

CHẾ TẠO VACXIN ĐA GIÁ VÔ HOẠT NHỮ DẦU PHÒNG BỆNH VIÊM PHỔI Ở LỢN DO VI KHUẨN *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* VÀ *Streptococcus suis* GÂY RA

Đỗ Tất Đạt¹, Cù Hữu Phú², Nguyễn Bá Hiên³

¹NCS Học viện Nông nghiệp Việt Nam; ²Hội Thú y Việt Nam

³Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: dtdat792015@gmail.com

Ngày nhận bài: 27.05.2019

Ngày chấp nhận đăng: 13.08.2019

TÓM TẮT

Nhằm tăng cường hiệu lực và độ dài miễn dịch phòng bệnh viêm phổi cho lợn do vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* và *S. suis* gây ra của vacxin viêm phổi đa giá bổ trợ keo phèn, chúng tôi đã sử dụng bộ giống vi khuẩn sản xuất vacxin viêm phổi bổ trợ keo phèn với công nghệ lên men sục khí và chất bổ trợ nhũ dầu - IMS1313. Đã chế tạo được vacxin viêm phổi đa giá vô hoạt có bổ trợ nhũ dầu sử dụng phòng bệnh viêm phổi cho lợn từ 4 tuần tuổi. Vacxin đã được kiểm nghiệm chất lượng đạt tỷ lệ an toàn trên chuột và trên lợn là 100%. Bằng phương pháp công cường độc đã xác định được tỷ lệ bảo hộ của vacxin trên lợn thí nghiệm đạt tỷ lệ trên 80,0%. Kết quả kiểm tra bằng phản ứng huyết thanh học cho thấy vacxin đạt hiệu giá kháng thể cao và kéo dài khi thử nghiệm trên lợn. Sau 4 tháng tiêm phòng, vacxin đạt hiệu giá kháng thể trung bình lớn hơn 4 log₂ với những dòng vi khuẩn *A. Pleuropneumoniae* serotype 2, 5a, 5b; *P. multocida* serotype A, D và *S. suis* type 2. Vacxin đa giá vô hoạt nhũ dầu chế tạo được đạt chất lượng tốt theo tiêu chuẩn Việt Nam.

Từ khoá: Vacxin, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, bổ trợ nhũ dầu IMS.

Production of Polyvalent Inactivated Vaccine with Oil Emulsion Adjuvant against Pneumonia Disease Caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis*

ABSTRACT

In this study, *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* and *S. suis* strains, previously used to produce polyvalent inactivated vaccine with aluminium hydroxide adjuvant against pneumonia disease caused by these bacteria in swine, were used with fermentation and oil emulsion adjuvant - IMS 1313. We have produced the polyvalent inactivated vaccine with oil emulsion adjuvant with higher potency and immunity to prevent pneumonia disease in swine from 4 weeks of age. The quality test showed that the safety of vaccine was 100% in mice and piglets. By the challenge testing, the protection rate of vaccine on experimental pigs was more than 80.0%. The serological test proved that vaccine achieved a high and prolonged antibody titre when tested on piglets. After 4 months of vaccination, the vaccine attained an average antibody titre greater than 4 log₂ with *A. pleuropneumoniae* serotype 2, 5a, and 5b; and *P. multocida* serotype A, D and *S. suis* type 2. The produced Polyvalent Inactivated Vaccine with Oil Emulsion Adjuvant is proved to be of high quality according to Vietnam's standards.

Keywords: Vaccine, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, IMS oil emulsion adjuvant.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh hô hấp phức hợp ở lợn (Porcine Respiratory Disease Complex - PRDC) do nhiều

mầm bệnh gây ra trong đó có cả sự kết hợp gây bệnh của virus và vi khuẩn. Trong số những vi khuẩn gây bệnh quan trọng, những vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* (A.

Chế tạo vaccin đa giá vô hoạt nhũ dầu phòng bệnh viêm phổi ở lợn do vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* và *Streptococcus suis* gây ra

pleuropneumoniae), *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) và *Streptococcus suis* (*S. suis*) thường gây viêm phổi phức hợp ở lợn, làm chết rất nhiều lợn ở các lứa tuổi (Ahn, 1994; Frey, 1995; Fittipaldi, 2012) đặc biệt quan trọng là lợn sau cai sữa gây tổn thất nặng nề cho ngành chăn nuôi lợn ở Việt Nam (Cù Hữu Phú, 2005). Vì vậy, việc nghiên cứu, chế tạo vaccin đa giá phòng bệnh hô hấp phức hợp ở lợn do những loại vi khuẩn này gây ra là rất cấp thiết.

Hiện nay trên thế giới đã có nhiều công ty khác nhau nghiên cứu chế tạo vaccin phòng PRDC cho lợn do vi khuẩn gây ra như vaccin Bayovac SuiShot APM-7 của hãng Bayer chế tạo là vaccin vô hoạt phòng bệnh hô hấp phức hợp cho lợn trên 5 tuần tuổi; vaccin Coglapix do độc tố Apx I, II, III của *A. pleuropneumoniae* serotype 5; vaccin Hyogen phòng viêm phổi địa phương do *M. hyopneumoniae*... Vaccin nhập ngoại đã và đang được sử dụng tại các trang trại chăn nuôi lợn ở trong nước nhưng giá thành cao, người chăn nuôi khó tiếp cận. Vaccin Bayovac suishot APM-7 của hãng Bayer chế tạo đã sử dụng 2 chủng *A. pleuropneumoniae* serotype 2, 5 và 2 chủng *P. multocida* type A và D; còn vaccin viêm màng phổi Coglapix chỉ sử dụng *A. pleuropneumoniae* serotype 5 và độc tố Apx I, II, III của chúng. Trong quá trình điều tra nghiên cứu vi khuẩn gây viêm phổi ở lợn của tác giả Cù Hữu Phú (2011; 2013), Nguyễn Thị Thu Hằng (2009), Lê Văn Dương (2012) đã xác định được những vi khuẩn gây bệnh hô hấp phức hợp ở lợn tại Việt Nam chủ yếu là do những vi khuẩn sau: (1) vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* gồm 3 chủng: 2, 5a, 5b; (2) vi khuẩn *P. multocida* gồm 2 chủng A, D và (3) vi khuẩn *S. suis* type 2. Đặc biệt với vi khuẩn *S. suis* type 2, ngoài gây bệnh cho lợn, chúng còn gây bệnh cho người qua vết thương hay ăn tiết canh lợn (Cục Y tế dự phòng, 2018).

Hiện tại ở Việt Nam chỉ có công ty Marphavet sản xuất và được phép lưu hành vaccin đa giá phòng bệnh hô hấp phức hợp ở lợn với chất bổ trợ là keo phèn cho lợn từ 4 tuần tuổi trở lên trên phạm vi cả nước. Vaccin được chế tạo là vaccin đa giá bao gồm cả 3 loại vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*, *S. suis* và *P. multocida* chủ yếu gây viêm phổi phức hợp ở lợn. (Cù Hữu

Phú, 2014). Tuy nhiên dùng bổ trợ keo phèn vẫn có những hạn chế nhất định vì hiệu lực và khả năng gây đáp ứng và độ dài miễn dịch chưa cao. Để khắc phục những nhược điểm chủ yếu này việc nghiên cứu quy trình sản xuất vaccin đa giá vô hoạt dùng bổ trợ nhũ dầu thay vì bổ trợ keo phèn là vấn đề đòi hỏi cần thiết hiện nay của sản xuất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Giống gốc master seed được lưu giữ tại Trung tâm Nghiên cứu phát triển vaccin gồm: Vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* serotype 2, 5a và 5b; Vi khuẩn *P. multocida* serotype A và D; vi khuẩn *S. suis* serotype 2. Bộ giống gốc này đã từng được sử dụng để sản xuất vaccin đa giá phòng bệnh hô hấp phức hợp ở lợn có bổ trợ keo phèn được phép lưu hành toàn quốc (Cù Hữu Phú, 2014). Nhóm vi khuẩn của bộ giống gốc có cấu trúc kháng nguyên ổn định, kháng nguyên tính cao, sản sinh các loại độc tố và độc lực cao (Hồ sơ đăng ký lưu hành thuốc thú y: Sản phẩm: MAR-APPSVAC - vaccin viêm phổi lợn đa giá, 2015). 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) cung cấp gồm: Môi trường nước thịt, thạch thường, thạch máu, thạch MacConkey, thạch Chocolate, BHI broth, BHI agar, TSB. Chất bổ trợ nhũ dầu - IMS 1313, trong đó thành phần của IMS 1313 gồm 2 phần chính là vi nhũ tương (micro-emulsion với các hạt nhũ có kích thước nano) và hợp chất kích thích miễn dịch (immunostimulating compound) cũng có kích thước nano của công ty Seppic (Anh).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chế tạo thử nghiệm vaccin phòng viêm phổi cho lợn

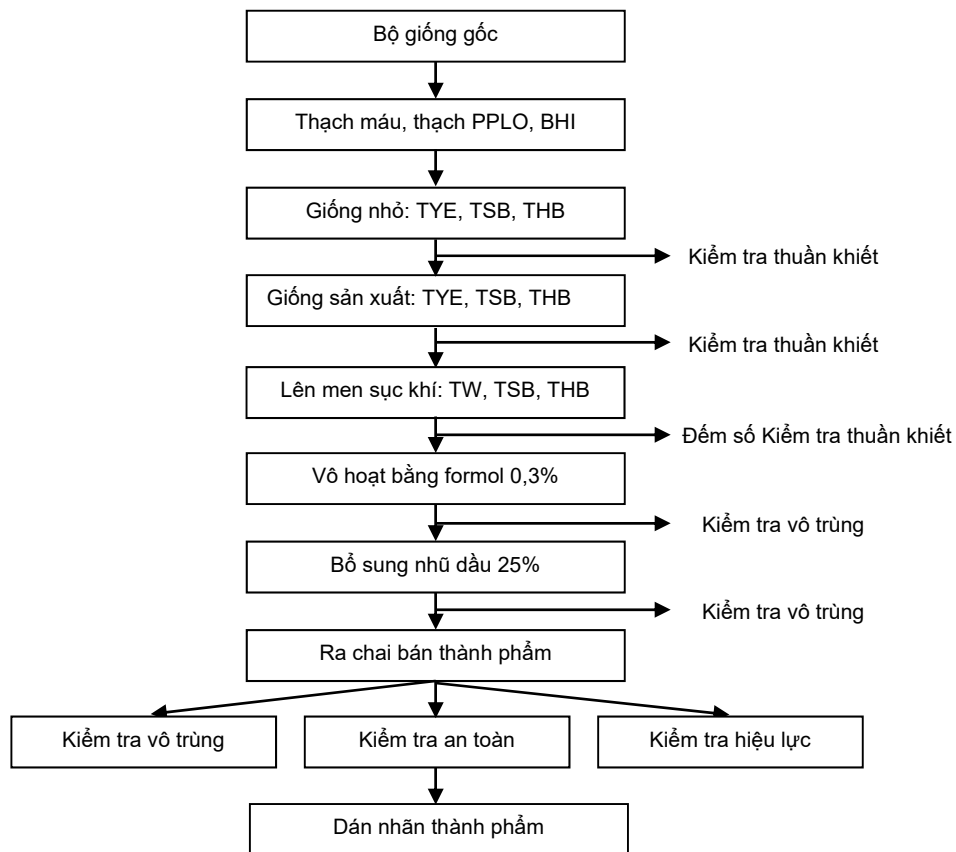
Các chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* và *S. suis* được nuôi cấy riêng rẽ trên các loại môi trường khác nhau và được lên men sục khí bằng hệ thống Fermentor với dung tích 10 L và 120 L của hãng Satorius (CHLB

Đúc). 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 trong môi trường bằng formol 0,3% tương tự sản phẩm: MAR-APPSVAC - vaccin viêm phổi lợn đa giá (Hồ sơ đăng ký lưu hành thuốc thú y, 2015) sau đó thêm bổ trợ 25% là nhũ dầu IMS 1313.

Vaccin đa giá phòng bệnh hô hấp phức hợp ở lợn chế tạo là vaccin toàn khuẩn vô hoạt có bổ trợ nhũ dầu cần đảm bảo đủ số lượng kháng nguyên có trong một liều vaccin tiêm cho lợn. Sau khi chế tạo, vaccin được kiểm nghiệm chất lượng theo tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8685-15:2017 và TCVN 8685-17:2017.

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

Sau khi vô hoạt vi khuẩn trong canh trùng thu được bằng formol, tiến hành kiểm tra (vô hoạt và vô trùng) trên các loại môi trường nước thịt, thạch máu và nước thịt yếm khí. Các loại kháng nguyên sau khi kiểm tra đảm bảo 100% vô hoạt sẽ được tiến hành pha trộn với nhũ dầu theo tỷ lệ 25% (3 phần canh trùng kháng nguyên + 1 phần nhũ dầu) theo hướng dẫn của Sepic (MONTANIDETM IMS-1313 VG N). Tiến hành pha trộn các loại kháng nguyên và nhũ dầu (25%) nhằm trong mỗi liều vaccin (2 mL vaccin/lợn) có số lượng ≥ 4 tỷ vi khuẩn mỗi loại kháng nguyên: *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* và *S. suis* (Quy trình sản xuất vaccin trong hồ sơ của sản phẩm: MAR-APPSVAC vaccin viêm phổi lợn đa giá và Bayovac-suishot-apm7).



Ghi chú: PLLO: Pleuropneumonia-like organism; BHI: Brain Heart Infusion; TYE: Tryptone Yeast Extract Broth; TSB: Tryptic Soy Broth; THB: Todd Hewitt Broth; TW: Tryptone Wasser.

Nguồn: Cù Hữu Phú & cs., 2013.

Hình 1. Tóm tắt quy trình sản xuất vaccin viêm phổi đa giá bổ trợ nhũ dầu

Chế tạo vaccin đa giá vô hoạt nhũ dầu phòng bệnh viêm phổi ở lợn do vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* và *Streptococcus suis* gây ra

2.2.3. Kiểm nghiệm vaccin

Lấy mẫu kiểm nghiệm vaccin theo tiêu chuẩn ngành TCN 10-160:1992. Những bước kiểm tra chất lượng vaccin bao gồm:

- Kiểm tra cảm quan, đậm độ và vô trùng: Vaccin được kiểm tra vô trùng (không tạp nhiễm vi khuẩn và nấm mốc) theo tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8684:2011 và theo quy trình của Bộ môn Vi trùng, Viện Thú y quốc gia.

- Kiểm tra an toàn: Vaccin được kiểm tra an toàn trên chuột nhắt trắng bằng cách tiêm bắp đùi liều 0,5 mL/con. Đồng thời kiểm tra an toàn trên lợn bằng cách tiêm vaccin liều gấp đôi (4 mL/con) cho lợn 4 tuần tuổi qua đường tiêm bắp. Theo dõi các phản ứng của chuột nhắt và lợn để xem mức độ an toàn của vaccin thử nghiệm.

- Kiểm tra hiệu lực: Vaccin được kiểm tra phải có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch đạt hiệu lực $\geq 70\%$ khi công cường độc. Lợn thí nghiệm là lợn khỏe mạnh, trên 4 tuần tuổi. Sau khi tiến hành lấy máu để xác định không nhiễm mầm bệnh tự nhiên (âm tính với kháng thể kháng lại vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*; *P. multocida* và *S. suis*), tiến hành chia lô và tiêm vaccin cho lợn như sau:

+ Lô thí nghiệm: 21 lợn, đánh số tai từ TN1 đến TN21, tiêm vaccin liều sử dụng 2 mL/con, tiêm bắp.

+ Lô đối chứng: 14 lợn, đánh số tai ĐC1 đến ĐC14, tiêm nước sinh lý, liều tiêm và đường tiêm tương tự lô thí nghiệm.

Sau 21 ngày tiêm vaccin và nước sinh lý, công cường độc cho lợn ở lô thí nghiệm và lô đối chứng bằng cách tiêm 7 chủng vi khuẩn cường độc tiêu chuẩn vào xoang phúc mạc, mỗi chủng vi khuẩn cho 3 lợn ở lô thí nghiệm và 2 lợn ở lô đối chứng, liều 10 mL/con, căn cứ vào liều LD50 của vi khuẩn (LD50 của *A. pleuropneumoniae* serotype 2 là $4,3 \times 10^7$ CFU/0,2 mL và serotype 5 là $4,8 \times 10^7$ CFU/0,2 mL. LD50 của chủng *P. multocida* serotype A là 4×10^7 CFU/0,2 mL và serotype D là $4,2 \times 10^7$ CFU/0,2 mL. LD50 của *S. suis* serotype 2 là $4,4 \times 10^7$ CFU/0,2 mL) và liều gây bệnh thực nghiệm là $4,5 \times 10^9$ vi khuẩn/mL đối với từng loại vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*,

P. multocida và *S. suis*. Lợn thí nghiệm được theo dõi 7-10 ngày về nhiệt độ, triệu chứng lâm sàng...

2.2.4. Xác định hiệu giá kháng thể

Hiệu giá kháng thể chống vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* (serotype 2, 5a, 5b), *P. multocida* (type A, type D) và *S. suis* type 2 được xác định dựa vào tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8685-15:2017, TCVN 8685-17:2017, tiêu chuẩn ngành TCN 940-2006, tiêu chuẩn cơ sở TCCS 02VT-92/KNV và quy trình của Bộ môn Vi trùng, Viện Thú y quốc gia: sử dụng phương pháp ELISA đối với A.pp 2, 5 và phương pháp ngưng kết với A.pp, P.m và Strep. suis. Hiệu giá kháng thể được biểu thị dưới dạng log₂ và được đo vào các thời điểm trước khi tiêm phòng, sau khi tiêm phòng 21 ngày, 2 tháng, 3 tháng, 4 tháng và 5 tháng.

2.2.5. Xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm Excel 2017 (tính toán thống kê mô tả - Descriptive Statistics) và phần mềm R phiên bản 3.5.3 (Phân tích phương sai một nhân tố - Oneway ANOVA với phép kiểm định Tukey).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả kiểm tra đậm độ, cảm quan và vô trùng của vaccin đơn giá và đa giá bán thành phẩm

Sau khi nhân Working seed đạt yêu cầu, tiến hành nuôi cấy đơn chủng bằng phương pháp lên men sục khí, sau 8 giờ, thu hoạch vaccin bán thành phẩm đơn giá. Những vaccin bán thành phẩm đơn giá ở đây được hiểu là vaccin được sản xuất từ cùng một chủng loại vi khuẩn là *A. pleuropneumoniae* hoặc *P. multocida* hoặc *S. suis*. Kết thúc quá trình nuôi cấy, tiến hành kiểm tra thuần khiết, đậm độ kháng nguyên, sau đó tiến hành vô hoạt. Mỗi lô sản xuất vaccin đều được lấy mẫu và kiểm tra về chỉ tiêu thuần khiết, vô trùng. Kết quả thể hiện ở bảng 1.

Tất cả 3 lô mẫu kiểm tra ở mỗi loại canh trùng vaccin đơn giá đều đạt yêu cầu về cảm quan, thuần khiết, vô hoạt và đạt yêu cầu về vô trùng (không tạp nhiễm vi khuẩn cũng như không tạp nhiễm nấm mốc). Đậm độ vi khuẩn

trung bình của *A. pleuropneumoniae* là $10,67 \pm 0,52$ tỷ vi khuẩn/mL; của *P. multocida* là $13,33 \pm 1,37$ tỷ vi khuẩn/mL và của *S. suis* $11,00 \pm 0,89$ tỷ vi khuẩn/mL. Những chỉ số này cho thấy quy trình lên men sục khí đã đạt yêu cầu và đậm độ vi khuẩn ở mức cao, đảm bảo cho công đoạn phối trộn vaccin đa giá. Các vaccin đơn giá trên được trộn lẫn với nhau theo tỷ lệ phù hợp để đạt được một hỗn hợp đồng nhất, rồi bổ sung nhũ dầu IMS 1313 với tỷ lệ 25%, đảm bảo trong 2 mL vaccin có chứa: ≥ 4 tỷ vi khuẩn kháng nguyên cho mỗi loại có trong vaccin bán thành phẩm đa giá. (Theo quy trình sản xuất vaccin trong hồ sơ của Sản phẩm: MAR-APPSVAC - vaccin viêm phổi lợn đa giá và vaccin Bayovac-suishot-apm7).

So sánh với vaccin Bayovac SuiShot - APM-7 của hãng Bayer chế tạo (2-4 tỷ vi khuẩn A.pp và P.m trong 1 liều tiêm) là vaccin vô hoạt phòng bệnh hô hấp phức hợp cho lợn trên 5 tuần

tuổi, lượng kháng nguyên *A. pleuropneumoniae* và *P. multocida* cũng tương đương với vaccin của chúng tôi.

Trong cả 3 lô lấy mẫu kiểm tra vaccin đa giá bán thành phẩm đều đạt chỉ tiêu về đậm độ, thuần khiết và vô trùng. Theo TCVN 8684:2011; TCVN 8685-15:2017 và TCVN 8685-17:2017.

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

Với liều tiêm 0,5 mL vaccin/chuột, tất cả chuột được tiêm 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 (Bảng 3). Theo TCVN 8684:2011; TCVN 8685-15:2017 và TCVN 8685-17:2017.

Bảng 1. Kết quả kiểm tra đậm độ, cảm quan và vô trùng của vaccin đơn giá bán thành phẩm

Loại vi khuẩn	Số lô thí nghiệm	Chỉ tiêu kiểm tra		
		Đậm độ ($\times 1$ tỷ vi khuẩn/mL)	Thuần khiết	Vô trùng
<i>A. pleuropneumoniae</i>	3	$10,67 \pm 0,52$	Đạt	Đạt
<i>P. multocida</i>	3	$13,33 \pm 1,37$	Đạt	Đạt
<i>S. suis</i>	3	$11,00 \pm 0,89$	Đạt	Đạt

Bảng 2. Kết quả kiểm tra đậm độ, thuần khiết và vô trùng của vaccin đa giá bán thành phẩm

Lô thí nghiệm	Chỉ tiêu kiểm tra	
	Thuần khiết	Vô trùng
1	Đạt	Đạt
2	Đạt	Đạt
3	Đạt	Đạt

Bảng 3. Kết quả kiểm tra an toàn của vaccin bán thành phẩm trên chuột nhắt trắng

Lô thí nghiệm	Liều tiêm và đường tiêm	Thời gian theo dõi (ngày)	Số chuột thí nghiệm (con)	Số chuột sống (con)	Tỷ lệ sống (%)	Biểu hiện
1	0,5 mL/con; tiêm bắp đùi	10	10	10	100	Chuột phát triển, ăn uống bình thường
2	0,5 mL/con; tiêm bắp đùi	10	10	10	100	Chuột phát triển, ăn uống bình thường
3	0,5 mL/con; tiêm bắp đùi	10	10	10	100	Chuột phát triển, ăn uống bình thường

Chế tạo vaccin đa giá vô hoạt nhũ dầu phòng bệnh viêm phổi ở lợn do vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* và *Streptococcus suis* gây ra

Bảng 4. Kết quả kiểm tra an toàn của vaccin bán thành phẩm trên lợn

Lô thí nghiệm	Liều tiêm và đường tiêm	Thời gian theo dõi (ngày)	Số lợn thí nghiệm (con)	Số lợn sống (con)	Tỷ lệ sống (%)	Biểu hiện
1	4 mL/con; tiêm bắp	10	5	5	100	Lợn khỏe mạnh, không có phản ứng nơi tiêm và phản ứng toàn thân
2	4 mL/con; tiêm bắp	10	5	5	100	Lợn khỏe mạnh, không có phản ứng nơi tiêm và phản ứng toàn thân
3	4 mL/con; tiêm bắp	10	5	5	100	Lợn khỏe mạnh, không có phản ứng nơi tiêm và phản ứng toàn thân

Bảng 5. Kết quả kiểm tra hiệu lực vaccin trên lợn bằng phương pháp trọng tải

Lô lợn	Đường tiêm	Liều tiêm (mL)	Loại canh trùng tiêm	Số lợn chết (con)	Thời gian chết (giờ)
Thí nghiệm	Phúc xoang	10 mL	<i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 2	0/3	
			<i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 5a	0/3	
			<i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 5b	0/3	
			<i>P. multocidatype</i> A	1/3	72
			<i>P. multocidatype</i> D	0/3	
			<i>S. suis</i> type 2	0/3	
			<i>A. pleuropneumoniae</i> + <i>S. suis</i> + <i>P. multocida</i>	0/3	
Đối chứng	Phúc xoang	10 mL	<i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 2	2/2	24
			<i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 5a	2/2	24
			<i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 5b	2/2	72
			<i>P. multocidatype</i> A	2/2	24
			<i>P. multocidatype</i> D	2/2	24
			<i>S. suis</i> type 2	2/2	72
			<i>A. pleuropneumoniae</i> + <i>S. suis</i> + <i>P. multocida</i>	2/2	24

Ghi chú: LD_{50} của *A. pleuropneumoniae* serotype 2 là $4,3 \times 10^7$ CFU/0,2 mL và serotype 5 là $4,8 \times 10^7$ CFU/0,2 mL; LD_{50} của chủng *P. multocida* serotype A là 4×10^7 CFU/0,2 mL và serotype D là $4,2 \times 10^7$ CFU/0,2 mL; LD_{50} của *S. suis* serotype 2 là $4,4 \times 10^7$ CFU/0,2 mL.

Bảng 6. Kết quả kiểm tra hàm lượng kháng thể trên lợn tiêm vaccin vô hoạt nhũ dầu phòng viêm phổi lợn kháng lại vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* (serotype 2, serotype 5a, serotype 5b), *P. multocida* (serotype A, serotype B), và *S. suis* type 2

Chỉ tiêu theo dõi	Kết quả xác định hiệu giá kháng thể (log2)					
	Trước tiêm VX	Sau tiêm VX				
		21 ngày	2 tháng	3 tháng	4 tháng	5 tháng
<i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 2	-	6,7 ^d ± 0,48	4,9 ^c ± 0,57	4,6 ^{bc} ± 0,52	4,0 ^{ab} ± 0,00	3,4 ^a ± 1,26
<i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 5a	-	6,5 ^c ± 0,71	5,0 ^b ± 0,82	4,3 ^{ab} ± 0,48	3,9 ^a ± 0,32	3,6 ^a ± 0,52
<i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 5b	-	7,4 ^d ± 0,52	5,8 ^c ± 0,92	4,7 ^b ± 0,67	4,1 ^{ab} ± 0,32	3,8 ^a ± 0,42
<i>P. multocidatype</i> A	-	6,5 ^b ± 0,53	6,4 ^b ± 0,52	6,2 ^b ± 0,42	5,9 ^b ± 0,32	5,2 ^a ± 0,79
<i>P. multocidatype</i> D	-	6,4 ^c ± 0,52	5,9 ^{bc} ± 0,32	5,8 ^b ± 0,42	5,7 ^b ± 0,48	4,9 ^a ± 0,32
<i>S. suis</i> type 2	-	6,0 ^c ± 0,00	5,9 ^c ± 0,32	5,8 ^c ± 0,42	4,9 ^b ± 0,32	4,0 ^a ± 0,00

Ghi chú: Trong cùng một hàng, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.

3.3. Kết quả kiểm tra chỉ tiêu an toàn của vaccin trên lợn

Lợn được kiểm tra an toàn với liều tiêm gấp đôi liều sử dụng theo tiêu chuẩn kiểm nghiệm vaccin vi khuẩn vô hoạt (4 mL/con): tất cả 5 lợn trên 4 tuần tuổi được tiêm 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 chế tạo đã đạt yêu cầu về chỉ tiêu an toàn 100% trên lợn. Theo TCVN 8684:2011; TCVN 8685-15:2017 và TCVN 8685-17:2017.

3.4. Kết quả kiểm tra chỉ tiêu hiệu lực của vaccin trên lợn

Kết quả cho thấy: Khi tiêm canh trùng chứa vi khuẩn cường độc *A. pleuropneumoniae* vào lợn đã sử dụng vaccin 21 ngày, không có lợn nào bị chết. Số liệu tương ứng đạt được ở cả 3 loại vi khuẩn cường độc trong canh trùng được tiêm gồm *A. pleuropneumoniae* serotype 2, *A. pleuropneumoniae* serotype 5a và *A. pleuropneumoniae* serotype 5b. Lợn được công cường độc với vi khuẩn *P. multocida* serotype A và D, chỉ có một lợn tiêm canh trùng của *P. multocida* serotype A bị chết (1/3 lợn thí nghiệm). Như vậy, trên 6 lợn khi công cường độc với vi khuẩn *P. multocida* serotype A và D, tỷ lệ bảo hộ chung là 83,3% (5/6 lợn sống).

Lợn được công cường độc với vi khuẩn *S. suis* type 2 với liều 10 mL/con đã không gây chết lợn, đạt tỷ lệ bảo hộ đạt 100%.

Hai lợn được công cường độc với hỗn hợp các loại vi khuẩn: *A. pleuropneumoniae* serotype 2, 5a và 5b + *P. multocida* serotype A và D + *S. suis* type 2, liều 10 mL/con đã không gây chết lợn, đạt tỷ lệ bảo hộ chung là 100%.

Đối với lợn ở lô đối chứng (không được tiêm vaccin), khi công cường độc với cùng liều tiêm như lô thí nghiệm, kết quả theo dõi cho thấy tất cả lợn đều chết (14/14 con) trong vòng từ 24 đến 72 giờ với triệu chứng và bệnh tích đặc trưng cho phức hợp hô hấp do những vi khuẩn này gây ra. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đương với kết quả nghiên cứu của dự án SXTN của Viện Thú y (2013).

Như vậy, vaccin đa giá phòng bệnh hô hấp phức hợp ở lợn vô hoạt nhũ dầu được chế từ 3 loại vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* serotype 2; 5a, 5b; *P. multocida* type A, D và *S. suis* type 2, có hiệu lực bảo hộ đối với lợn với bệnh tụ huyết trùng do *P. multocida* từ 83,3% trở lên. Theo tiêu chuẩn TCVN 8685-15:2017 và TCVN 8685-17:2017 của Bộ NN & PTNT, vaccin chế tạo đã đạt yêu cầu của vaccin phòng bệnh viêm phổi phức hợp do vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* serotype 2; 5a, 5b; *P. multocida* type A, D và *S. suis* type 2 gây ra ở lợn.

3.5. Kết quả theo dõi độ dài miễn dịch của vaccin

Vaccin bán thành phẩm đa giá đã đạt được chỉ tiêu về cảm quan, vô trùng, an toàn và hiệu lực. Tuy nhiên, để biết được khả năng bảo hộ và thời gian bảo hộ của vaccin với bản động vật, hiệu giá kháng thể theo thời gian cần được xác định.

Kết quả xác định hiệu giá kháng thể của vaccin đa giá cho thấy: Trước thời điểm tiêm vaccin, lợn thí nghiệm được kiểm tra và đều âm tính kháng thể trong máu. Tuy nhiên, vaccin đa giá đã giúp cho cơ thể lợn sản sinh kháng thể ở mức cao. Vào thời điểm 21 ngày sau tiêm vaccin, hàm lượng kháng thể chống *A. pleuropneumoniae* dao động từ $6,5 \pm 0,71 \log_2$ đến $7,4 \pm 0,52 \log_2$. Hàm lượng kháng thể chống *P. multocida* type A và D là $6,5 \pm 0,53$ và $6,4 \pm 0,52$ còn hàm lượng kháng thể chống *S. suis* type 2 là $6,0 \pm 0,00 \log_2$.

Với hiệu giá kháng thể ở những thời điểm sau đó (2 tháng, 3 tháng, 4 tháng, 5 tháng) đã cho thấy, hàm lượng kháng thể chống lại những mầm bệnh xét nghiệm giảm dần ($P < 0,05$) tuy nhiên có một số điểm đáng chú ý trong diễn biến hàm lượng kháng thể như bảng 6.

Sau 4 tháng tiêm vaccin, hiệu giá kháng thể đối với những vi khuẩn được kiểm tra đều đạt trên 4 \log_2 (trừ vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* serotype 5a). Sau 5 tháng, hiệu giá kháng thể chống lại *P. multocida* và *S. suis* vẫn đạt trên 4 \log_2 trong khi hiệu giá kháng thể của *A. pleuropneumoniae* đều dưới 4 \log_2 . Sự dao động về hiệu giá kháng thể chống

Chế tạo vaccin đa giá vô hoạt nhũ dầu phòng bệnh viêm phổi ở lợn do vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* và *Streptococcus suis* gây ra

A. pleuropneumoniae là từ $3,4 \pm 1,26 \log_2$ đến $3,8 \pm 0,42$ cho thấy ở một số lô thí nghiệm, hiệu giá kháng thể vẫn đạt được trên $4 \log_2$. Như vậy, để chắc chắn có hiệu giá kháng thể trên $4 \log_2$ ở lợn đối với vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* thì vaccin đa giá nên được tiêm nhắc lại vào 4 tháng sau khi tiêm lần 1. Hiệu giá kháng thể chống *P. multocida* và *S. suis* vẫn đạt ở mức $\geq 4 \log_2$ vào tháng thứ 5, cũng là lúc kết thúc đợt thí nghiệm. Vì vậy cần có thêm thời gian để đánh giá khả năng duy trì hiệu giá kháng thể ở mức $4 \log_2$ của vaccin đa giá với hai mầm bệnh *P. multocida* và *S. suis*. Mặc dù vậy, để đảm bảo tính an toàn của lợn được tiêm vaccin đa giá (chống lại cả *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* và *S. suis*) thì thời điểm tiêm nhắc lại vaccin nên căn cứ vào lúc bắt đầu xuất hiện sự giảm hiệu giá kháng thể xuống dưới $4 \log_2$ ở bất cứ một loại mầm bệnh nào nêu trên, ở đây là 1 tháng sau khi tiêm vaccin lần thứ nhất.

So sánh với hiệu lực phòng bệnh viêm phổi phức hợp của vaccin đa giá phòng bệnh hô hấp phức hợp ở lợn vô hoạt keo phèn của Công ty Marphavet sản xuất và lưu hành trên toàn quốc, chúng tôi thấy: Sau 4 tháng tiêm vaccin có bổ trợ keo phèn và bổ trợ nhũ dầu, hiệu giá kháng thể có trong máu lợn kháng lại với tất cả những vi khuẩn được kiểm tra đều đạt trên $4 \log_2$, sau 5 tháng tiêm vaccin nhũ dầu hiệu giá kháng thể chống lại *P. multocida* và *S. suis* vẫn đạt trên $4 \log_2$, còn kháng lại *A. pleuropneumoniae* đều trên $3 \log_2$. Trong khi đó, lợn được tiêm vaccin viêm phổi có bổ trợ keo phèn sau 5 tháng tiêm hiệu giá kháng thể trong máu lợn kháng lại *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* và *S. suis* chỉ đạt $\leq 3 \log_2$. (Hồ sơ đăng ký lưu hành thuốc thú y, 2015). Kết quả so sánh chất lượng vaccin đa giá vô hoạt bổ trợ keo phèn và bổ trợ nhũ dầu chế tạo phòng bệnh cho lợn, bằng phương pháp ELISA đối với *A. pleuropneumoniae* 2, 5, 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 (Cù Hữu Phú & cs., 2019).

Như vậy, bước đầu có thể đánh giá hiệu lực phòng bệnh và độ dài miễn dịch của vaccin đa giá phòng bệnh hô hấp phức hợp ở lợn bổ trợ nhũ dầu cao hơn vaccin đa giá phòng bệnh hô hấp phức hợp ở lợn bổ trợ keo phèn.

4. KẾT LUẬN

Trên cơ sở sử dụng bộ giống gốc vi khuẩn (*A. pleuropneumoniae*, *P. multocida*, *S. suis*) dùng để sản xuất vaccin đa giá vô hoạt có bổ trợ keo phèn phòng bệnh viêm phổi ở lợn, chúng tôi đã nghiên cứu chế tạo được vaccin đa giá vô hoạt nhũ dầu - IMS 1313 phòng bệnh viêm phổi ở lợn từ 4 tuần tuổi. Đây là vaccin đa giá vô hoạt nhũ dầu - IMS 1313 lần đầu tiên được nghiên cứu chế tạo tại Việt Nam.

Vaccin được kiểm nghiệm chất lượng theo tiêu chuẩn 10 TCN 160-92 và 10 TCN 161-92 (2003) đạt chất lượng tốt với các chỉ tiêu: vô trùng 100%; an toàn 100% trên chuột và lợn. Hiệu lực phòng bệnh của vaccin thử nghiệm trên lợn đạt trên 80,0% bằng phương pháp công cường độc. Thử nghiệm tại thực địa, vaccin đạt tỷ lệ an toàn 100,0% ở lợn trên 4 tuần tuổi. Vaccin gây đáp ứng miễn dịch tốt. Lợn sau khi tiêm vaccin 5 tháng, hiệu giá kháng thể huyết thanh ngưng kết trong máu vẫn đạt $\geq 1/16$ ($4 \log_2$), đảm bảo kháng lại vi khuẩn *A. Pleuropneumoniae* serotype 2, 5a, 5b; *P. multocida* serotype A, D và *S. suis* serotype 2 gây phức hợp viêm phổi ở lợn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahn D.C. & 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.
- Cù Hữu Phú, Nguyễn Ngọc Nhiên, Nguyễn Thu Hằng, Âu Xuân Tuấn, Nguyễn Bích Thủy, Vũ Ngọc Quý & Phạm Bảo Ngọc (2005). Xác định nguyên nhân gây bệnh đường hô hấp của lợn nuôi tại một số tỉnh phía Bắc. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y. 12(4): 23-32.
- Cù Hữu Phú (2011). Nghiên cứu mối liên quan giữa hội chứng rối loạn hô hấp, sinh sản ở lợn (PRRS) với vi khuẩn gây bệnh kê phát và xác định biện pháp phòng, trị bệnh. Báo cáo kết quả đề tài độc lập cấp Nhà nước năm 2011.

- Cù Hữu Phú, Nguyễn Xuân Huyền, Âu Xuân Tuấn, Lê Thị Minh Hằng, Lưu Thị Hải Yến, Văn Thị Hương, Trần Việt Dũng Kiên & Tăng Thị Phương (2013). Xác định serotype và một số yếu tố gây bệnh của vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* và *Streptococcus suis* để chọn chủng chế tạo vaccin phòng bệnh viêm phổi cho lợn. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y. 7: 24-33.
- Cù Hữu Phú (2013). Báo cáo tổng hợp kết quả khoa học công nghệ dự án SXTN 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.
- Cù Hữu Phú, Nguyễn Xuân Huyền, Âu Xuân Tuấn, Lê Thị Minh Hằng, Lưu Thị Hải Yến, Văn Thị Hương, Trần Việt Dũng Kiên & Tăng Thị Phương (2014). Lựa chọn chủng vi khuẩn để chế tạo thử nghiệm vaccin phòng bệnh viêm phổi do vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* và *Streptococcus suis* gây ra ở lợn. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y. 2: 33-42.
- Cù Hữu Phú, Đỗ Tất Đạt & Lương Thị Hương Giang (2019). So sánh chất lượng vaccin đa giá vô hoạt bổ trợ keo phen và bổ trợ nhũ dầu chế tạo phòng bệnh cho lợn. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y. 26(2): 40-48.
- Cục Y tế dự phòng, Bộ Y tế (2018). Đùng để mắt Tét vi bệnh liên cầu lợn. Truy cập từ <http://vncdc.gov.vn/vi/tin-tuc-trong-nuoc/2307/dung-de-mat-tet-vi-benh-lien-cau-lon> ngày 7/3/2019.
- Fittipaldi N., Segura M., Grenier D. & 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.
- Frey J. (1995). Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins, Trends Microbiol. Jul. 3(7): 257-261.
- Hồ sơ đăng ký lưu hành thuốc thú y (2015). Sản phẩm: MAR-APPSVAC (vaccin viêm phổi lợn đa giá).
- Lê Văn Dương, Nguyễn Quang Tuyên, Cù Hữu Phú & Hoàng Đăng Huyền (2012). Kết quả phân lập và xác định một số đặc tính sinh học của các chủng *Actinobacillus pleuropneumoniae* ở lợn dương tính với virus gây Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản tại tỉnh Bắc Giang. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y. 19(3): 45-50.
- Lê Văn Dương, Nguyễn Quang Tuyên, Cù Hữu Phú & Hoàng Đăng Huyền (2012). Kết quả phân lập và xác định một số đặc tính sinh học của các chủng *Pasteurella multocida* ở lợn dương tính với virus gây Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản tại tỉnh Bắc Giang. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y. 19(6): 52-56.
- Liu J., Chen X., Tan C., Guo Y., Chen Y., Fu S., Bei W. & 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.
- Nguyễn Thị Thu Hằng, Đỗ Ngọc Thúy, Cù Hữu Phú, Trương Văn Dũng, Nguyễn Xuân Huyền & Vũ Ngọc Quý (2009). Kết quả thiết lập phản ứng PCR để giám định nhanh vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* phân lập được từ lợn nuôi tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y. 3: 45-49.
- SEPPIC. MONTANIDE™ IMS. Trích từ <https://www.seppic.com/montanide-ims>.
- Seung I. Jang, Hyun S. Lillehoj, Sung Hyen Lee, Kyung Woo Lee, Erik P. Lillehoj, François Bertrand, Laurent Dupuis, Sébastien Deville (2011). Montanide™ IMS 1313 N VG PR nanoparticle adjuvant enhances antigen-specific immune responses to profilin following mucosal vaccination against *Eimeria acervulina*. Veterinary Parasitology. 182(2-4): 163-170.
- TCN 10-160:1992. Quy trình lấy mẫu và sử dụng mẫu trong kiểm nghiệm vaccin.
- TCCS 02VT-92/KNI. Quy trình kiểm tra vaccin Tụ huyết trùng lợn.
- TCVN 8684:2011. Tiêu chuẩn Việt Nam về vaccin và chế phẩm sinh học dùng trong thú y - Phép thử độ thuần khiết.
- TCVN 8685-15:2017. Quy trình kiểm nghiệm vaccin vô hoạt phòng bệnh viêm phổi do *Pasteurella multocida* type D gây ra ở lợn.
- TCVN 8685-17:2017. Quy trình kiểm nghiệm vaccin vô hoạt phòng bệnh viêm màng phổi ở lợn do *A. pleuropneumoniae* gây ra ở lợn.
- Thuỷ sản Bayer Việt Nam. Bayovac® SuiShot® APM-7. Truy cập từ <https://bah.bayer.vn/vi/sanpham/bayovac-suishot-apm7/> ngày 15/3/2019.