

SO SÁNH CHẤT LƯỢNG VACXIN ĐA GIÁ VÔ HOẠT BỔ TRỢ KEO PHÈN VÀ BỔ TRỢ NHŨ DẦU CHẾ TẠO PHÒNG BỆNH VIÊM PHỔI CHO LỢN

Cù Hữu Phú, Đỗ Tất Đạt, Lương Thị Hương Giang
Công ty Marphavet

TÓM TẮT

Bộ giống vi khuẩn (master seed) bao gồm: 3 chủng *A. pleuropneumoniae*, 2 chủng *P. multocida* và 1 chủng *S. suis* được Cục Thú y cho phép sử dụng để sản xuất và lưu hành vacxin viêm phổi đa giá vô hoạt bổ trợ keo phèn tại công ty Marphavet cũng đã được sử dụng để chế tạo vacxin viêm phổi đa giá vô hoạt có bổ trợ nhũ dầu phòng bệnh viêm phổi ở lợn.

Cả 2 loại vacxin đã chế tạo (có chất bổ trợ keo phèn và nhũ dầu) đều đạt chất lượng: vô trùng 100%, an toàn 100% khi kiểm tra trên chuột và trên lợn. Hiệu lực phòng bệnh của cả 2 loại vacxin trên chuột bằng phương pháp miễn dịch thụ động đạt trên 80,0% khi công cường độc. Bằng phương pháp ELISA, đã xác định được cả 2 loại vacxin trên đều kích thích lợn sản sinh kháng thể kháng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* serotype 2 và 5 với hiệu giá cao sau 21 ngày tiêm vacxin ở lợn từ 4 tuần tuổi, hiệu giá kháng thể của vacxin nhũ dầu cao hơn hiệu giá kháng thể của vacxin keo phèn.

Từ khóa: chủng giống, chất bổ trợ nhũ dầu, chất bổ trợ keo phèn, vacxin vô hoạt, đa giá.

Comparing the quality of the aluminium hydroxide and oil emulsion adjuvant, inactivated multivalent vaccines against pneumoniae in swine

Cu Huu Phu, Do Tat Dat, Luong Thi Huong Giang

SUMMARY

In this research, the master seed bacteria strains, including three strains of *A. pleuropneumoniae*, two strains of *P. multocida* and one strain of *S. suis* were approved by Department of Animal Health to produce the aluminum hydroxide adjuvant, inactivated multivalent vaccine, they were also used to develop an inactivated multivalent vaccine with oil emulsion adjuvant to prevent pneumoniae in swine.

Both vaccines (with aluminium hydroxide and oil emulsion adjuvant) were found to be good quality with 100% sterility and 100% safety, which was proved through the experimental tests on mice and pigs. Both vaccines passed the potency test with a protection rate of 80% on mice, using challenge method.

Using ELISA technique, it was detected that both vaccines stimulated the pigs in producing antibodies to *A. pleuropneumoniae* serotypes 2 and 5 with high titers after 21 days of vaccination in pigs from four weeks of age. The antibody titer of oil emulsion adjuvant vaccine was higher than that of the aluminium hydroxide adjuvant vaccine.

Keywords: master seed, oil emulsion adjuvant, aluminium hydroxide adjuvant, inactivated multivalent vaccine.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh viêm phổi do vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* và *P. multocida* gây ra, đã gây chết rất nhiều lợn ở các lứa tuổi tại các cơ sở chăn nuôi. Trong các vụ dịch tai xanh (PRRS) ở lợn

xuất hiện tại các địa phương, các nghiên cứu đã công bố cho thấy, lợn mắc bệnh tai xanh bị chết chủ yếu là do các vi khuẩn, virus khác gây nên, trong số đó nhóm vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* và *P. multocida*, đặc biệt là vi khuẩn

A. pleuropneumoniae là nguyên nhân quan trọng gây chết lợn trong các ổ dịch tai xanh trên phạm vi cả nước. Chính vì vậy, việc nghiên cứu, chế tạo vaccin đa giá phòng bệnh viêm phổi ở lợn do 3 vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* và *P. multocida* gây ra là rất cấp thiết, nhằm giảm tổn thất cho người chăn nuôi lợn tại nước ta, không chỉ đối với bệnh viêm phổi, mà với cả các đàn lợn bị mắc bệnh tai xanh.

Ở nước ta, hiện chỉ có công ty Marphavet đã được phép chế tạo vaccin viêm phổi đa giá, vô hoạt có bổ trợ keo phèn và vaccin này được phép lưu hành phòng bệnh cho lợn trên phạm vi cả nước. Vaccin đa giá được chế tạo sử dụng phòng bệnh viêm phổi cho lợn từ 4 tuần tuổi do 3 loại vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* (*S. suis*) và *P. multocida* gây ra. Việc nghiên cứu chế tạo vaccin đa giá vô hoạt có bổ trợ nhũ dầu sẽ tăng hiệu lực phòng bệnh của vaccin, còn kéo dài hơn thời gian miễn dịch của vaccin ở lợn được tiêm phòng. Trong báo cáo gần đây, chúng tôi đã công bố kết quả nghiên cứu chế tạo vaccin viêm phổi đa giá vô hoạt nhũ dầu phòng bệnh viêm phổi cho lợn từ 3 loại vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*, *S. suis* và *P. multocida*. Vaccin viêm phổi nhũ dầu thử nghiệm đã được đánh giá về chất lượng là: an toàn 100,0% trên chuột và lợn, có hiệu lực phòng bệnh trên 80,0% khi được công cường độc. Chính vì vậy, sử dụng phương pháp ELISA, chúng tôi tiến hành so sánh hiệu giá kháng thể kháng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* được hình thành ở lợn sau 21 ngày được tiêm 2 loại vaccin viêm phổi có bổ trợ keo phèn và bổ trợ nhũ dầu. Kết quả nghiên cứu này bước đầu nhằm đánh giá hiệu lực phòng bệnh của vaccin viêm phổi nhũ dầu, cũng như bổ sung cơ sở khoa học cho việc nghiên cứu, sản xuất và lưu hành 2 loại vaccin viêm phổi đa giá vô hoạt phòng bệnh cho các đối tượng lợn khác nhau (lợn nái, lợn đực giống, lợn thịt) nuôi ở nước ta.

II. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung

- Sử dụng bộ giống vi khuẩn sản xuất vaccin vô hoạt có bổ trợ keo phèn đã được phép lưu hành (*A. pleuropneumoniae*, *S. suis* và *P. multocida*) để chế tạo thử nghiệm vaccin bổ trợ nhũ dầu (IMS 1313) phòng bệnh viêm phổi ở lợn.

- So sánh chất lượng vaccin viêm phổi đa giá vô hoạt keo phèn và nhũ dầu chế tạo bao gồm: vô hoạt, an toàn và hiệu lực của 2 loại vaccin (bằng phương pháp bảo hộ thụ động trên chuột và ELISA) qua việc xác định hiệu giá kháng thể hình thành ở lợn ≥ 4 tuần tuổi sau 21 ngày tiêm 2 loại vaccin khác nhau.

2.2. Vật liệu

* Vi khuẩn sử dụng làm Master seed sản xuất vaccin viêm phổi lợn đa giá được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu phát triển vaccin. Gồm có:

- Vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2, 5a và 5b.

- Vi khuẩn *Pasteurella multocida* serotype A và D

- Vi khuẩn *Streptococcus suis* serotype 2.

* Môi trường, hóa chất dùng trong nghiên cứu, sản xuất vaccin đa giá phòng viêm phổi ở lợn

- Các loại môi trường dùng để nuôi cấy, lưu giữ vi khuẩn do hãng Oxoid (Anh) và Merck (Pháp) sản xuất: Môi trường nước thịt, thạch thường, thạch máu, thạch MacConkey, thạch Chocolate, BHI broth, BHI agar, TSB ...

- Chất bổ trợ NAD do hãng Oxoid (Anh) sản xuất.

- Bổ trợ keo phèn

- Chất bổ trợ nhũ dầu Nano (IMS 1313) của công ty Seppic- CHLB Đức.

* Kít ELISA:

Hóa chất được cung cấp trong bộ Kít

STT	Tên hóa chất
1	Đĩa đã gắn kháng nguyên APP 2/5
2	Conjugate (10X)
3	Đối chứng dương
4	Đối chứng âm
5	Dilution Buffer 2
6	Dilution Buffer 19
7	Đệm rửa (20X)
8	Cơ chất
9	Stop solution (0.5M)

- Tên bộ Kit: ID Screen APP 2,5 Indirect

- Hãng sản xuất: ID.vet Innovative Diagnostics

- Micro pipet, pipet đa kênh, đầu tip, giấy khô, giấy bạc, ống Falcon, túi đựng đồ bẩn.

- Thiết bị ELISA: Máy ủ, máy đọc kết quả, máy tính.

* Động vật thí nghiệm;

- Chuột nhắt trắng: 18- 20 gram/con

- Lợn trên 4 tuần tuổi âm tính với kháng thể kháng *A. pleuropneumoniae*, *S. suis* và *P. multocida* (không tiêm vaccin hoặc nhiễm bệnh tự nhiên).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp chế tạo thử nghiệm vaccin phòng bệnh viêm phổi cho lợn

Các chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* và *S. suis* được nuôi cấy riêng rẽ trên các loại môi trường khác nhau và được lên men sục khí bằng hệ thống lên men 10 lít và 120 lít của hãng Satoryus- CHLB Đức. Sau lên men sục khí 8-10 giờ, tiến hành lấy mẫu kiểm tra thuần khiết bằng phương pháp nhuộm Gram và ria cấy trên các loại môi trường kiểm tra, đồng thời xác định đậm độ kháng nguyên vi khuẩn trong 1 ml canh trùng bằng phương pháp đếm số khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch và đo độ đục. Sau đó tiến hành vô hoạt vi khuẩn nuôi cấy bằng Formol với tỷ lệ 0,3%.

2.3.2. Chuẩn bị các loại kháng nguyên và bán thành phẩm

* Kiểm tra vô trùng và đậm độ:

Từ mỗi lô vaccin, tiến hành kiểm tra vô trùng trên các loại môi trường nuôi cấy vi khuẩn thích hợp như môi trường thạch thường, thạch máu, thạch TSA (có bổ trợ YE), thạch MacConkey, nước thịt thường, nước thịt TYE, nước thịt gan yếm khí, thạch nấm. Các ống môi trường, sau khi cấy được bồi dưỡng ở tủ ấm 37°C có bổ sung 5 % CO₂, riêng thạch nấm thì để ở nhiệt độ phòng. Mỗi ngày đọc kết quả 1 lần.

Nếu sau 7 ngày không có bất cứ một loại vi khuẩn nào mọc trên các môi trường thì vaccin được coi là đạt tiêu chuẩn vô trùng.

Sau khi vô hoạt vi khuẩn trong canh trùng thu được bằng formol với tỷ lệ 0,3%, tiến hành kiểm tra vô trùng trên các loại môi trường nước thịt, thạch máu và nước thịt yếm khí.

Sau khi chế tạo, vaccin được kiểm nghiệm chất lượng theo tiêu chuẩn 10 TCN 160-92 và 10 TCN 161-92 (2003) theo Quy trình kỹ thuật kiểm nghiệm vaccin dùng trong Thú y của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2003).

2.3.3. Phương pháp xác định kháng thể bằng ELISA

Đề các hóa chất và mẫu huyết thanh ở nhiệt độ phòng (21°C ± 5°C) trong 30 phút trước khi tiến hành thí nghiệm. Các ống chứa mẫu huyết thanh và các ống đối chứng cần được trộn đều bằng máy vortex và spin nhanh trước khi tiến hành các phản ứng. Pha loãng Wash solution từ 20X xuống 1X.

Bước 1: Nhỏ 100 µl đối chứng âm, 100 µl đối chứng dương vào các giếng đối chứng. Nhỏ 250 µl dilution buffer 2 và 5 µl mỗi mẫu huyết thanh vào các giếng còn lại.

Bước 2: Ủ 30 phút ± 3 phút ở nhiệt độ phòng 21°C ± 5°C.

Bước 3: Chuẩn bị 1X Conjugate bằng cách pha loãng Conjugate 10X với tỉ lệ 1/10 trong Dilution buffer 19.

Bước 4: Đồ bỏ dịch. Rửa mỗi giếng 3 lần bằng 1X Wash solution (300 µl/ giếng) sử dụng pipet đa kênh. Tránh để giếng khô giữa các lần rửa. Ở lần rửa cuối, đảo ngược giếng rồi vỗ mạnh vào giấy khô.

Bước 5: Bỏ sung 100 µl 1X conjugate vào mỗi giếng. Ủ 30 phút ± 3 phút ở nhiệt độ phòng 21°C ± 5°C.

Bước 6: Lặp lại bước 4.

Bước 7: Bỏ sung 100 µl cơ chất vào mỗi giếng. Ủ 15 phút ± 2 phút ở nhiệt độ phòng 21°C ± 5°C trong tối (phủ giấy bạc kín các giếng).

Bước 8: Thêm 100 µl Stop solution vào mỗi giếng. Đọc kết quả OD ở bước sóng 450nm.

Kết quả : Kết quả có ý nghĩa khi:

- Giá trị OD của đối chứng dương lớn hơn 0.35: OD(PC) > 0.350

- Tỷ số giá trị OD của chứng dương và chứng âm nhỏ hơn 0.3: OD (NC)/OD (PC) < 0.3

- S/P % = [(OD mẫu – OD chứng âm) / (OD chứng dương – OD chứng âm)] * 100

S/P	Kết quả
S/P % < 30 %	Âm tính
30% ≤ S/P % < 40 %	Nghi ngờ
S/P % ≥ 40 %	Dương tính

Lưu ý:

- Conjugate, các ống đối chứng, cơ chất phải được giữ trong đá gel hoặc đá bào (5°C ± 3°C) trong quá trình thao tác.

- Các hóa chất khác có thể giữ ở 2°C và 26°C.

2.3.4. Phương pháp kiểm tra hiệu lực của 2 loại vaccin trên chuột nhắt trắng bằng phương pháp thay thế

Huyết thanh của lợn sau khi tiêm vaccin 21 ngày, sử dụng để miễn dịch thụ động cho 35 chuột khỏe mạnh bằng đường tiêm dưới da, với liều 0,2ml huyết thanh lợn/con và 30 chuột đối chứng tiêm 0,2ml nước thịt TYE vào dưới da. Sau 24 giờ

tiêm huyết thanh lợn được miễn dịch, tiến hành thử thách cường độc với canh khuẩn của từng chủng vi khuẩn sử dụng chế vaccin gồm 3 chủng *A. pleuropneumoniae* type 2, 5a, 5b; 2 chủng *P. multocida* type A và D và 1 chủng *S. suis* type 2. Mỗi chủng vi khuẩn công cường độc cho 5 chuột đã tiêm vaccin chứa 10 LD₅₀ có trong 0,2ml. Theo dõi trong 7 ngày, lô vaccin được đánh giá đạt hiệu lực trong phương pháp miễn dịch thụ động khi chuột ở lô đối chứng (30 con) không tiêm vaccin chết hết sau khi công cường độc, còn chuột trong lô thí nghiệm (30 con tiêm huyết thanh) sau khi công cường độc, số chuột sống còn phải là 3/5 con, là đạt yêu cầu. 5 chuột tiêm huyết thanh lợn miễn dịch không công cường độc phải đảm bảo 5/5 khỏe mạnh (tổng số 65 chuột).

- Lô thí nghiệm: 30 chuột, tiêm huyết thanh lợn sau tiêm vaccin 21 ngày, mỗi mẫu huyết thanh tiêm cho 5 chuột; 0,2 ml/con, tiêm dưới da.

- Lô đối chứng 1: 30 chuột, tiêm nước sinh lý, liều tiêm và đường tiêm tương tự.

- Lô đối chứng 2: 5 chuột, tiêm huyết thanh lợn sau tiêm vaccin 21 ngày; 0,2 ml/con, tiêm dưới da.

- 24 giờ sau khi tiêm huyết thanh, tiêm canh trùng cường độc của các chủng vi khuẩn cho cả 2 lô chuột (lô thí nghiệm và lô đối chứng 1), mỗi chủng vi khuẩn tiêm cho 5 chuột ở mỗi lô; 0,5 ml/con, tiêm phúc xoang. Theo dõi thời gian gây chết chuột.

2.3.5. Phương pháp xác định liều LD₅₀

$$\text{Lg LD}_{50} = \text{Lg A} + \frac{a - 50}{a - b} \times d$$

Trong đó:

A: Là nồng độ pha loãng gây chết sát 50% chuột.

a: Là tỷ lệ chuột chết do liều A gây ra (%) (cộng dồn)

b: Là tỷ lệ chuột chết do liều B gây ra (%) (cộng dồn) với B là nồng độ pha loãng gây chết sát dưới 50% chuột

d: Lg của nồng độ pha loãng.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả theo dõi các lô lên men sục khí

Sau khi kháng nguyên chế tạo vaccin được sản xuất, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra độ thuần khiết bằng phương pháp nhuộm tiêu bản

và kiểm tra dưới kính hiển vi.

Chúng tôi đã tiến hành kiểm tra vô trùng bằng phương pháp nuôi cấy trên các loại môi trường. Kết quả tổng hợp được trình bày ở bảng 1 và 2.

Bảng 1. Kết quả kiểm tra vô trùng của canh trùng sử dụng chế tạo vaccin

TT	Lô vaccin	Kết quả kiểm tra			Đánh giá
		Nước thịt BHI	Thạch máu	Nước thịt yếm khí	
1	<i>A. pleuropneumoniae</i>	Không mọc	Không mọc	Không mọc	Đạt
2	<i>P. multocida</i>	Không mọc	Không mọc	Không mọc	Đạt
3	<i>S. suis</i>	Không mọc	Không mọc	Không mọc	Đạt

Bảng 2. Kết quả kiểm tra một số chỉ tiêu của canh trùng sử dụng chế tạo vaccin

TT	Lô vaccin	Chỉ tiêu kiểm tra	
		Đậm độ ($\times 10^9$ vk/ml)	Thuần khiết
1	<i>A. pleuropneumoniae</i>	11	Đạt
2	<i>P. multocida</i>	12	Đạt
3	<i>S. suis</i>	15	Đạt

Từ kết quả kiểm tra này cho thấy, cả 3 lô canh trùng đều đạt các chỉ tiêu cần thiết để có thể sử dụng làm vaccin.

Sau khi đã kiểm tra 3 lô canh trùng chế tạo được đều đạt các tiêu chuẩn chế vaccin, tiến hành phối trộn 3 loại canh trùng với nhau theo tỷ lệ phù hợp để đạt được một hỗn hợp canh trùng đồng nhất, rồi bổ sung chất bổ trợ vaccin tùy từng loại khác nhau; Vaccin có bổ trợ keo phèn với tỷ lệ 20% (4 phần canh trùng + 1 phần keo

phèn), vaccin nhũ dầu với tỷ lệ 25% (3 phần canh trùng + 1 phần nhũ dầu IMS 1313) để đảm bảo trong 2 ml vaccin có chứa ≥ 4 tỷ kháng nguyên vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*, ≥ 4 tỷ kháng nguyên vi khuẩn *Pasteurella multocida* và ≥ 4 tỷ kháng nguyên vi khuẩn *Streptococcus suis*.

** Kiểm tra vô trùng vaccin bán thành phẩm:*

Kết quả kiểm tra vô trùng 2 lô vaccin bán thành phẩm có bổ trợ keo phèn và bổ trợ nhũ dầu được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra vô trùng của vaccin bán thành phẩm chế tạo

TT	Lô vaccin	Kết quả kiểm tra			Đánh giá
		Nước thịt BHI	Thạch máu	Nước thịt yếm khí	
1	Lô I: Vaccin keo phèn	Không mọc	Không mọc	Không mọc	Đạt
2	Lô II: Vaccin nhũ dầu	Không mọc	Không mọc	Không mọc	Đạt

Từ mỗi lô vaccin, tiến hành kiểm tra vô trùng trên các loại môi trường nuôi cấy vi khuẩn thích hợp, sau 7 ngày không có bất cứ

một loại vi khuẩn, nấm nào mọc trên các môi trường, như vậy vaccin được coi là đạt tiêu chuẩn vô trùng.

Vaccin được ra chai, đóng nút, dán nhãn, sau đó tiến hành lấy mẫu để kiểm tra an toàn trên động vật thí nghiệm dựa vào quy trình kiểm nghiệm vaccin dùng trong Thú y của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

3.2. Kết quả kiểm tra chỉ tiêu an toàn của vaccin trên chuột nhắt trắng

Mỗi một loại vaccin chế tạo (keo phèn và nhũ dầu): Chọn 10 chuột khỏe mạnh, tiêm vaccin với liều 0,5 ml/con. Vaccin keo phèn tiêm phúc xoang, còn vaccin nhũ dầu tiêm vào bắp đùi. Theo dõi chuột trong vòng 10 ngày. Kết quả thu được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả kiểm tra an toàn của vaccin trên chuột nhắt trắng

Lô TN	Số chuột tiêm (con)	Liều tiêm (ml)	Đường tiêm	Số chuột sống (con)	Số chuột chết (con)	Thời gian theo dõi
1	10	0,5	Phúc xoang	10	0	10 ngày
2	10	0,5	Bắp đùi	10	0	10 ngày

Kết quả cho thấy: tất cả chuột được tiêm 2 loại vaccin đều sống khỏe mạnh, không con nào có biểu hiện phản ứng sau khi tiêm qua 10 ngày theo dõi. Điều này khẳng định rằng vaccin được chế tạo đã đạt yêu cầu về chỉ tiêu an toàn 100% trên chuột nhắt trắng.

3.3. Kết quả kiểm tra chỉ tiêu an toàn và hiệu lực của vaccin

Sau khi tiến hành lấy máu để xác định âm tính với kháng thể trong máu lợn kháng với *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* và *S. suis* của đàn lợn thí nghiệm 13 con, từ 30 – 35 ngày tuổi, chúng tôi đã tiến hành chia lô và tiêm vaccin cho lợn như sau:

- Lô thí nghiệm 1: 5 lợn, đánh số tai từ TN1 đến TN5, tiêm vaccin đa giá vô hoạt có bổ trợ keo phèn, 2 ml/con, tiêm dưới da sau hốc tai.

- Lô thí nghiệm 2: 5 lợn, đánh số tai từ TN6 đến TN10, tiêm vaccin đa giá vô hoạt có bổ trợ nhũ dầu, 2 ml/con, tiêm bắp thịt sau hốc tai.

- Lô thí nghiệm đối chứng: 3 lợn, đánh số tai TN11 đến TN13, tiêm nước sinh lý, liều tiêm và đường tiêm tương tự.

Lợn thí nghiệm ở lô 1 và lô 2 được tiêm vaccin viêm phổi đa giá bổ trợ keo phèn và nhũ dầu đều đạt tiêu chuẩn an toàn 100%. Lợn tiêm vaccin đều khỏe mạnh, không bị phản ứng phụ

sau khi tiêm vaccin.

Sau 21 ngày tiêm vaccin, tiến hành lấy máu, chất huyết thanh tất cả 13 con, tiếp tục xác định hiệu giá kháng thể 2 loại vaccin.

3.3.1. Kết quả kiểm tra hiệu lực của 2 loại vaccin trên chuột nhắt trắng bằng phương pháp thay thế

* Vaccin có bổ trợ keo phèn:

Kết quả thu được trình bày ở bảng 5.

Huyết thanh của lợn sau khi tiêm vaccin bổ trợ keo phèn 21 ngày, sử dụng để miễn dịch thụ động cho chuột khỏe mạnh bằng đường tiêm dưới da. Sau 24 giờ tiêm huyết thanh, lợn được miễn dịch, tiến hành thử thách cường độc với canh khuẩn của từng chủng vi khuẩn sử dụng chế vaccin như mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy ở lô thí nghiệm, chuột sau khi được tiêm huyết thanh miễn dịch của lợn được công cường độc với liều 10 LD₅₀, chỉ có 1/5 chuột ở lô công cường độc với chủng *A. pleuropneumoniae* type 5a và 1/5 chuột ở lô công cường độc bằng chủng *P. multocida* type A là bị chết sau 48 giờ, đạt tỷ lệ bảo hộ từ 80%. Trong khi đó, chuột ở lô đối chứng 1 sau khi công bằng các chủng *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* và *S. suis* bị chết 100% trong vòng 24

Bảng 5. Kết quả kiểm tra hiệu lực vaccin bổ trợ keo phen trên chuột bằng phương pháp thay thế

Lô chuột	Loại canh trùng tiêm	Số lượng chuột chết (con)	Thời gian chết chuột (giờ)
Thí nghiệm	<i>A.pp</i> type 2	0/5	
	<i>A.pp</i> type 5a	1/5	48
	<i>A.pp</i> type 5b	0/5	
	<i>P. multocida</i> type A	1/5	48
	<i>P. multocida</i> type D	0/5	
	<i>S. suis</i> type 2	0/5	
Đối chứng 1	<i>A.pp</i> type 2	5/5	24
	<i>A.pp</i> type 5a	5/5	24 - 48
	<i>A.pp</i> type 5b	5/5	24 - 72
	<i>P. multocida</i> type A	5/5	24
	<i>P. multocida</i> type D	5/5	24
	<i>S. suis</i> type 2	5/5	24
Đối chứng 2	Không	0/5	

- 48 giờ. Với 5 chuột ở lô đối chứng 2 chỉ tiêm huyết thanh lợn miễn dịch, không công cường độc thì đều khỏe mạnh sau 7 ngày theo dõi.

** Vaccin có bổ trợ nhũ dầu:*

Huyết thanh của lợn sau khi tiêm vaccin bổ trợ nhũ dầu 21 ngày, sử dụng để miễn dịch thụ

động cho chuột khỏe mạnh bằng đường tiêm dưới da. Sau 24 giờ tiêm huyết thanh, lợn được miễn dịch, tiến hành thử thách cường độc với canh khuẩn của từng chủng vi khuẩn sử dụng chế vaccin như mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả kiểm tra hiệu lực vaccin bổ trợ nhũ dầu trên chuột bằng phương pháp thay thế

Lô chuột	Loại canh trùng tiêm	Số lượng chuột chết (con)	Thời gian chết chuột (giờ)
Thí nghiệm	<i>A.pp</i> type 2	0/5	
	<i>A.pp</i> type 5a	1/5	48
	<i>A.pp</i> type 5b	0/5	
	<i>P. multocida</i> type A	0/5	
	<i>P. multocida</i> type D	0/5	
	<i>S. suis</i> type 2	0/5	
Đối chứng 1	<i>A.pp</i> type 2	5/5	24
	<i>A.pp</i> type 5a	5/5	48
	<i>A.pp</i> type 5b	5/5	48- 72
	<i>P. multocida</i> type A	5/5	48
	<i>P. multocida</i> type D	5/5	24
	<i>S. suis</i> type 2	5/5	72
Đối chứng 2	Không	0/5	

Kết quả ở bảng 6 cho thấy ở lô thí nghiệm, chuột sau khi được tiêm huyết thanh miễn dịch của lợn tiêm vaccin bổ trợ nhũ dầu được công cường độc với liều 10 LD₅₀, chỉ có 1/5 chuột ở lô công cường độc với chủng *A. pleuropneumoniae* type 5a là bị chết sau 48 giờ, đạt tỷ lệ bảo hộ từ 80%. Trong khi đó, chuột ở lô đối chứng 1 sau khi công bằng các chủng *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* và *S. suis* bị chết 100% trong vòng 24 - 72 giờ. Với 5 chuột ở lô đối chứng 2 chỉ tiêm huyết thanh lợn miễn dịch, không công cường độc thì đều khỏe mạnh sau 7 ngày theo dõi.

So sánh khả năng bảo hộ của 2 loại vaccin bổ trợ keo phèn và bổ trợ nhũ dầu bằng phương pháp bảo hộ thụ động trên chuột cho thấy khả năng bảo hộ của vaccin bổ trợ nhũ dầu tốt hơn vaccin bổ trợ keo phèn.

3.3.2. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể của vaccin trên lợn bằng phương pháp ELISA

Huyết thanh của lợn sau khi tiêm vaccin 21 ngày, sử dụng để xác định hàm lượng kháng thể hình thành trong máu sau khi tiêm vaccin 21 ngày. Kết quả được thể hiện ở bảng 7.

Bảng 7. Kết quả kiểm tra hiệu lực vaccin bổ trợ keo phèn và nhũ dầu bằng phương pháp ELISA

TT	Số tai	Loại vaccin	Đường tiêm	Liều tiêm	Serotype 2		Đánh giá	Serotype 5		Đánh giá
					OD450	S/P		OD450	S/P	
1	TN1	Keo phèn	Dưới da	2ml	0.712	40.39287907	+	0.591	40.14481094	+
2	TN2	Keo phèn	Dưới da	2ml	0.47	42.91539246	+	1.421	106.918745	+
3	TN3	Keo phèn	Dưới da	2ml	1.215	118.8583078	+	0.54	36.0418343	+
4	TN4	Keo phèn	Dưới da	2ml	0.633	59.53109072	+	0.59	40.0643604	+
5	TN5	Keo phèn	Dưới da	2ml	0.441	39.95923	+	0.112	5.720339	+
6	TN6	Nhũ dầu	Bắp	2ml	1.795	184.0042373	+	2.365	244.3855932	+
7	TN7	Nhũ dầu	Bắp	2ml	1.361	138.029661	+	1.53	155.9322034	+
8	TN8	Nhũ dầu	Bắp	2ml	1.53	155.9322034	+	1.265	127.8601695	+
9	TN9	Nhũ dầu	Bắp	2ml	1.265	127.8601695	+	1.361	138.029661	+
10	TN10	Nhũ dầu	Bắp	2ml	2.365	244.3855932	+	1.795	184.0042373	+
11	TN11	Nước thịt	Dưới da	2ml	0.043	Âm tính	-	0.045	-0.84856	-
12	TN12	Nước thịt	Dưới da	2ml	0.047	Âm tính	-	0.049	-0.58747	-
13	TN13	Nước thịt	Dưới da	2ml	0.048	Âm tính	-	0.052	-0.39164	-
14	Đối chứng dương				1.03			1.002		
15	Đối chứng âm				0.054			0.058		

Kết quả ở bảng 7 cho thấy: tất cả 10 lợn được tiêm vaccin viêm phổi đa giá đều dương tính với kháng thể kháng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* serotype 2 và 5. Trong khi đó lợn đối chứng đều âm tính với kháng thể này.

Kết quả cũng cho thấy: hàm lượng kháng thể kháng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* serotype 2 và 5 ở lợn được tiêm vaccin viêm phổi đa giá có bổ trợ nhũ dầu cao hơn nhiều so với 5 lợn được

tiêm vaccin viêm phổi đa giá có bổ trợ keo phèn.

Kết quả này bước đầu cho thấy sự khác biệt khả năng hình thành kháng thể ở lợn được tiêm hai loại vaccin bổ trợ keo phèn và bổ trợ nhũ dầu. Do đó cần tiếp tục nghiên cứu với số lượng mẫu nhiều hơn và thời gian miễn dịch kéo dài hơn để đánh giá về khả năng bảo hộ của 2 loại vaccin bổ trợ keo phèn và bổ trợ nhũ dầu đối với lợn được tiêm vaccin phòng bệnh.

IV. KẾT LUẬN

Từ kết quả bước đầu thu được về vaccin viêm phổi đa giá bổ trợ nhũ dầu, chúng tôi có các kết luận sau:

Đã chế tạo được vaccin viêm phổi đa giá vô hoạt bổ trợ nhũ dầu - IMS 1313 từ bộ giống vi khuẩn chế tạo vaccin viêm phổi đa giá vô hoạt bổ trợ keo phèn tại nhà máy vaccin thuộc Công ty Marphavet (3 chủng *A. pleuropneumoniae*, 2 chủng *P. multocida* và 1 chủng *S. suis*).

Vaccin viêm phổi đa giá có bổ trợ keo phèn và bổ trợ nhũ dầu chế tạo thử nghiệm đảm bảo tiêu chuẩn chất lượng: vô trùng 100%; an toàn 100% trên chuột và trên lợn. Hiệu lực phòng bệnh của cả 2 loại vaccin trên chuột bằng phương pháp miễn dịch thụ động đạt trên 80,0% khi công cường độc bằng phương pháp miễn dịch thụ động trên chuột.

Vaccin chế tạo có bổ trợ keo phèn và bổ trợ nhũ dầu chế tạo thử nghiệm đều kích thích lợn sản sinh kháng thể kháng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* serotype 2 và 5 với hiệu giá cao sau 21 ngày tiêm vaccin cho lợn từ 4 tuần tuổi. Hiệu giá kháng thể của vaccin nhũ dầu cao hơn hiệu giá kháng thể của vaccin keo phèn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Báo cáo tổng hợp kết quả khoa học công nghệ dự án sản xuất thử nghiệm độc lập cấp Nhà nước: Hoàn thiện quy trình sản xuất vaccin phòng bệnh viêm phổi lợn do *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus* và *Pasteurella multocida* gây ra- 2013.
2. Cục Thú y (2017). Quy trình kiểm nghiệm vaccin dùng trong thú y, truy cập tại <http://tusachluat.vn/ViewFullText/Id/cc6eec04-c083-4e05-abae-e14dea7bb99a>
3. Hồ sơ đăng ký lưu hành thuốc thú y: Sản phẩm: MAR-APPSVAC (vaccin viêm phổi lợn đa giá)- 2015.
4. Cù Hữu Phú và cs. (2011). “Nghiên cứu mối liên quan giữa hội chứng rối loạn hô hấp, sinh sản ở lợn (PRRS) với vi khuẩn gây bệnh kế phát và xác định biện pháp phòng, trị bệnh”, Báo cáo kết quả đề tài độc lập cấp Nhà nước.
5. Ahn, D.C. and Kim, B.H. (1994). Toxigenicity and capsular serotypes of *Pasteurella multocida* isolated

from pneumonic lungs of slaughter pigs, *Proc.Int. Pig.Vet. Soc Congr*, p. 165.

6. Chang, Y.F., Shi, J.R., Ma, D.P., Shin, S.J. and Lein, D.H. (1993). Molecular analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX Toxin-III gene cluster, *DNA Cell Biol.* 12: 351-362.
7. Chang, C.F., Yeh, T.M., Chou, C.C., Chang, Y.F. and Chiang, T.S. (2002). Antimicrobial susceptibility and plasmid analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in Taiwan, *Vet Microbiol* 3, 84(1-2): 169-177.
8. Fittipaldi, N., Segura, M., Grenier, D. and Gottschalk, M. (2012). Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*, *Future Microbiol.* 7(2): 259-279.
9. Frey, J. (1995). Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins, *Trends Microbiol.* Jul, 3(7): 257-261.
10. Gram, T., Ahrens, P., Andreasen, M. and Nielsen, J.P. (2000). An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes- evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs, *Vet. Microbiol.* 75: 43-57.
11. Hill, J.E., Gottschalk, M., Brousseau, R., Harel, J., Hemmingsen, S.M. et al. (2005). Biochemical analysis, *cpn60* and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol* 107: 63-69. doi:10.1016/j.vetmic.2005.01.003. PubMed: 15795078.
12. Iwanmatsu, S. and Sawada, T. (1988). Relationship between serotypes, dermonecrotic toxin production of *Pasteurella multocida* isolation and pneumonic lesions of porcine lungs, *Jpn J Vet Sci*, 50: 1200-1206.
13. Liu, J., Chen, X., Tan, C., Guo, Y., Chen, Y., Fu, S., Bei, W. and Chen, H. (2009). *In vivo* induced RTX toxin *ApxIVA* is essential for the full virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Vet Microbiol*, 137(3-4): 282-289.
14. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R. (1994). The Streptococci and related cocci. In: Quinn PJ, et al, editors. Clinical veterinary microbiology. London: Wolfe Publishing, Mosby-Year Book Europe Limited, p. 127-35.

Ngày nhận 24-10-2018

Ngày phản biện 26-12-2018

Ngày đăng 1-3-2019