	-	0/3
Tổng số		42	0/42	13/25 (52%)	20/25 (80%)	24/25 (96%)		

Ghi chú: *: Nhóm thí nghiệm: MD: Miễn dịch, ĐC: Đối chứng, **: Giá trị ELISA trung bình ở ngày 28 sau tiêm vaccin

Sử dụng phương pháp công cường độc, dùng chủng virus DTHCP cường độc phân lập tại Việt Nam, kết quả cho thấy tất cả heo được tiêm vaccin ở các lô khác nhau, không những sống 100%, mà còn ngăn chặn hiệu quả triệu chứng của bệnh; trong khi đó 100% heo ở lô đối chứng chết. Tổng kết kết quả kiểm tra 5 lô vaccin cho thấy tất cả 25 heo được tiêm vaccin đều được bảo hộ sau khi công độc (tỷ lệ 100%) và 17 heo không tiêm vaccin chết 17/17 (100%). Theo dõi trong thời gian 14 ngày công cường độc, các lô vaccin kiểm tra đều đạt tiêu chuẩn hiệu lực.

Theo dõi diễn biến bệnh của heo ở các lô đối chứng cho thấy heo bắt đầu sốt vào ngày thứ 4 sau khi gây bệnh. Bệnh tiến triển nặng dần với các triệu chứng sốt cao từ 41°C trở lên, xung huyết và xuất huyết ngoài da, mũi tiết nhiều dịch lẫn máu, hậu môn xuất huyết và đi phân có máu. Heo mệt mỏi, bỏ ăn, ít vận động và thường chết sau 4 - 5 ngày kể từ khi xuất hiện triệu chứng và từ 7 - 10 ngày sau khi công. Các bệnh tích thường gặp khi mổ khám là chảy nhiều dịch mũi, có máu và bọt khí; hậu môn và bộ phận sinh dục xung huyết; phổi viêm, xuất huyết, khí quản có máu lẫn bọt khí; tim tích nước vàng; xoang bụng tích nước, xuất

huyết, dạ dày xung huyết, xuất huyết, ruột xuất huyết; lách sưng to màu đen; thận xuất huyết; hạch dưới hàm, bẹn nông, hạch màng treo ruột sưng to, xuất huyết.

3.4. Kiểm tra hiệu quả của vaccin DTHCP trên các giống heo khác nhau

Ở thí nghiệm này, chúng tôi thí nghiệm trên đôi tượng heo lai 2 máu Yorkshire với Landrace (Y×L) và heo địa phương (giống heo Móng Cái). Đánh giá đáp ứng miễn dịch bằng phương pháp ELISA và kiểm tra khả năng bảo hộ của 2 giống heo bằng phương pháp công cường độc. Kết quả trình bày ở bảng 4.

Kết quả cho thấy, đáp ứng kháng thể sau khi tiêm vaccin ở lô thí nghiệm dùng giống heo lai sớm hơn giống heo địa phương. Ở 14 ngày sau tiêm vaccin, lô heo lai đã có 3/10 heo có đáp ứng kháng thể phát hiện bằng phương pháp ELISA, trong khi lô heo giống địa phương chưa phát hiện được kháng thể DTHCP. Tỷ lệ heo có đáp ứng kháng thể tiếp tục cao ở ngày 21 đối với lô heo giống lai khi so sánh với lô giống heo địa phương. Tuy nhiên kiểm tra ở ngày 28, tỷ lệ heo có huyết thanh chuyển dương của hai nhóm heo thí nghiệm không có sự khác nhau có ý nghĩa, 90% đối với lô heo lai và 80%

đối với heo địa phương. So sánh mức độ đáp ứng kháng thể dựa theo giá trị ELISA trung bình cho thấy lô heo giống lai có giá trị cao hơn lô heo giống địa phương.

Mặc dù đáp ứng kháng thể của lô heo giống địa phương chậm hơn cả về thời gian và mức độ, tuy

nhiên khi tiến hành thử thách cường độc ở 28 ngày sau tiêm vaccin thì kết quả bảo hộ của 2 nhóm heo thí nghiệm là giống nhau với 100% heo tiêm vaccin được bảo hộ, trong khi đối chứng chết 100% với các triệu chứng đặc trưng của bệnh DTHCP (bảng 4).

Bảng 4. Hiệu quả phòng bệnh của vaccin DTHCP trên giống heo lai và heo địa phương

Lô vaccin	Nhóm TN*	Giống heo	Số lượng heo	ELISA dương trước vaccin	ELISA sau tiêm vaccin ở ngày (mẫu dương/ tổng số)			Giá trị ELISA trung bình	Số sống/ tổng số	Tỷ lệ bảo hộ (%)
					14	21	28			
03	MD	Lai (Y×L)	10	0/10	3/10	6/10	9/10	71,3±5,6	10/10	100
	ĐC		3	0/3	-	-	-	-	0/3	0
	MD	Địa phương	10	0/10	0/10	2/10	8/10	65,4±7,9	10/10	100
	ĐC		3	0/3	-	-	-	-	0/3	0

Ghi chú: *: Nhóm thí nghiệm, MD: Miễn dịch, ĐC: Đối chứng, giá trị ELISA trung bình tính trên giá trị ELISA ở ngày thứ 28 sau tiêm vaccin.

3.5. Khả năng bảo hộ của heo ở các thời điểm khác nhau sau tiêm vaccin

Để kiểm tra khả năng này, heo được tiêm

vaccin DTHCP đồng khô chủng I 177L và được thử thách cường độc vào các ngày 14, 21 và 28 sau tiêm vaccin. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả công cường độc cho heo ở các thời điểm khác nhau sau tiêm vaccin

Ngày công	Nhóm thí nghiệm	Số lượng heo	Giống heo	ELISA trước vaccin	ELISA sau vaccin ở ngày			Giá trị ELISA trung bình	Số sống/tổng số (% bảo hộ)		
					14	21	28		MD	ĐC	
14	MD-1	3	Địa phương	0/3	1/3			76,0±0,0 ⁽¹⁾	3/3		
	ĐC-1	3		0/3	-			-		0/3	
	MD-2	9		0/9	1/9			50,0±0,0 ⁽¹⁾	1/9		
	ĐC-2	3		0/3	-			-		1/3	
	MD	6		Lai (Y×L)	0/6	1/6			49,0±0,0 ⁽¹⁾	2/6	
	ĐC	3			0/3	-			-		0/3
Tổng hợp								6/18 (33,3%)	1/9 (11,1%)		
21	MD	5	Địa phương	0/5	5/5	5/5		68,8±13,9 ⁽²⁾	5/5		
	ĐC	3		0/3	-			-		0/3	
	Tổng hợp								5/5 (100%)	0/3 (0%)	
28	MD-1	5	Lai (Y×L)	0/5	5/5	5/5	5/5	69,6±2,9 ⁽³⁾	5/5		
	ĐC-1	3		0/3	-			-		0/3	
	MD-2	5		Địa phương	0/5	2/5	4/5	5/5	68,0±4,9 ⁽³⁾	5/5	
	ĐC-2	3			0/3	-			-		0/3
	Tổng hợp								10/10 (100%)	0/6 (0%)	

MD: Miễn dịch, ĐC: Đối chứng, (1): Giá trị ELISA trung bình ở ngày 14, (2): Giá trị ELISA trung bình ở ngày 21, (3): Giá trị ELISA trung bình ở ngày 28, (-): Âm tính

Kết quả ghi nhận tỷ lệ bảo hộ có sự khác nhau khi so sánh ở các thời điểm thử thách cường độ khác nhau sau tiêm vaccin. Công độc lúc 14 ngày, trong tổng số 18 heo được tiêm vaccin của 3 đợt thí nghiệm, chỉ có 6/18 heo sống; tỷ lệ bảo hộ 33,3%. Trong khi đó không có sự khác nhau về tỷ lệ bảo hộ khi công độc ở ngày thứ 21 và 28 sau tiêm vaccin. Cả 2 thời điểm này 100% heo tiêm vaccin được bảo hộ. Cần chú ý rằng tất cả heo đối chứng dùng cho các đợt thí nghiệm 100% chết hoặc bị bệnh (bảng 5).

3.6. Thí nghiệm tiêm vaccin trong điều kiện sản xuất

Việc tiêm vaccin trong điều kiện sản xuất là một yêu cầu bắt buộc nhằm đánh giá hiệu quả phòng bệnh của vaccin trong điều kiện thực tế sử dụng sau này, ở đó các yếu tố ảnh hưởng đến đáp ứng miễn dịch rất khó có thể được khống chế như trong điều kiện

phòng thí nghiệm. Tiêm vaccin DTHCP cho heo trong sản xuất thực chất là kiểm tra tính an toàn và hiệu lực phòng bệnh của vaccin trong điều kiện thực tế của heo được nuôi. Về an toàn, khác với phương pháp đánh giá trong phòng thí nghiệm, liều thử an toàn thường gấp 10 lần hoặc 2 lần liều sử dụng. Tuy nhiên, sẽ không thực tế nếu chúng ta áp dụng quy trình đánh giá an toàn trong phòng thí nghiệm để đánh giá an toàn trong điều kiện sản xuất.

Để thực hiện việc kiểm tra an toàn và hiệu lực trong sản xuất, chúng tôi tiêm thí điểm vaccin cho đàn heo của Phân viện chăn nuôi miền Nam, trong đó cho 25 heo khỏe mạnh vào 7 - 8 tuần tuổi có trọng lượng 20 - 25 kg, nuôi tại trại heo giống quốc gia Bình Minh, thuộc Trung tâm nghiên cứu Bình Thắng và 22 heo giống địa phương nuôi tại Bến Cát, Bình Dương. Kết quả trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả tiêm vaccin DTHCP cho heo trong điều kiện sản xuất

Tên trại (thuộc Phân viện chăn nuôi miền Nam)	Lô heo	Số lượng heo	Tuổi heo (tuần)	Giống heo	Lô vaccin	Kết quả ELISA số dương tính (tỷ lệ)		Số con sống sau công độc (tỷ lệ bảo hộ)
						Trước vaccin	Sau vaccin	
Trại heo giống quốc gia Bình Minh	MD	25	7 - 8	Lai (Y×L)	03	0 (0%)	21 (84%)	4/5 (80%)
	ĐC	3			-	0 (0%)		1 (33,3%)
Trại chăn nuôi Bến Cát	MD	22	8	Địa phương	04	0 (0%)	20 (90,9%)	5/5 (100%)
	ĐC	3			-	0 (0%)		0 (0%)

Ghi chú: MD: Miễn dịch, ĐC: Đối chứng

Theo dõi sau khi tiêm, tất cả 25 heo nuôi tại trại heo Bình Minh và 22 heo tại trại Bến Cát không có phản ứng phụ bất lợi nào và theo dõi trong vòng 28 ngày sau khi tiêm vaccin, heo khỏe mạnh, phát triển bình thường. Kiểm tra đáp ứng miễn dịch bằng phương pháp ELISA ở ngày 28 sau tiêm vaccin có 21/25 mẫu huyết thanh heo tiêm vaccin tại trại Bình Minh chuyển dương (tỷ lệ 84%) và tỷ lệ này là 90,9 % (20/22) đối với heo địa phương tiêm vaccin tại trại Bến Cát, Bình Dương.

Chọn ngẫu nhiên 5 heo trong 25 heo tiêm vaccin nuôi ở trại Bình Minh và 5 heo trong 22 heo tiêm nuôi ở Bến Cát để thử thách cường độ vào ngày 28 sau tiêm vaccin. Kết quả thu được cho thấy

có 80% và 100% heo được công tương ứng ở trại Bình Minh và Bến Cát được bảo hộ chống lại virus DTHCP cường độ phân lập tại Việt Nam.

IV. THẢO LUẬN

Do tính chất nguy hiểm của bệnh, gần đây nghiên cứu vaccin phòng bệnh DTHCP đã được quan tâm hơn và một số công trình nghiên cứu về vaccin phòng bệnh đã được công bố. Tuy nhiên, đến nay vẫn chưa có vaccin phòng bệnh DTHCP cho heo. Có hai lý do để giải thích cho việc chưa có vaccin. Một là, cấu trúc virus quá phức tạp, là DNA virus có kích thước lớn, mã hóa cho hơn 150 protein, với hạt virus chứa ít nhất 50 protein được

phân bố ở các lớp khác nhau. Hơn nữa bộ gen mã hóa nhiều yếu tố độc lực cho phép virus xâm nhập, nhân lên trong đại thực bào của heo và đồng thời tấn công hệ thống miễn dịch của vật chủ. Hai là, do những khó khăn nêu trên, có rất ít các công trình nghiên cứu thành công để tạo ra được các chủng virus DTHCP đạt yêu cầu về an toàn và hiệu lực, nên dẫn đến nhận thức sai lầm là việc nghiên cứu vaccin DTHCP là không thể thực hiện được (Gonzalez, 2013).

Đã có nhiều hướng tiếp cận để nghiên cứu phát triển vaccin DTHCP, như vaccin vô hoạt, vaccin tái tổ hợp, vaccin nhược độc truyền thống, vaccin nhược độc bằng công nghệ cắt gen. Kết quả nghiên cứu cho thấy vaccin vô hoạt không có khả năng bảo hộ mặc dù có đáp ứng kháng thể, còn các vaccin tái tổ hợp cho bảo hộ hạn chế và không ổn định (Natasha, 2019; Marisa, 2017; Gonzalez, 2013).

Từ việc có giống sản xuất vaccin đến sản xuất được vaccin thương mại là cả một quá trình nghiên cứu công phu, với nhiều chỉ tiêu cần thiết phải xác định. Thật vậy, để xây dựng được quy trình sản xuất, nhiều chỉ tiêu liên quan cần được khảo sát, như khả năng nuôi cấy và sự nhân lên của virus trên tế bào, thời gian thu hoạch, liều vaccin, công thức phối trộn và quy trình đông khô... Nhằm đánh giá mức độ ổn định của quá trình sản xuất, một yêu cầu rất cơ bản của sản xuất vaccin ở mức độ thương mại, chúng tôi đã tiến hành sản xuất liên tiếp 5 lô vaccin và thực hiện đánh giá chất lượng theo tiêu chuẩn đã được Trung tâm kiểm nghiệm thuốc thú y trung ương 1 phối hợp xây dựng. Kết quả cho thấy tất cả các lô vaccin đều đạt các tiêu chuẩn về vô trùng, an toàn và đặc biệt hiệu lực của các lô đều đạt tỷ lệ bảo hộ 100% khi đánh giá bằng phương pháp công cường độc.

Sự hiểu biết về miễn dịch chống lại virus DTHCP trên heo còn rất hạn chế và vẫn cần nhiều nghiên cứu để làm sáng tỏ hơn cơ chế hoạt động miễn dịch chống lại virus này. Mặc dù vậy, qua các nghiên cứu thu được, người ta tin rằng cả miễn dịch tế bào và miễn dịch dịch thể đóng vai trò quan trọng trong hoạt động miễn dịch của heo chống lại virus DTHCP (Sereda, 2015; Marisa, 2017). Hiện nay, ngoài phương pháp thử thách công cường độc, chúng ta chưa có phương pháp huyết thanh học thay thế nào có

thể đánh giá chính xác khả năng bảo hộ của heo sau khi được tiêm vaccin DTHCP, hay nói cách khác, chưa có phương pháp đánh giá phòng thí nghiệm nào có kết quả tương quan thuận với phương pháp thử thách công cường độc thực địa. Mặc dù, theo quan sát của chúng tôi trong khuôn khổ của nghiên cứu này, khi tiến hành gây miễn dịch cho heo bằng virus DTHCP chủng I177L, sau đó tiến hành công cường độc, tất cả những heo có phản ứng huyết thanh dương tính hoặc nghi ngờ bởi kit ELISA thương mại đều có thể bảo hộ chống lại virus công cường độc.

Có nhiều yếu tố có thể ảnh hưởng đến khả năng đáp ứng miễn dịch sau khi tiêm phòng vaccin. Các yếu tố đó gồm chất lượng vaccin, quy trình sử dụng, kỹ thuật tiêm phòng, tình trạng dinh dưỡng và sức khỏe động vật. Đối với động vật, cùng một loài động vật nhưng giống khác nhau có thể cho kết quả đáp ứng miễn dịch khác nhau. Sự khác nhau này có thể được đánh giá theo các chỉ tiêu như thời gian xuất hiện đáp ứng kháng thể, mức độ mạnh yếu, độ đồng đều và trên hết là khả năng bảo hộ chống lại tác nhân gây bệnh. Thí nghiệm của chúng tôi chứng minh không có sự khác nhau có ý nghĩa về khả năng đáp ứng kháng thể và bảo hộ khi so sánh tiêm vaccin DTHCP chủng I177L cho heo địa phương và heo lai nhập ngoại.

Việc xác định thời gian và khả năng heo được bảo hộ sau khi tiêm vaccin có ý nghĩa cả về mặt khoa học và thực tiễn. Giống như kết quả kiểm tra đáp ứng kháng thể sau khi tiêm vaccin DTHCP ở ngày 14, tỷ lệ bảo hộ của heo được tiêm vaccin DTHCP đánh giá bằng phương pháp công cường độc ở ngày 14 chỉ đạt khoảng 33%. Tuy nhiên, tỷ lệ bảo hộ cao (100%) thu được khi thử thách công cường độc ở ngày 21 và 28 sau tiêm vaccin. Kết quả này cho thấy thời gian 14 ngày sau tiêm vaccin chưa đủ dài để heo có một trạng thái miễn dịch đủ chắc chắn, khả năng bị nhiễm bệnh rất cao vì vậy công tác phòng bệnh, cách ly, thực hiện nghiêm an toàn sinh học phải được lưu ý thực hiện triệt để trước và sau khi tiêm phòng trong vòng 21 ngày.

Heo được tiêm vaccin chủng I177L không phát hiện được kháng thể trung hòa (số liệu không trình bày trong bài báo này). Tuy nhiên kháng thể trung

hòa có thể phát hiện sau khi heo đã tiêm vaccin và được thử thách cường độc. Cũng tương tự như vậy, những heo bị bệnh DTHCP nhưng khỏi bệnh có thể phát hiện được kháng thể trung hòa trong huyết thanh của nó. Vai trò của miễn dịch qua trung gian kháng thể trong bảo hộ đã được chứng minh thông qua việc gây miễn dịch thụ động cho heo với huyết thanh lấy từ heo khỏi bệnh DTHCP và kết quả heo được nhận huyết thanh đã có thể bảo hộ chống lại virus DTHCP cường độc. Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch trên heo cho thấy rằng heo bị bệnh sản xuất kháng thể rất nhanh có thể phát hiện được từ 7 - 10 ngày sau nhiễm và ở những heo đã khỏi bệnh DTHCP kháng thể đặc hiệu có thể đo được ở mức độ cao trong nhiều tháng, thậm chí cả đời của con heo. Khả năng truyền kháng thể đặc hiệu từ mẹ có miễn dịch sang heo con cũng được ghi nhận. Kháng thể này có thể phát hiện trong huyết thanh heo con trong vài tuần đầu tiên sau sinh và thời gian bán hủy của kháng thể ở heo con khoảng 3 tuần. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng nếu kháng thể tìm thấy trong heo con lớn hơn 3 tháng tuổi, rất nhiều khả năng kháng thể này không phải từ mẹ truyền (EU Ref. Lab, 2020).

Có những chứng cứ từ kết quả thí nghiệm của chúng tôi cho thấy có sự khác nhau về khả năng bảo hộ cho heo con từ mẹ được tiêm vaccin DTHCP và từ mẹ bị bệnh DTHCP nhưng qua khỏi. Kết quả heo con nhận kháng thể từ mẹ bị bệnh DTHCP qua khỏi có thể được bảo hộ đến 38 ngày với tỷ lệ bảo hộ 100% (giới hạn theo dõi), ngược lại heo con từ heo mẹ được tiêm vaccin thử thách cường độc ở 30 ngày chỉ 20% được bảo hộ (số liệu không trình bày ở bài báo này). Lý do của sự khác nhau này có lẽ liên quan đến sự hiện diện của kháng thể trung hòa. Như đã đề cập ở trên, kháng thể trung hòa không phát hiện được sau khi tiêm vaccin DTHCP chủng I177L, nhưng có thể phát hiện được trong huyết thanh của heo khỏi bệnh DTHCP hoặc những heo tiêm vaccin và sống sau thử thách cường độc.

Việc tiêm vaccin trong điều kiện sản xuất là một yêu cầu cần thiết nhằm đánh giá hiệu quả phòng bệnh của vaccin trong điều kiện sử dụng thực tế trên động vật đích của vaccin. Như chúng

ta đã biết, đáp ứng miễn dịch sau khi tiêm vaccin là một quá trình phức tạp phụ thuộc rất nhiều yếu tố. Có những yếu tố thuộc về vaccin, có những yếu tố thuộc về bản thân động vật tiêm phòng, nhưng cũng có nhiều yếu tố khác khó xác định một cách chính xác hoặc rất khó phát hiện ra để loại trừ, điều mà trong điều kiện phòng thí nghiệm với một số lượng động vật nhỏ rất dễ dàng được kiểm soát. Nếu chỉ dựa vào kết quả đánh giá chất lượng trong phòng thí nghiệm sẽ chưa đủ cơ sở khoa học để đưa vào sử dụng trong diện rộng, hoặc khi sử dụng trên diện rộng có thể sẽ nảy sinh những vấn đề mà khi thực nghiệm trên một số ít động vật trong phòng thí nghiệm không thể phát hiện được. Vì vậy, kết quả của việc thử nghiệm này còn là cơ sở khoa học quan trọng giúp cho việc xây dựng và hoàn thiện quy trình sử dụng vaccin.

Thực chất việc thử nghiệm vaccin trong điều kiện sản xuất chính là kiểm tra mức độ an toàn và hiệu quả của vaccin được sử dụng trong điều kiện thực tế, đúng với các hoàn cảnh và điều kiện thực tế sau này vaccin sẽ được sử dụng để tiêm phòng cho heo. Chính điều này dẫn đến sự khác nhau về phương pháp kiểm tra được thực hiện giữa phòng thí nghiệm và thực nghiệm thực địa. Về nguyên tắc, kiểm tra an toàn trong phòng thí nghiệm người ta thường dùng liều gấp 5 hoặc 10 lần liều đề xuất sử dụng và hiệu lực thường dùng với số lượng động vật nhỏ, cố định được quy định theo quy trình, trong khi đó thử thực địa thường với số lượng động vật lớn hơn nhiều. Vì vậy sẽ không thực tế nếu chúng ta áp dụng quy trình đánh giá an toàn trong phòng thí nghiệm để đánh giá an toàn trong điều kiện sản xuất, vì như vậy sẽ không đúng với điều kiện và quy trình sau này sử dụng trong đại trà và hơn nữa trong điều kiện ngoài thực địa có nhiều yếu tố không kiểm soát được có thể dẫn đến những kết quả sai lệch.

Kết quả thử nghiệm thực địa cho thấy vaccin DTHCP chủng I177L an toàn trên cả giống heo lai Yorkshire với Landrace và giống heo địa phương. Hiệu quả bảo hộ đạt được ở mức cao khi đánh giá bằng phương pháp công cường độc với tỷ lệ bảo hộ đạt 80% và 100% tương ứng với hai giống heo lai và heo địa phương dùng trong thí nghiệm này.

V. KẾT LUẬN

Từ kết quả thu được chúng tôi có một số kết luận sau: i/ Vacxin DTHCP nhược độc đông khô dùng chủng virus G-delta-I177L do công ty NAVETCO nghiên cứu sản xuất đạt các tiêu chuẩn về vô trùng, an toàn và hiệu lực, 100% heo tiêm vacxin trong phòng thí nghiệm được bảo hộ khi đánh giá bằng phương pháp công cường độc; ii/ Vacxin an toàn cho heo trong điều kiện sản xuất và hiệu quả bảo hộ đạt tỷ lệ từ 80% đến 100%; iii/ Heo đạt được trạng thái miễn dịch chắc chắn sau 21 ngày tiêm vacxin và không có sự khác nhau về khả năng đáp ứng kháng thể cũng như tỷ lệ bảo hộ khi dùng vacxin cho heo lai nhập ngoại và heo giống địa phương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Carrascosa L. Angel, M. Jose Bustos and Patricia de Leon, 2011. Methods for growing and titrating African swine fever virus: field and laboratory samples. *Current Protocols in Cell Biology* 53: 26.14.1-26.14.25.
- Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2019. Báo cáo tình hình công tác phòng chống bệnh DTHCP. *Tài liệu hội nghị “Bàn về các giải pháp phòng chống Dịch tả heo châu Phi ngày 9/7/2019”*.
- CSIRO Australian Animal Health Laboratory (AAHL), 2018. *Porcine bone marrow harvest*.
- European Union Reference Laboratory for African Swine Fever (ASF). <https://asf-referencelab.info/asf>.
- Gonzalez Fernando Rodríguez, 2013. Vaccines against African Swine Fever: Yes, we can! <https://www.pigprogress.net/Health/Articles/2013/5/...>
- <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/670109v2.full>
- Argilaguet M.Jordi, Eva Pérez-Martín, Miquel Nofrarias, Carmina Gallardo, Francesc Accensi, Anna Lacasta, Mercedes Mora, Maria Ballester, Ivan Galindo-Cardiel, Sergio López-Soria, José M.Escribano, Pedro A.Reche, Fernando Rodríguez, 2012. DNA Vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies. *PLOS ONE*, Doi:10.1371/journal.pone.0142889. November 30, 2015.
- Borca V.Manuel, Elizaberth Ramirez Medina, Ediane Silva, Elizaberth Vuono, Ayushi Rai, Sarah Pruitt, Lauren G. Holinka, Lauro Velazquez Salinas, James Shu and Douglas P. Gladue, 2019. Development of a highly effective African swine fever virus vaccine by detection of the I 177 L gene results in sterile immunity against the current epidemic Eurasia strain. <https://www.researchgate.net/publication/337715368>.
- Borca V.Manuel, Lauren G. Holinka, Keith A. Berggren and Douglas P. Gladue, 2017. CRISPR-Cas9, a tool to efficiently increase the development of recombinant African swine fever viruses. *Scientific Reports*, Vol 8: 3154.
- Marisa Arias, Ana de la Torre, Linda Dixon, Carmina Gallardo, Ferran Jori, Alberto Laddomada, Carlos Martins, R.Michael Parkhouse, Yolanda Revilla, Fernando Rodriguez and Jose Manuel Sanchez – Vizcaino, 2017. Approaches and perspectives for development of African swine fever virus vaccines. *Vaccines* 2017,5,35:doi:10.3390/Vaccines5040035.
- Natasha N. Gaudreault and Juergen A. Richt, 2019. Subunit vaccine approaches for African swine fever virus. *Journal of Virology*, Vol 6, No 56.
- SOP/cisa/asf/vi/, 2018. Procedure for african swine fever virus (ASFV) isolation on porcine leucocytes and hemadsorption test. (<https://asf-referencelab.info/asf>).
- Yolanda Revilla; Daniel Perez-Nunez, Juergen A. Richt, 2017. ASFV Biology and Vaccine Approaches. *Advances in Virus Research*, ISSN 0065 – 3527.<https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2017.10.002>.
- Serada.A.D, A.S.Kazakova, A.R. Imatdinov, D.V.Kolbasov, 2015. Humoral and cell immune mechanisms under African swine fever. *Agriculture Biology*. 2015, V.50, No 6, pp 709-718.

Ngày nhận 13-6-2021

Ngày phản biện 15-7-2021

Ngày đăng 1-11-2021