

Vắc xin phòng Enterotoxigenic *Escherichia coli* gây tiêu chảy sau cai sữa ở heo con (post-weaning diarrhea)

Ngô Phan Minh Vũ^{1,2}, Mai Quốc Gia^{1,2}, Trần Văn Hiếu^{1,2,*}

TÓM TẮT

Bệnh tiêu chảy sau cai sữa ở heo con (Post-weaning diarrhea, PWD) chủ yếu do chủng Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) gây ra. ETEC bám lên biểu mô ruột bằng nhân tố bám dính (adhesin) cụ thể là phần tiêm mao (fimbria) như F4, F5, F6, F7 và F18, trong đó F4 và F18 biểu hiện nhiều ở những chủng gây PWD. Sau đó, chúng tiết các độc tố ruột (enterotoxin) như độc tố nhạy nhiệt (heat-labile enterotoxin, LT),... gây nên tình trạng mất nước và các chất điện giải, tổn thương đường ruột, giảm hấp thụ dinh dưỡng, sự phát triển và dẫn đến tử vong. Vắc xin là biện pháp phòng bệnh hiệu quả nhất được hướng đến. Mặc dù đã có vắc xin phòng chống ETEC dựa trên tiêm mao, tuy nhiên độc tố ruột là tác nhân gây tiêu chảy chính của ETEC. Vì vậy, việc phát triển thể hệ vắc xin mới bao gồm cả nhân tố bám dính và độc tố đã được thực hiện. Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã tạo ra được các kháng nguyên dung hợp cả hai nhân tố này và thử nghiệm khả năng tạo đáp ứng miễn dịch trên mô hình chuột, thỏ, và heo. Cùng với chiến lược phát triển vắc xin nhắm trúng đích tế bào M đã mở ra hướng đi mới đầy tiềm năng để tạo ra vắc xin uống nói chung và vắc xin uống phòng ETEC nói riêng. Bài báo trình bày việc tổng hợp những chiến lược phát triển vắc xin dựa trên nhân tố bám dính tiêm mao và độc tố ruột, nhằm bảo vệ heo con khỏi PWD, vì những nghiên cứu này cũng là tiền đề để phát triển vắc xin phòng ETEC ở người.

Từ khoá: Độc tố, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, nhân tố bám dính, PWD, tế bào M, vắc xin

¹Phòng thí nghiệm Cầm biến sinh học, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học,

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Liên hệ

Trần Văn Hiếu, Phòng thí nghiệm Cầm biến sinh học, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học,

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 12-4-2023
- Ngày chấp nhận: 24-5-2024
- Ngày đăng: 30-6-2024

DOI:

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v8i2.1281>



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



GIỚI THIỆU

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) là nguyên nhân phổ biến nhất gây bệnh tiêu chảy sau cai sữa ở heo con (Post-weaning diarrhea, PWD), với tỷ lệ tử vong cao¹. Cơ chế gây bệnh của ETEC thông qua nhân tố bám dính và độc tố¹. Hầu hết các chủng ETEC bám lên thụ thể trên tế bào biểu mô ruột bằng một số phần phụ có bề mặt là protein (tiêm mao). Sau khi bám lên biểu mô ruột, chúng tiết ra các protein độc tố (độc tố ruột), gây tăng tiết dịch và chất điện giải ở ruột non, gây mất nước và giảm hấp thu chất dinh dưỡng¹. Bệnh tiêu chảy nói chung và tiêu chảy do ETEC nói riêng đã, và đang gây ra thiệt hại to lớn cho ngành chăn nuôi heo khi xét đến các yếu tố như mức độ nghiêm trọng của bệnh, quy mô trang trại, phương pháp quản lý, điều kiện từng địa phương và giá cả thị trường. Theo thống kê vào năm 2022, ước tính PWD ảnh hưởng đến gần 54% ngành chăn nuôi heo toàn cầu, làm thiệt hại khoảng 2,9 tỷ đô la Mỹ^{2,3}. Hiện nay, vắc xin là biện pháp hiệu quả nhất để kiểm soát tiêu chảy do chủng ETEC. Để đạt hiệu quả, vắc xin tiêm phải sử dụng liều lớn hoặc tiêm nhắc nhiều lần, việc này có thể gây ra stress cho heo. Để khắc phục điều này, vắc xin uống đang được phát triển thay thế cho vắc xin tiêm.

Bám dính là bước đầu tiên trong quá trình gây bệnh; vì vậy, nhân tố bám dính là kháng nguyên được quan tâm để tạo đáp ứng miễn dịch. Các kháng thể có thể bám và khóa vị trí tương tác của nhân tố bám dính, giúp ngăn chặn quá trình bám của ETEC lên tế bào biểu mô ruột non. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm tạo ra các nhân tố bám dính, cũng như đánh giá khả năng bảo vệ heo con khỏi ETEC gây PWD. Tuy nhiên, có nhiều nghiên cứu dịch tễ học đã chỉ ra rằng nhiều chủng ETEC xâm nhiễm vào heo con không có nhân tố bám dính⁴. Điều này làm vắc xin dựa trên nhân tố bám dính đã được thương mại hoá chỉ có thể bảo vệ heo khỏi một số chủng ETEC nhất định, không thể bảo vệ phổ rộng. Mặc dù bám dính là bước đầu tiên trong quá trình xâm nhiễm của ETEC, nhưng các độc tố mới là tác nhân chính gây tiêu chảy ở heo con⁵. Đó là lý do vì sao vắc xin dựa trên độc tố được quan tâm nghiên cứu. Nhằm cung cấp sự bảo vệ hiệu quả nhất, các nhà nghiên cứu đã thiết kế, tạo ra vắc xin đa giá, có thể kích thích đáp ứng miễn dịch chống các độc tố ruột, lẫn các nhân tố bám dính⁶. Để đạt được mục đích này, điều cần thiết là vắc xin phải kích thích đáp ứng miễn dịch màng nhầy ở ruột non, tiết IgA (secretory IgA, sIgA) đặc hiệu để phòng ngừa những chủng ETEC gây bệnh tiêu chảy⁷.

Trích dẫn bài báo này: Vũ N P M, Gia M Q, Hiếu T V. **Vắc xin phòng Enterotoxigenic *Escherichia coli* gây tiêu chảy sau cai sữa ở heo con (post-weaning diarrhea).** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2024; 8(2):2900-2919.

Từ đây, các nghiên cứu dựa trên tiền đề là nhân tố bám dính và độc tố đã được thực hiện. Các chủng ETEC gây bệnh mang các tiêm mao khác nhau, và tiết độc tố khác nhau, vì vậy việc tạo ra các kháng nguyên dung hợp mang cả nhân tố bám dính và độc tố là cần thiết để phát triển loại vắc xin phòng bệnh hiệu quả nhất. Nhiều hướng nghiên cứu đã được thực hiện từ vắc xin bất hoạt, vắc xin nhược độc, và cả vắc xin tiểu phần để đánh giá khả năng bảo vệ. Với vắc xin mang kháng nguyên là protein độc tố, ngoài khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch, tính an toàn cũng cần được đảm bảo. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy, tiểu phần LTb của heat-labile enterotoxin (LT) không gây độc nhưng có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch. Trong khi đó, độc tố heat-stable enterotoxin (ST) lại có tính sinh miễn dịch kém do khối lượng phân tử nhỏ^{8,9}. Vì vậy, một hướng tiếp cận nhằm tạo ra vắc xin vừa an toàn, vừa có tính sinh miễn dịch là kết hợp tiểu phần LTb với độc tố STa và STb. Mang nhiều đặc điểm giúp tối ưu khả năng gây đáp ứng miễn dịch, cùng khả năng biểu hiện protein và vận chuyển kháng nguyên, chiến lược biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp trong chủng *Escherichia coli* bất hoạt đang nhận được nhiều sự quan tâm¹⁰. Sau các thử nghiệm kích thích miễn dịch với các loại kháng nguyên dung hợp, hầu hết các cá thể từ mô hình chuột đến heo con đều tạo ra các kháng thể đặc hiệu trung hoà độc tố và bắt với tiêm mao, giúp chống lại sự xâm nhiễm của các chủng ETEC gây bệnh¹¹.

Vắc xin uống đã cho thấy sự bảo vệ hiệu quả trước các bệnh lây nhiễm qua đường tiêu hoá gây ra bởi vi sinh vật. Vì vậy, định hướng vắc xin đến tế bào M (Microfold cells) là chiến lược tiềm năng để phát triển vắc xin uống nói chung và vắc xin uống phòng ETEC nói riêng. Dựa trên những kiến thức về hệ miễn dịch đường ruột, cấu trúc tế bào M, sự tương tác giữa các cặp phối tử – thụ thể trên bề mặt tế bào M, kết hợp cùng với các hệ thống phân phối, việc đảm bảo tính toàn vẹn, và vận chuyển kháng nguyên đến tế bào M là hoàn toàn khả thi¹².

Bài viết trình bày một số chiến lược phát triển vắc xin dựa trên nhân tố bám dính tiêm mao cũng như độc tố ruột, nhằm bảo vệ heo con khỏi PWD. Bên cạnh đó, một số độc tố ruột này cũng phổ biến ở những chủng ETEC gây bệnh ở người, vì vậy các nghiên cứu dưới đây cũng là tiền đề phát triển vắc xin phòng ETEC ở người.

BỆNH TIÊU CHẢY Ở HEO SAU CAI SỮA (POST-WEANING DIARRHEA, PWD)

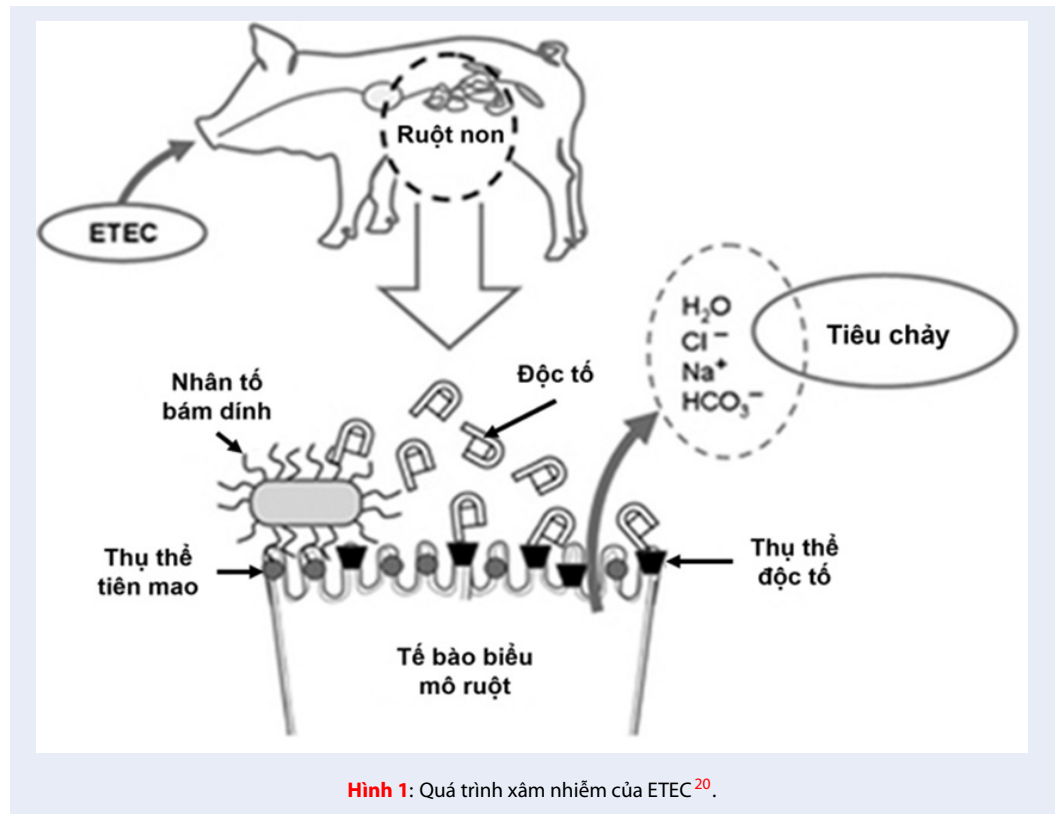
Chăn nuôi đóng vai trò cực kỳ quan trọng trong phát triển kinh tế và cung cấp nguồn thực phẩm dinh

dưỡng toàn cầu cũng như ở Việt Nam. Tỷ trọng ngành chăn nuôi trong nông nghiệp ở nước ta là 24,7% vào năm 2005 và đến năm 2011 là 30%, trong đó chăn nuôi heo giữ vai trò chủ đạo trong tổng giá trị ngành chăn nuôi. Hơn nữa, trong chiến lược phát triển chăn nuôi đến năm 2030, chăn nuôi heo chiếm 42% tổng giá trị ngành nông nghiệp, chăn nuôi heo vẫn giữ vai trò chủ đạo và sẽ đạt sản lượng 35 triệu con (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn).

Tuy nhiên, trên thế giới, khoảng cuối thập niên 1960, bệnh tiêu chảy đã trở thành bệnh phổ biến, gây ra những vấn đề nghiêm trọng với ngành chăn nuôi heo và Việt Nam cũng không ngoại lệ¹³. Bệnh có thể mang tính cục bộ hoặc phát triển thành dịch với tỷ lệ tử vong cao. Heo dễ bị ảnh hưởng bởi dịch bệnh, đặc biệt là bệnh tiêu chảy ở heo sau cai sữa. Bệnh phổ biến ở giai đoạn heo con theo mẹ và heo con sau cai sữa. Heo con bị tiêu chảy sẽ dẫn đến mất nước và các chất điện giải, giảm hấp thụ dinh dưỡng, tổn thương đường ruột, tạo điều kiện cho vi sinh vật có hại tăng trưởng và phát triển. Heo con mắc bệnh có thể giảm 10–12% trọng lượng trong vòng sáu tiếng và có thể dẫn đến tử vong. Heo khỏi bệnh thường tăng trưởng chậm, còi cọc, yếu ớt, gây tổn thất kinh tế và công chăm sóc của người chăn nuôi¹⁴. Các thiệt hại do PWD gây ra rất khó đo lường, tùy thuộc vào mức độ nghiêm trọng của bệnh, quy mô trang trại, phương pháp quản lý, điều kiện từng địa phương và giá cả thị trường. Các thiệt hại như: (a) Heo bị bệnh có tốc độ tăng trưởng chậm, kéo dài thời gian nuôi, làm tăng chi phí thức ăn, chăn nuôi và làm giảm lợi nhuận; (b) Tỷ lệ tử vong cao, số lượng heo giảm, mất hoàn toàn lợi nhuận; (c) Chi phí điều trị bệnh, chi phí trả cho việc thăm khám, chẩn đoán, xét nghiệm của bác sĩ và nhân công khác. Chi phí điều trị có thể thay đổi tùy vào mức độ bùng phát bệnh và hướng điều trị; (d) Gây biến động giá cả thị trường. Thống kê vào năm 2022, sản lượng heo trên thế giới hơn 784 triệu con, trong đó ước tính khoảng 54% số lượng heo bị ảnh hưởng do PWD, làm tổn thất khoảng 2,9 tỷ đô la Mỹ (7 đô la Mỹ/con)^{2,3}. Để đảm bảo ngành chăn nuôi heo phát triển bền vững, vấn đề phòng ngừa bệnh tiêu chảy ở heo, đặc biệt ở heo con mới sinh và sau cai sữa cần được quan tâm nhiều hơn.

NGUYÊN NHÂN GÂY BỆNH

Các yếu tố gây bệnh phổ biến là: điều kiện môi trường, khẩu phần ăn, và nhất là tác nhân vi sinh vật. Khi các yếu tố môi trường như nhiệt độ, ẩm độ và điều kiện chuồng nuôi thay đổi, có thể ảnh hưởng đến sức đề kháng của heo, đặc biệt là heo con theo mẹ, do cấu tạo và chức năng sinh lý chưa hoàn thiện, dễ dẫn đến nhiều bệnh trong đó có tiêu chảy. Ẩm độ tác



Hình 1: Quá trình xâm nhiễm của ETEC²⁰.

động lên gia súc bị nhiễm lạnh kéo dài cũng làm giảm phản ứng miễn dịch, giảm tác dụng thực bào và gia súc dễ bị nhiễm khuẩn gây bệnh. Thay đổi đột ngột về khẩu phần ăn làm giảm sức đề kháng của heo con khiến các vi khuẩn thường trực gia tăng độc tố và gây bệnh. Khẩu phần thức ăn cho vật nuôi không thích hợp, kém chất lượng, nhiễm các tạp chất, các vi sinh vật có hại dễ dẫn đến rối loạn tiêu hóa, viêm ruột, tiêu chảy¹⁵. Vi sinh vật bao gồm virus và vi khuẩn, chúng vừa là nguyên nhân nguyên phát vừa là nguyên nhân thứ phát gây tiêu chảy. Một số vi khuẩn đường ruột là *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella* sp., *Shigella*, *Clostridium perfringens* là nguyên nhân gây nên sự rối loạn tiêu hóa, viêm ruột và tiêu chảy ở vật nuôi¹⁵. Nhóm vi khuẩn đường ruột gồm *E. coli*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella* phân lập từ mẫu phân heo con tiêu chảy lần lượt chiếm tỷ lệ 66,7%, 3,7%, 40,7% và 3,7%¹⁶. Như vậy, *E. coli* là một trong số các vi khuẩn đường ruột gây bệnh tiêu chảy chiếm tỷ lệ cao nhất với 66,66%. Trong đó, chủng vi khuẩn *Escherichia coli* tiết ngoại độc tố (Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC) là tác nhân hàng đầu gây ra bệnh tiêu chảy ở heo^{17,18}. Ở Việt Nam, năm 2015, một nghiên cứu về nguyên nhân gây tiêu chảy ở heo con đã được thực hiện ở tỉnh Đồng Tháp và Vĩnh Long, cho thấy hơn 90% bệnh tiêu chảy ở heo con là do ETEC¹⁹.

ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI, ETEC

E. coli là vi khuẩn cực kỳ phổ biến, chiếm 80% vi khuẩn hiếu khí vừa là vi khuẩn sống cộng sinh trong đường ruột, vừa là vi khuẩn gây bệnh đường tiêu hóa. Trong số các chủng gây bệnh, ETEC là chủng gây tiêu chảy và xâm nhập vào cơ thể thông qua con đường ăn uống. ETEC có hai nhân tố gây bệnh đó là: nhân tố bám dính, giúp chúng bám lên biểu mô ruột; và sau đó tiết các độc tố gây mất nước²¹. Quá trình gây bệnh diễn ra như sau: đầu tiên chúng sử dụng nhân tố bám dính (tiêm mao) để bám lên biểu mô ruột thông qua các thụ thể đặc trưng, sau đó chúng tiết các độc tố gây tiêu chảy (Hình 1). Các chủng ETEC gây bệnh PWD thường gặp chứa tiêm mao F4 (K88) (45,1%), F18 (33,9%)²², một số khác gây bệnh tiêu chảy ở heo sơ sinh mang tiêm mao F5 (K99), F6 (987P), F7 (F41)²⁰. Chúng tiết độc tố nhạy nhiệt (heat-labile enterotoxin, LT) (31,9%), độc tố bền nhiệt (heat-stable enterotoxin, ST) gồm STa (38,1%) và STb (59,1%)²³. *E. coli* phải biểu hiện một hoặc cả hai loại độc tố mới được xem là chủng ETEC^{24,25}.

Nhân tố bám dính (adhesin)

Bước đầu tiên trong quá trình gây bệnh của ETEC là sự bám của nhân tố bám dính lên các thụ thể trên biểu

mô ruột, điều này giúp chúng chống lại khả năng đào thải của nhu động ruột. ETEC bám vào thụ thể trên biểu mô ruột thông qua phần gọi là tiêm mao (fimbria) mà chúng biểu hiện. Tiêm mao phổ biến xuất hiện ở các chủng ETEC gây PWD là F4 và F18. Tiêm mao của các chủng vi khuẩn này có thể dài 2 μm , đường kính 2–7 nm. Mỗi sợi tiêm mao là một tập hợp dọc theo trục của hàng trăm các tiểu đơn vị protein khác nhau; càng ít các protein thì bề mặt tương tác của chúng càng ít, tiêm mao càng mỏng và linh động¹⁴. Các cụm gene mã hóa cho ba phần cấu trúc của một tiêm mao bao gồm: (i) Các tiểu phần chính, hình thành nhiều cấu trúc polymer của tiêm mao; (ii) Các tiểu phần phụ, một (hoặc nhiều) tiểu phần phụ là vị trí gắn chuyên biệt cho các thụ thể trong vật chủ, được gọi là tiểu phần bám dính; (iii) Các protein điều hòa đặc trưng tiêm mao¹⁴.

Tiêm mao F4 là bao gồm tiểu đơn vị chính là FaeG, mang cả chức năng cấu trúc và chức năng bám dính, và bốn tiểu đơn vị phụ là FaeF, FaeH, FaeC và FaeI²⁶ (Hình 2). Tiêm mao F4 có ba biến thể (F4ab, F4ac và F4ad), trong đó F4ac là biến thể được tìm thấy nhiều nhất gây PWD. F4ad bám dính mạnh mẽ với glycolipid, F4ab và F4ac liên kết tốt với glycoprotein. Ngoài ra, có nghiên cứu đã chứng minh rằng tiêm mao F4 có các đặc tính liên kết với carbohydrate²⁷.

Tiêm mao F18 với protein cấu trúc chính là FedA và các tiểu đơn vị FedB, FedC, FedE, FedF. FedF có vai trò liên kết với thụ thể, có tính bảo tồn cao^{28,29} (Hình 2). F18 tồn tại ở hai dạng biến thể kháng nguyên: F18ab và F18ac, F18ac thường liên quan đến PWD, trong khi F18ab liên quan đến bệnh phù nề³⁰.

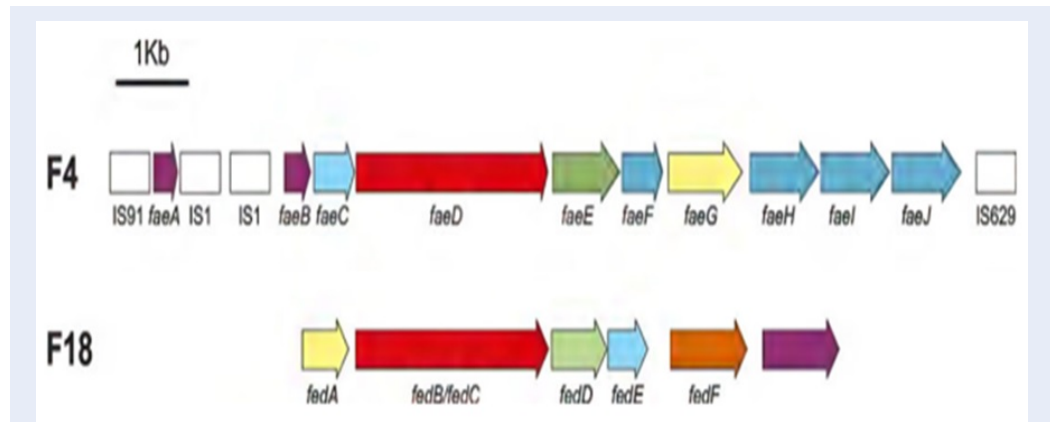
Tiêm mao bám vào lớp biểu mô ruột thông qua tương tác với các thụ thể tương ứng của chúng trên biểu mô ruột. Các nghiên cứu đã cho thấy rằng có sự khác nhau giữa thụ thể của F4 (F4 receptor, F4R), và F18 (F18 Receptor, F18R), cụ thể chúng được mã hóa bởi các gene ở trên các nhiễm sắc thể (NST) khác nhau, trong đó NST số 6 chứa gene mã hóa cho F18R³¹, và NST số 13 mang gene mã hóa cho F4R³². Sự hiện diện, biến đổi, và mất đi của các thụ thể này trên bề mặt tế bào biểu mô ruột thay đổi theo độ tuổi của heo. F4R chỉ có ở heo con mới sinh, hiếm khi tìm thấy ở heo 6 tháng tuổi^{33,34}. Đối với chủng ETEC/F18, thụ thể của chúng xuất hiện và tăng lên ở tuần thứ ba sau khi sinh. Không phải tất cả các thể heo đều có gene mã hóa cho hai thụ thể này, nếu gene này không tồn tại trong bộ NST thì cá thể đó có thể kháng lại chủng ETEC gây bệnh, tuy nhiên khả năng này rất hiếm xảy ra.

Độc tố (enterotoxins)

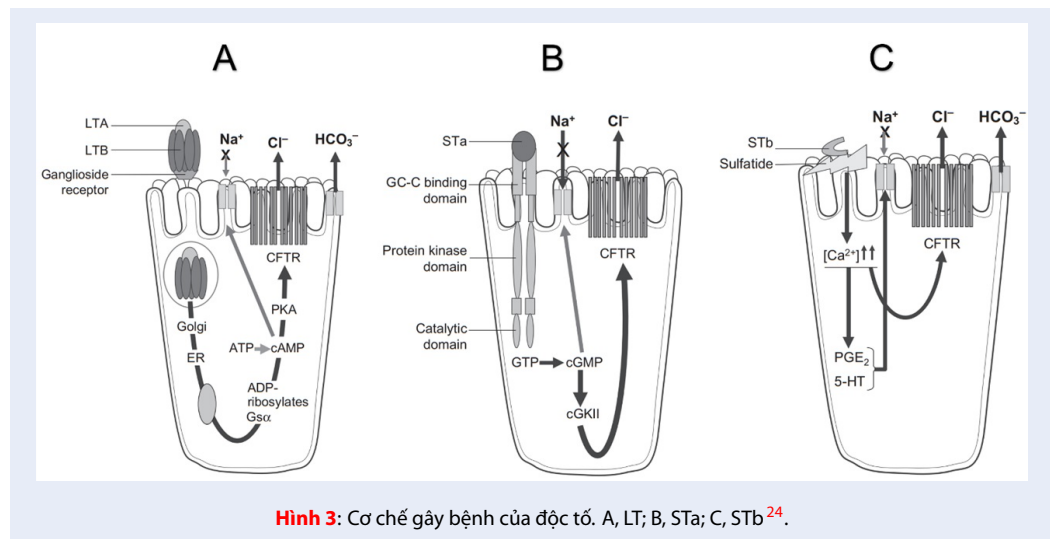
Sau khi bám lên biểu mô ruột, bước tiếp theo trong quá trình gây bệnh của ETEC là tiết các ngoại độc tố. Các độc tố này tác động, làm rối loạn các quá trình trao đổi muối, nước, khiến nước từ cơ thể tập trung vào lòng nhung ruột. Độc tố này chủ yếu là hai nhóm lớn: độc tố nhạy nhiệt (heat-labile enterotoxin, LT) bị bất hoạt ở nhiệt độ 60°C trong 15 phút và độc tố bền nhiệt (heat-stable enterotoxin, ST) ổn định ở 100°C trong 15 phút²⁴. Cơ chế gây bệnh của độc của các loại độc tố được mô tả trong Hình 3.

Độc tố LT là độc tố có tính hướng thần kinh và gây hoại tử, khối lượng phân tử khoảng 85 kDa, có cấu trúc hai tiểu phần: LTA (gồm A1 và A2 nối với nhau bằng cầu nối disulfide) và LTB (pentamer), tiểu phần LTA gắn với tiểu phần LTB bằng liên kết không cộng hóa trị thông qua tiểu phần LTA2. Tiểu phần LTB gắn với ganglioside GM1, một phân tử có ở biểu mô ruột, sau đó tiểu phần A1 gây tiêu chảy^{24,35,36}. LTB là kháng nguyên tiềm năng, có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch niêm mạc, giúp bảo vệ vật chủ trước các tác nhân xâm nhiễm qua con đường này.

Độc tố ST, gồm có STa, STb (hay STIII) và một lượng nhỏ enteroaggregative heat-stable toxin 1 (EAST1), trong đó STb là nguyên nhân chính gây bệnh PWD^{14,37,38}. STb có hai cầu nối disulfide (Cysteine10–Cysteine48 và Cysteine21–Cysteine36), tạo nên cấu trúc thứ cấp, gây độc, có khối lượng phân tử nhỏ, khoảng 5,2 kDa, gắn lên tế bào biểu mô ruột thông qua thụ thể sulfatide (3'-sulfogalactosylceramide)^{24,39}. Việc tương tác với thụ thể của STb làm tăng ion Ca^{2+} đi vào trong tế bào, hoạt hóa protein kinase C, và hoạt hóa cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, việc hoạt hóa kênh ion này làm tăng tiết các ion Cl^- và HCO_3^- , giảm hấp thụ Na^+ , dẫn nước từ trong tế bào thẩm thấu ra ngoài lòng ruột, dẫn đến tiêu chảy²⁴. Ngoài ra, mức độ Ca^{2+} cao trong tế bào còn điều hòa hoạt động của phospholipase A2, giải phóng arachidonic acid từ màng phospholipid, hình thành prostaglandin E2, 5 hydroxytryptamine, chuyển nước và các chất điện giải ra khỏi tế bào^{20,24}. STb có tính sinh miễn dịch kém, và cần được cải thiện bằng cách dung hợp với một protein hoặc một phân tử mang có tính sinh miễn dịch mạnh⁸. Độc tố STa có khối lượng phân tử nhỏ, khoảng 2 kDa, bản chất là một peptide gồm ba liên kết disulfide⁴⁰, và cũng có tính sinh miễn dịch kém⁴¹. STa chủ yếu gây ra bệnh tiêu chảy ở heo sơ sinh với các triệu chứng lâm sàng tương tự như độc tố LT. STa gây bệnh thông qua việc liên kết với guanylate cyclase C (GC-C), làm tăng nồng độ Cyclic guanosine monophosphate (cGMP), cuối cùng dẫn đến tiêu



Hình 2: Cụm gene mã hoá tiêm mao F4 và F18 ở ETEC. Tiểu phần chính (vàng), các tiểu phần phụ (xanh dương), tiểu phần phụ bám dính (cam), chaperone (xanh lá), dẫn đường (đỏ), điều hòa (tím), tác nhân di động và tiếp hợp (trắng). Riêng faeG của F4 vừa là tiểu phần chính vừa là tiểu phần bám dính¹⁴.



Hình 3: Cơ chế gây bệnh của độc tố. A, LT; B, STa; C, STb²⁴.

chảy. Một loại độc tố ST khác là EAST1, khoảng 4,1 kDa, có cấu hình giống với STa^{24,42}. Tuy nhiên, STa và EAST1 ít được phát hiện trên chủng ETEC gây bệnh PWD. Các độc tố trên tác động cộng gộp với nhau gây mất chất điện giải, làm nước đi từ trong tế bào vào lòng ruột, làm căng ruột, cùng với khí do lên men ở ruột gây tác động cơ học, làm nhu động ruột tăng, đẩy nước ra ngoài, gây nên hiện tượng tiêu chảy từ nhẹ đến nặng và có thể dẫn đến tử vong²³.

BIỆN PHÁP ĐIỀU TRỊ BỆNH TIÊU CHẢY Ở HEO CON SAU CAI SỮA

Để điều trị bệnh đường tiêu hóa, biện pháp thường sử dụng đó là kháng sinh. Tuy nhiên, việc điều trị bệnh bằng kháng sinh đòi hỏi chi phí cao trong khoảng thời gian dài, tỷ lệ tử vong cao nếu không được điều trị

kịp thời hoặc không đúng cách, và có thể ảnh hưởng tiêu cực đến hệ vi sinh vật đường ruột. Ngoài ra, việc lạm dụng kháng sinh đã và đang làm gia tăng hiện tượng kháng kháng sinh ở vi khuẩn đường ruột nói chung, và *E. coli* nói riêng, làm giảm hiệu quả điều trị. Hiện tượng kháng kháng sinh của các chủng ETEC đã được ghi nhận trên thế giới và cả ở Việt Nam^{19,43}. Tuy nhiên, những nghiên cứu này đã được thực hiện khá lâu, có thể tình trạng đề kháng kháng sinh của các chủng này đã phức tạp hơn, với nhiều kiểu đa kháng khác nhau. Như vậy, việc sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi vẫn là một giải pháp có rất nhiều rủi ro. Tốc độ tìm kiếm các loại kháng sinh mới ngày càng chậm lại, trong khi tốc độ tiến hóa của vi sinh vật thì luôn gia tăng. Bên cạnh đó, nhu cầu nâng cao chất lượng thực phẩm, loại bỏ các sản phẩm dư lượng kháng sinh

trong tiêu dùng ngày càng cao. Vì thế, nhiều quốc gia và các nước thuộc Liên minh Châu Âu đã ban hành lệnh cấm sử dụng đối với một số loại kháng sinh. Vấn đề kháng kháng sinh không những ảnh hưởng đến ngành nông nghiệp, chăn nuôi, mà còn ảnh hưởng đến cả sức khỏe cộng đồng. Tổ chức Y tế Thế giới cho biết hằng năm có khoảng 700.000 ca tử vong với nguyên nhân các bệnh mắc phải đã trở nên khó điều trị do tình trạng kháng kháng sinh. Nếu vấn đề này không được kiểm soát, với tốc độ gia tăng như hiện nay, con số có thể lên tới 10.000.000 vào năm 2050⁴⁴. Vì vậy, nhằm hạn chế hiện tượng đề kháng trong quần thể vi khuẩn, ngành chăn nuôi cần hạn chế tối đa việc sử dụng kháng sinh để điều trị tiêu chảy cũng như các bệnh nhiễm khuẩn khác cho heo con. Nhằm đáp ứng mục tiêu đó, các chiến lược phòng bệnh hiệu quả cần được nghiên cứu, phát triển.

Ngoài sử dụng vắc xin, sử dụng một số chế phẩm khác nhằm điều trị bệnh tiêu chảy như: chế phẩm Biosubtyl, làm giảm 42% số heo tiêu chảy ở heo con giai đoạn từ 1–60 ngày tuổi⁴⁵; chế phẩm VITOM 1.1 (chứa *Bacillus subtilis* chủng VKPMV-7092) cho heo con từ sơ sinh đến 3 tuần tuổi⁴⁶; dùng kháng thể kháng *E. coli* từ lòng đỏ trứng gà để điều trị⁴⁷.

BIỆN PHÁP PHÒNG BỆNH TIÊU CHẢY Ở HEO CON SAU CAI SỮA

Các biện pháp phòng bệnh tập trung vào các vấn đề về môi trường, vật chủ và mầm bệnh như: tập trung phát triển kỹ thuật chăn nuôi sinh sản, kỹ thuật bảo vệ sức khỏe heo con⁴⁸; giữ ấm và sưởi cho heo con sơ sinh vào mùa đông, dọn vệ sinh chuồng nuôi, đem ủ nhiệt sinh vật, định kỳ tẩy uế, tiêu độc chuồng trại và dụng cụ chăn nuôi^{49,50}; hạn chế, loại trừ các yếu tố gây stress, khắc phục những yếu tố thời tiết bất lợi để tránh rối loạn tiêu hóa⁵¹. Tuy nhiên, biện pháp phòng ngừa hiệu quả nhất vẫn là sử dụng vắc xin.

Vắc xin là chế phẩm sinh học chứa các kháng nguyên có tác dụng gây đáp ứng miễn dịch, tạo miễn dịch chủ động giúp vật chủ chống lại các tác nhân xâm nhiễm. Vắc xin kích thích sản xuất kháng thể đặc hiệu như Immunoglobulin G (IgG) và Immunoglobulin A (IgA), ngăn cản sự bám dính, trung hòa độc tố, tiêu diệt vi khuẩn, giúp bảo vệ heo trước các tác nhân xâm nhiễm. Có thể kể đến một vắc xin là Rokovac Neo, để phòng bệnh tiêu chảy do Rotavirus và các chủng của *E. coli*. Các phương pháp chủng ngừa bằng vắc xin hiện nay có thể kể đến là: tiêm dưới da, trong da, dưới cơ, ngoài ra còn có vắc xin dạng uống.

Vắc xin phòng ngừa bệnh tiêu chảy ở heo con sau cai sữa phải hoạt hóa được hệ miễn dịch màng nhầy ở ruột cũng như tạo ra các kháng thể tiết đặc hiệu IgA

hoặc IgM^{52,53}. Ở heo, ruột non là khu vực chính sản xuất IgA và IgM. Tại màng mô liên kết ruột (Lamina propria) của heo 4 tuần tuổi, lượng tế bào tiết IgA và lượng tế bào tiết IgM là tương tự nhau, và gia tăng theo tuổi đời của heo. Khi heo đạt 12 tuần tuổi, một lượng lớn tế bào tiết IgM sẽ chuyển thành tế bào tiết IgA⁵⁴.

Để kích hoạt đáp ứng miễn dịch màng nhầy ở ruột, chiến lược được chú ý đến là cho uống chủng vi khuẩn sống nhược độc, hoặc chủng hoang dại không có độc tính có mang kháng nguyên bám dính. Vắc xin được trộn với nước uống của heo con đã cai sữa, hoặc uống trực tiếp vào thời điểm dự đoán một tuần trước khi xuất hiện bệnh. Điều này giúp các kháng nguyên được đưa vào cơ thể có thể xâm chiếm thành ruột, kích thích cơ thể tạo đáp ứng miễn dịch, tổng hợp nhiều kháng thể với lượng đủ nhiều để chống lại sự xâm nhập của các chủng gây bệnh. Phương pháp tiếp cận này cho thấy sự hiệu quả trong việc kiểm soát ETEC mang gen F4 và F18, tuy nhiên sự xâm chiếm thành ruột của các kháng nguyên có trong vắc xin có thể bị ức chế bởi các kháng thể được cung cấp từ sữa mẹ, làm giảm hiệu lực của vắc xin⁵⁴.

Các nghiên cứu gần đây đã sử dụng kháng nguyên F4 tinh sạch qua đường miệng thay vì toàn bộ tế bào vi khuẩn như một loại vắc xin phòng PWD. Loại vắc xin tiểu phần F4 này giúp gia tăng các tế bào có khả năng tiết kháng thể, chủ yếu là IgM, trong các nốt Peyer (Peyer's patches), hạch bạch huyết trung thất (Mediastinal lymph nodes), máu và màng mô liên kết ruột⁵⁴. Từ đây, có thể nhận thấy vắc xin tiểu phần, chỉ chứa kháng nguyên protein có sinh miễn dịch mang nhiều ưu điểm: dễ tạo và thu nhận, kích thích tạo đáp ứng miễn dịch đặc hiệu hiệu quả, tránh rủi ro từ khả năng hồi tính, cũng như giảm tỷ lệ ETEC cường độc được đưa trở lại môi trường bên ngoài qua đường bài tiết phân. Để có thể phát triển được loại vắc xin này, đầu tiên cần lựa chọn và chuẩn bị nguồn kháng nguyên có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch hiệu quả.

Nhận thấy các nhân tố bám dính cũng độc tố đều là kháng nguyên protein tiềm năng để phát triển vắc xin phòng bệnh, rất nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm tạo ra vắc xin phòng bệnh PWD do ETEC gây ra.

VẮC XIN DỰA TRÊN NHÂN TỐ BẮM DÍNH (TIÊM MAO)

Vắc xin uống tiểu đơn vị

Vắc xin uống là loại vắc xin được quan tâm đến nhiều nhất để nhắm đến mục tiêu phòng bệnh. Vào năm 1999, Van den Broeck và cộng sự đã chứng minh rằng

tiêm mao F4ac tinh sạch có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch thông qua đường uống. Thử nghiệm cho heo cai sữa uống F4ac tinh sạch với liều lượng 1 mg trong ba ngày liên tiếp và liều tăng cường vào ngày thứ 16 đã cho thấy khả năng chống lại chủng ETEC/F4⁵⁵. F4R hiện diện ở ruột khá ít nhưng lại đóng vai trò quan trọng trong quá trình xâm nhiễm cũng như là tạo ra đáp ứng miễn dịch khi được gây đáp ứng bằng F4 tinh sạch. Tuy nhiên, ở những con heo không biểu hiện F4R thì không ghi nhận đáp ứng miễn dịch sau khi cho uống F4 tinh sạch⁵⁵. Joensuu và cộng sự (2006) đã đề xuất việc sử dụng cây cỏ linh lăng biến đổi gene làm một phương tiện vận chuyển F4 và tiểu đơn vị chính FaeG an toàn và chi phí thấp cho. Tuy nhiên, việc này làm giảm mức độ đáp ứng miễn dịch. Vì vậy, tá được CT (Chorela toxin) được sử dụng bổ trợ đã giúp nâng cao khả năng chống lại ETEC/F4⁵⁶. Trong khi đó, cho uống tiêm mao F18 tinh sạch lại không thể tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại *E. coli*/F18 với liều lượng lên đến 30 mg kết hợp với LT_{R192G} (kháng nguyên LT đột biến, không gây độc)⁵⁷. Kết quả như vậy là do sự khác nhau về cấu trúc của F18 và F4. Có thể thấy, phát triển vắc xin dựa vào tiêm mao F18 đã được thực hiện nhưng không mang lại khả năng bảo vệ heo con khỏi bệnh PWD. Phần bám dính của F18 là FedF khá nhỏ và tương tác yếu với FedA, rất khó tạo đáp ứng miễn dịch, vì vậy dễ dàng bị phân huỷ trong ruột khi tồn tại đơn lẻ^{58,59}, trong khi phần bám dính của F4 là FaeG biểu hiện mạnh⁶⁰. Thêm nữa, sự tương tác giữa FedF và FedA không ổn định, càng gây bất lợi về mặt cấu trúc khi được đưa vào đường ruột^{57,58}. Tuy nhiên, trong những nghiên cứu gần đây, việc gây đáp ứng bằng FedF tái tổ hợp kết hợp với tiêm mao F4 bổ trợ đã làm giảm *E. coli*/F18 trong phân⁵⁹. Từ những điều trên có thể thấy tiềm năng phát triển vắc xin kết hợp có thể chống lại sự xâm nhiễm của cả F4 lẫn F18. Năm 2020, Mai Quốc Gia và cộng sự⁶¹ đã biểu hiện thành công protein dung hợp giữa protein neo α -agglutinin của *Saccharomyces cerevisiae* và nhân tố bám dính F18 trên bề mặt tế bào nấm men *Pichia pastoris*. Việc biểu hiện kháng nguyên trên hệ thống nấm men vừa giúp đảm bảo tính toàn vẹn của kháng nguyên, vừa biểu hiện được kháng nguyên trên bề mặt, đây là cơ sở có thể ứng dụng để tạo ra vắc xin- uống hiệu quả không chỉ riêng vắc xin phòng ETEC.

Vắc xin uống nhược độc

Một hướng phát triển khác đó là sử dụng chủng ETEC bất hoạt và nhược độc để làm vắc xin. Sau khi uống, các vi khuẩn bất hoạt hoặc nhược độc sẽ bám vào tế bào biểu mô ruột và kích hoạt miễn dịch niêm mạc đường ruột.

Năm 2003, một nghiên cứu đã chứng minh khả năng làm giảm triệu chứng của PWD, thử nghiệm chủng ngừa cho heo bằng đường uống là một chủng ETEC nhược độc có biểu hiện F4ac chỉ hiệu quả nếu có kết hợp với việc tiêm Levamisole (một chất điều hòa miễn dịch) vào cơ ba ngày liên tiếp trước khi gây đáp ứng miễn dịch⁶². Năm 2008, Coliprotec, một loại vắc xin uống chống lại chủng ETEC biểu hiện F4 gây bệnh PWD đã được thương mại hóa ở Canada, sau đó lần lượt ở các nước khác như Brazil (năm 2011), Mỹ và Mexico (năm 2012), và Châu Âu (năm 2014). Loại vắc xin uống nhược độc, chứa *E. coli* biểu hiện F4 nhưng không tiết độc tố. Coliprotec cho thấy hiệu quả giúp chống lại chủng ETEC/F4 và đã được chứng minh độ an toàn ở các trang trại heo ở ba tỉnh của Canada. Vắc xin này có thể sử dụng dễ dàng bằng cách cho vào nước uống của heo và theo khuyến cáo nên dùng cho heo khỏe mạnh sau cai sữa 17 ngày. Tuy nhiên, ETEC/F4 gây bệnh PWD chỉ sau khoảng ba đến mười ngày sau khi cai sữa, vì vậy, sẽ có một khoảng thời gian heo sau cai sữa không được bảo vệ⁶³.

Để cải thiện tính hiệu quả, vắc xin được sử dụng vào giai đoạn heo con đang bú. Một nghiên cứu được tiến hành với kết quả khả quan. Ở thí nghiệm này, 10 ngày trước cai sữa, heo con được sinh ra được chủng ngừa đường uống bằng vắc xin *E. coli*/F18ac trong ba ngày liên tiếp. Sau khi cai sữa từ 9 đến 11 ngày, heo được cho tiếp xúc với vi khuẩn gây bệnh trong ba ngày liên tiếp. Mặc dù lượng IgA kháng đặc hiệu F18ac trong huyết thanh tăng đáng kể nhưng lại không cho thấy khả năng bảo vệ khỏi sự xâm nhiễm của tác nhân gây bệnh. Bên cạnh đó, cũng không có sự phản ứng bảo vệ chéo đối với F18ab⁶⁴.

Đóng gói vắc xin uống

Để đảm bảo tính toàn vẹn của vắc xin, chiến lược được nhắm đến là đóng gói kháng nguyên để bảo vệ khỏi acid, enzyme khi đi qua đường tiêu hoá, hoặc chống lại khả năng trung hoà của các kháng thể trong sữa của heo nái⁶⁵.

Năm 2000, chủng *E. coli*/F18 và tiêm mao F18 được đóng gói vào vi cầu poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) bằng phương pháp sấy phun, được sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch đường uống ở heo sơ sinh và heo cai sữa. Kết quả cho thấy tiêm mao F18 tinh sạch cũng như *E. coli*/F18 được đóng gói trong PLGA đều không cho thấy hiệu quả đáp ứng miễn dịch bảo vệ heo khỏi sự xâm nhiễm của vi khuẩn. Nguyên nhân có thể do PLGA không bị phân huỷ trong ruột, hoặc PLGA đã được vận chuyển qua tế bào M khiến cho kháng nguyên không thể giải phóng từ đó làm giảm đáp ứng miễn dịch⁶⁶.

Một hệ thống đóng gói có thể phân giải trong ruột non để giải phóng kháng nguyên khác đã được áp dụng. Thử nghiệm được thực hiện để thử khả năng gây đáp ứng miễn dịch chống lại ETEC/F4 trong giai đoạn heo còn đang bú bằng tiêm mao F4 tinh sạch dạng viên nang và tiêm mao F4 dạng hoà tan trong dung dịch⁶⁷. Mặc dù cả hai dạng đều gây đáp ứng miễn dịch nhưng vẫn không cho thấy khả năng bảo vệ heo khỏi tác nhân xâm nhiễm⁶⁷. Một nghiên cứu khác đã sử dụng hạt nano methylvinylether-co-maleic anhydride (Gantrez® AN) để đánh giá khả năng bảo vệ khỏi ETEC/F4. Thêm vào đó, nhóm nghiên cứu còn bổ sung Wheat Germ Agglutinin – bao bọc hạt nano – để nhắm đến tế bào ruột. Trong bốn nghiệm thức, thì chỉ có tiêm mao F4 trộn với hạt nano Gantrez® AN trông là giúp chống lại sự xâm nhiễm của ETEC/F4⁶⁸. Ở những nghiệm thức khác, tiêm mao F4 đóng gói trong hạt nano Gantrez® AN chỉ làm tăng nhẹ kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh, còn lại đều không cho thấy hiệu quả bảo vệ. Như vậy, hạt nano Gantrez® AN phù hợp để làm chất hỗ trợ như tá được⁶⁸. Các nghiên cứu trên cho thấy việc đóng gói và cho heo uống trong giai đoạn chưa cai sữa mẹ đã không mang lại hiệu quả bảo vệ heo trước các chủng ETEC gây bệnh PWD.

Vắc xin tiêm

Vắc xin tiêm được sử dụng để tránh tác động của các nhân tố trong sữa khi chúng ngừa cho heo còn đang bú. Vắc xin tiêm chủ yếu kích thích đáp ứng miễn dịch hệ thống tiết IgG. Một nghiên cứu cho biết khi gây đáp ứng đường uống bằng ETEC/F4 bất hoạt và đường tiêm đều không kích hoạt đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở cả mô hình chuột và heo. Vậy, vắc xin tiêm có nhiều điểm hạn chế, không hiệu quả để gây đáp ứng miễn dịch niêm mạc ở ruột để chống lại PWD⁶⁹.

Ở nghiên cứu khác, liều lượng kháng nguyên cũng có tác động đến hiệu quả gây đáp ứng miễn dịch bằng đường tiêm. Với liều lượng kháng nguyên lần lượt là 1; 0,1 và 0,01 mg tiêm mao F4, liều lượng 0,1 mg thích hợp nhất để kích hoạt đáp ứng miễn dịch, lượng IgA đặc hiệu F4 cao nhất, với liều lượng 1 mg, cần thêm liều tăng cường để cải thiện hiệu quả đáp ứng miễn dịch. Liều lượng 1 mg F4 gây đáp ứng sơ cấp (IgG và IgM đặc hiệu F4) thấp hơn so với liều 0,1 và 0,01 mg, nhưng sau liều tăng cường đáp ứng IgM đặc hiệu F4 sẽ được cải thiện. Liều lượng 0,1 mg F4 gây đáp ứng với IgA đặc hiệu F4 cao hơn so với liều lượng 1 và 0,01 mg. Hơn nữa, liều 0,1 và 0,01 mg F4 cho thấy số lượng nhiều hơn tế bào tiết kháng thể IgA và IgG đặc hiệu F4 ở hạch bạch huyết cục bộ của heo⁷⁰.

Để chuyển hướng từ đáp ứng miễn dịch hệ thống sang đáp ứng miễn dịch màng nhầy tạo IgA, Van der Stede

và cộng sự đã sử dụng 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (1 α ,25(OH)₂D₃), một steroid hormone có tác dụng hỗ trợ điều hoà đáp ứng miễn dịch Th2^{71,72}. Các cá thể heo mô hình được tiêm đồng thời cả kháng nguyên và vitamin D₃ giảm đáng kể tình trạng bệnh tương quan với đáp ứng IgA thứ cấp. Kết quả này cho thấy rằng các tế bào miễn dịch B nhớ đã xuất hiện ở Gut-associated lymphoid tissue (GALT) vào thời gian thực hiện thí nghiệm⁷¹.

Một khó khăn khác trong việc phát triển vắc xin phòng ETEC đó là tính không đồng nhất của kháng nguyên (tổ hợp nhiều nhân tố bám dính và độc tố). Vì vậy, một chiến lược phát triển vắc xin được hỗ trợ bằng mô hình hoá protein và mô phỏng động lực học phân tử dựa vào cấu trúc gọi là multiepitope fusion antigen (MEFA) hay tạm gọi là kháng nguyên dung hợp đa epitope để tạo ra vắc xin phòng ETEC hiệu quả, an toàn và giải quyết được vấn đề không đồng nhất kháng nguyên. MEFA đã được nghiên cứu trước đó với các chủng ETEC gây bệnh ở người^{73,74}. Nhằm mục tiêu phát triển vắc xin phòng ETEC, trong nghiên cứu của Qiangde Duan và cộng sự⁷⁵ năm 2020, nhóm tác giả đã tạo ra hai MEFA sử dụng tiểu phần chính của F4 là FaeG và tiểu phần chính của F18 là FedF để làm xương sống gắn những tiểu phần khác của tiêm mao F5, F6 và F41 lần lượt là FanC, FasA và Fim41a để cuối cùng tạo ra hai kháng nguyên dung hợp FaeG-Fim41a-FanC-FasA và FedF-FasA-Fim41a-FanC. Sau đó, hai MEFA này được đồng gây đáp ứng bằng đường tiêm trên mô hình chuột. Kháng huyết thanh thu từ chuột được trộn với chủng ETEC gây bệnh và được bổ sung vào môi trường nuôi cấy của hai dòng tế bào ruột heo là IPEC-1 và IPEC-J2. Kết quả cho thấy rằng khả năng bám của ETEC lên hai dòng tế bào này đều giảm đi đáng kể ($p < 0.05$). Có thể, sau khi được đồng gây đáp ứng, các cá thể chuột đều tạo kháng thể ngăn chặn sự bám của chủng ETEC biểu hiện tiêm mao tương ứng, đây có thể là kháng nguyên tiềm năng để phát triển vắc xin.

VẮC XIN DỰA TRÊN ĐỘC TỐ

Để tạo ra vắc xin vừa an toàn, vừa đảm bảo tính hiệu quả, đặc biệt là đối với các loại độc tố nguy hiểm, cần có lưu ý một số vấn đề. Các phân tử độc tố mục tiêu cần được sửa đổi để không còn khả năng gây độc nhưng vẫn phải mang đặc tính sinh miễn dịch⁷⁶.

Các nghiên cứu trước ở mô hình chuột con sơ sinh đang bú sữa đã ước tính tỷ lệ mol của kháng thể kháng độc tố ST cần để trung hoà độc tố là 1:1⁷⁷. Nhưng chưa có thông tin chính xác về lượng độc tố mà ETEC tiết ra khi xâm nhiễm và đôi khi cơ thể không thể tạo ra đáp ứng hiệu quả để trung hoà hoàn toàn độc tố. Tuy nhiên, việc chủng ngừa bằng vắc xin

dù không cung cấp sự bảo vệ toàn vẹn nhưng cũng góp phần chống lại độc tố, giúp hạn chế tác động của ETEC⁷⁸. Một vấn đề khác cần phải quan tâm khi tạo vắc xin từ độc tố là khả năng phản ứng chéo giữa các kháng thể kháng độc tố và các peptide nội sinh, cụ thể, STa có trình tự và cấu hình giống với guanylin và uroguanylin và cùng tương tác với thụ thể GC-C⁷⁸⁻⁸⁰. Vì vậy, vắc xin lý tưởng phải vừa an toàn, hiệu quả và không xảy ra phản ứng chéo không mong muốn.

Vắc xin uống

Sử dụng vắc xin uống cho heo nái trước khi sinh có thể cung cấp miễn dịch thụ động cho heo con thông qua sữa, và giúp bảo vệ heo con khoảng một tuần trong điều kiện nuôi bình thường¹⁸. Tuy nhiên, sự bảo vệ toàn diện và hiệu quả trước PWD vẫn thiếu⁸¹. Ở khu vực Bắc Mỹ, chủng ETEC gây ra tiêu chảy chủ yếu là những chủng biểu hiện tiêm mao F4ac và F18⁸². Vì vậy, ở giai đoạn đầu chủ yếu phát triển vắc xin dựa trên tiêm mao và các thử nghiệm trên heo cai sữa đã cho thấy kết quả của vắc xin dựa trên đường uống hiệu quả hơn so với đường tiêm cơ. Tuy nhiên, ở một số quốc gia khác như Trung Quốc, Hà Lan, Nhật Bản, Thụy Điển hiếm khi tìm thấy trên các chủng ETEC gây bệnh cho heo con¹¹. Vì vậy các loại vắc xin dựa trên tiêm mao có thể ít hiệu quả, từ đây vắc xin dựa trên kháng nguyên độc tố ruột được tập trung nghiên cứu¹¹.

Với loại vắc xin uống nhược độc, vài nghiên cứu đã sử dụng chủng *E. coli* nhược độc biểu hiện kháng nguyên dung hợp nhân tố bám dính – độc tố. Từ lâu, *E. coli* là hệ thống biểu hiện protein tái tổ hợp phổ biến, *E. coli* có thể sử dụng để biểu hiện kháng nguyên của ETEC, vừa có thể vận chuyển và bảo vệ kháng nguyên tốt hơn. Một thử nghiệm trên mô hình chuột, các nhóm chuột không xuất hiện dấu hiệu bệnh khi được cho uống vi khuẩn *E. coli* biểu hiện kháng nguyên dung hợp LT_{R192G}-STa_{A13Q} và LT_{R192G}-STb với liều lượng vi khuẩn cao (10⁹ CFU). Các nhóm chuột kích thích đáp ứng miễn dịch hệ thống và miễn dịch màng nhầy với các kháng thể IgG và IgA đặc hiệu kháng LTA, LTb, STa, STb và miễn dịch qua trung gian tế bào (type-2 helper T lymphocyte, Th2). Với nghiên cứu, *E. coli* được cho là vật mang kháng nguyên hiệu quả để sử dụng làm vắc xin chống ETEC¹⁰.

Với mục tiêu kết hợp tiêm mao và độc tố, trong một nghiên cứu khác đã tạo ra chủng *E. coli* biểu hiện kháng nguyên dung hợp có cấu trúc giống với cấu trúc của LT (1A:5B). Cụ thể cấu trúc kháng nguyên dung hợp là 1FaeG–FedF–LT_{R192G}A2:5LTb (FaeG của F4, FedF của F18, tiểu phần A2 dung hợp tiểu phần B của LT). Những cá thể được cho uống chủng *E. coli*

nhược độc biểu hiện kháng nguyên dung hợp không hề xuất hiện triệu chứng bệnh mà còn đã kích hoạt đáp ứng miễn dịch màng nhầy và miễn dịch hệ thống. Sau đó, khi được cho tiếp xúc với chủng ETEC 3030-2 (K88ac/LT/STb), các cá thể đều không xuất hiện tiêu chảy, cũng như rất ít ETEC được tìm thấy ở ruột non khi so sánh với nhóm đối chứng⁸¹. Vì vậy, đây là kháng nguyên dung hợp nhân tố bám dính–độc tố, rất phù hợp để phát triển vắc xin uống chống ETEC nói chung và PWD nói riêng.

Độc tố ST, được xem là nhân tố quyết định gây nên bệnh PWD ở heo, vì vậy việc nhắm đến tạo ra vắc xin dựa trên độc tố này rất quan trọng⁸³. Năm 2019, Feng và Guan cũng đã tạo ra chủng *E. coli* biểu hiện kháng nguyên dung hợp mang đầy đủ độc tố của ETEC LTA-STa_{A13Q}-STb-LTA2-LTb-STa_{A13Q}-STb. Kháng nguyên dung hợp này được chứng minh là đã mất đi độc tính, và an toàn trong thí nghiệm *in vitro* và *in vivo*. Sau đó, thử nghiệm gây đáp ứng miễn dịch bằng đường uống trên mô hình chuột đã ghi nhận sự gia tăng lượng IgG trong huyết thanh và IgA trong phân. Điều này chứng minh rằng kháng nguyên dung hợp đã kích hoạt đáp ứng miễn dịch hệ thống và miễn dịch màng nhầy. Các kháng thể IgG kháng F41, LTA, LTb, STa và STb đều được tìm thấy trong huyết thanh và phân, và đều có khả năng trung hoà độc tố. Hơn nữa, 42 ngày sau khi gây đáp ứng miễn dịch, kháng thể IgG, IgA đặc hiệu đã được tìm thấy trong sữa, lá lách, hạch bạch huyết, và màng nhầy ở ruột. Ngoài ra, với lượng Interleukin-4 (IL-4) cao hơn Interferon gamma (IFN-γ), kháng nguyên độc tố dung hợp này kích thích đáp ứng miễn dịch theo Th2⁸³.

Vắc xin tiêm

Như đã đề cập ở trên, STa có tính sinh miễn dịch khi kết hợp với protein có tính sinh miễn dịch mạnh khác và độc tố này mất hoạt tính, từ đây Zhang và cộng sự (2010) đã gây đột biến gene mã hoá STa ở ba vị trí amino acid (STa_{N11K}, STa_{P12F} và STa_{A13Q}) và kết hợp với gene mã hoá LT (độc tố LT_{R192G}) tạo ra độc tố dung hợp LT_{R192G}:Sta⁸⁴. Độc tố STa_{P12F} và STa_{A13Q} với việc thay đổi chỉ một amino acid ở vị trí 12 và 13 đều được nhận diện bởi kháng thể kháng STa, chứng minh rằng cấu hình của hai độc tố này không có sự thay đổi lớn so với STa nguyên bản. Hai độc tố này không còn độc tính đáng kể, với những kết quả như không có sự tích nước trong mô hình thất ruột heo, không biểu hiện triệu chứng tiêu chảy ở mô hình heo bệnh và sự gia tăng cGMP ở dòng tế bào T84. Khi gây đáp ứng bằng đường tiêm bắp ở mô hình thỏ với các kháng nguyên độc tố này đều có hiệu giá kháng thể cao ở kháng thể kháng LT và STa (LT₁₉₂:STa₁₂

cao hơn LT₁₉₂:STa₁₃ ở cả IgG, IgA và sIgA). Ngoài ra, kháng thể trong máu và kháng thể trong phân của thỏ vẫn có thể trung hoà độc tố CT (đồng phân của LT) và STa. Hơn nữa, heo con được sinh ra từ heo nái đã chủng ngừa đều được bảo vệ khi thử nghiệm với chủng ETEC/STa.

Một nghiên cứu khác đã thử kết hợp tiểu phần bám dính và tiểu phần độc tố để nhắm đến mục tiêu bảo vệ toàn diện cho heo khỏi ETEC. Nhóm tác giả đã kết hợp FaeG của F4, FedF của F18, tiểu phần A2 dung hợp tiểu phần B của LT, để tạo ra kháng nguyên dung hợp FaeG–FedF–LT₁₉₂A2:B. Kháng nguyên được dùng để gây đáp ứng miễn dịch trên mô hình chuột và heo. Kết quả trên đối tượng thử nghiệm đã tạo ra kháng thể kháng tiêu mao F4, kháng tiêu mao F18, và kháng LT. Các cá thể sau đó đều có khả năng chống lại sự xâm nhiễm của chủng ETEC K88ac/LT/STb và không xuất hiện triệu chứng của bệnh⁸⁵.

Bên cạnh đó, đã có hai nghiên cứu chứng minh heo được bảo vệ khỏi ETEC, còn có thể cung cấp miễn dịch thụ động từ heo mẹ sang heo con. Năm 2017, Nandre và cộng sự đánh giá khả năng tạo đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên dung hợp 3×STa_{N12S}-dmLT, gồm ba độc tố STa_{N12S} dung hợp với độc tố LT mang đột biến kép (LT_{R192G/L211A})⁸⁶. Sau đó, năm 2019, Seo và cộng sự cũng sử dụng kháng nguyên này (3×STa_{N12S}-mnLT_{R192G/L211A}) và kháng nguyên liên kết hoá học là BSA-STa_{A14T} với độc tố STa liên kết với BSA (bovine serum albumin)^{86,87}. Các kết quả thu được chứng minh rằng các kháng nguyên cho khả năng bảo vệ tương tự nhau trên mô hình chuột và heo. Heo nái được tiêm ba loại kháng nguyên trên và sau đó heo con bú sữa được cho tiếp xúc với chủng ETEC/STa. Cả ba nhóm được gây đáp ứng đều tạo ra kháng thể IgG và IgA kháng STa và LT trong huyết thanh cũng như trong sữa non của heo nái. Trong nghiên cứu của Nandre và cộng sự vào năm 2017, heo con được thử nghiệm với chủng ETEC/STa sau 24 tiếng uống sữa từ heo mẹ, thì cả 28 heo con được sinh ra từ heo mẹ được tiêm kháng nguyên đều không có triệu chứng tiêu chảy (chỉ tám cá thể có triệu chứng tiêu chảy nhẹ, chiếm 28,8%), 26/32 heo con thuộc nhóm đối chứng xuất hiện tiêu chảy (chiếm 81,3%). Ngoài ra, tám cá thể heo con từ heo mẹ đã chủng ngừa và tám cá thể heo con đối chứng được tiếp tục thử nghiệm với chủng ETEC/LT. Sau 24 tiếng, chỉ 1/8 cá thể heo con từ heo mẹ đã chủng ngừa có triệu chứng tiêu chảy (chiếm 12,5%), trong khi tỷ lệ này ở nhóm đối chứng là 7/8 cá thể (chiếm 87,5%)⁸⁶. Ở nghiên cứu của Seo và cộng sự vào năm 2019 cũng có thử nghiệm tương tự. Cụ thể, ở nhóm 3×STa_{N12S}-mnLT_{R192G/L211A} có 15/16 cá thể khoẻ

manh (trong đó năm cá thể bị tiêu chảy nhẹ), chỉ một cá thể xuất hiện tiêu chảy nặng (chiếm 6,3%), nhóm BSA-STa_{A14T} có 14/17 cá thể khoẻ mạnh (trong đó hai cá thể bị tiêu chảy nhẹ), ba cá thể còn lại xuất hiện triệu chứng bệnh nặng (chiếm 17,6%)⁸. Như vậy, hai nghiên cứu trên đã chứng minh được rằng việc tiếp nhận miễn dịch thụ động từ heo mẹ của heo con thông qua sữa có thể giúp chống lại chủng ETEC gây tiêu chảy.

Tuy nhiên, STa có sự tương đồng với một số peptide nội sinh như guanylin, uroguanylin nên có thể tạo ra những đáp ứng không mong muốn^{79,80}. Vì vậy, Ngoài STa, độc tố STb cũng đặc biệt được quan tâm và nghiên cứu để phát triển vắc xin phòng PWD nói riêng và ETEC nói chung. Đặc tính sinh miễn dịch yếu của STb đã được phát hiện từ rất lâu và sự kết hợp với phân tử có tính sinh miễn dịch mạnh cũng đã được đề xuất. Năm 1996, Dubreuil và cộng sự đã biểu hiện kháng nguyên độc tố có dung hợp với maltose binding protein (MBP) là MBP-STb (toàn bộ STb) và MBP-STb₂ (vùng epitope của STb từ amino acid thứ 8 đến 30), và đánh giá khả năng tạo kháng thể kháng độc tố này trên mô hình thỏ⁸. Thỏ sau khi được tiêm kháng nguyên MBP-STb đã tạo ra kháng thể trung hoà độc tố STb tự nhiên. Tuy nhiên, kháng nguyên này vẫn còn khả năng gây độc tính. Ngược lại, MBP-STb₂ không gây độc nhưng lại không kích thích đáp ứng miễn dịch hiệu quả. Từ kết quả này, hầu hết các nghiên cứu khác đều biến đổi STb để đảm bảo mục tiêu không gây độc khi sử dụng làm vắc xin.

Các nghiên cứu gần đây hơn sử dụng độc tố LT dung hợp với độc tố STb để tạo ra kháng thể kháng LT và STb ở heo⁸⁸. Ở nghiên cứu này, nhóm tác giả dung hợp độc tố LT_{R192G} với độc tố STb (LT_{R192G}-STb) để tăng cường tính sinh miễn dịch của STb. Kháng nguyên này được chứng minh giảm độc lực trước khi sử dụng gây đáp ứng. Kháng thể kháng LT, STb đều được tạo ra khi gây đáp ứng trên mô hình thỏ và heo. Khả năng trung hoà độc tố của những kháng thể kháng LT được chứng minh bằng thí nghiệm *in vitro*, cụ thể là không làm thay đổi nồng độ cyclic adenosine monophosphate (cAMP) nội bào trong dòng tế bào T84. Không giống với độc tố LT hay STa, độc tố STb không làm tăng mức độ cAMP hay cGMP ở dòng tế bào T84 hay những dòng tế bào khác, nên việc đánh giá độc tính và khả năng trung hoà độc tố của kháng thể kháng STb chỉ được thực hiện trên mô hình thất ruột heo^{37,89,90}. Trong thử nghiệm trên heo với chủng ETEC/STb, tất cả 10 heo con sinh ra từ heo mẹ đã được gây đáp ứng đều khoẻ mạnh, trong khi 7/9 heo con ở nhóm đối chứng xuất hiện triệu chứng tiêu chảy chứng tỏ heo con được sinh ra từ heo nái được gây đáp ứng có kháng thể kháng STb và LT và

chúng đều bảo vệ heo con khi thử nghiệm với chủng ETEC/STb⁸⁸. Nghiên cứu này cũng đưa ra giả thiết là kháng nguyên STb dung hợp tại đầu C của kháng nguyên LT₁₉₂ với đoạn nối dài hơn có thể giúp biểu hiện và nhờ đó tăng cường tính sinh miễn dịch của STb. Ở đây, nhóm tác giả vẫn chưa rõ những kháng nguyên dung hợp như LT₁₉₂-Gly:Pro-STb hay LT₁₉₂-L-linker-STb. Vì vậy, vấn đề này cần được nghiên cứu và đánh giá thêm kháng nguyên dung hợp LT₁₉₂-STb⁸⁸. Để STb trở nên phù hợp cho việc phát triển vắc xin, STb phải được biến đổi làm mất hoạt tính. Đã có nghiên cứu về các đột biến có thể làm giảm hoạt tính của STb. Khi các đột biến F37K, I41S và M42S ở chuỗi xoắn α làm thay đổi tính kỵ nước, làm giảm khả năng tương tác với thụ thể cũng như độc tính giảm đi sáu lần⁹¹. Các đột biến K22A, K23A, and R29A trong vùng lặp từ C21 đến C36 cũng làm giảm tính bám và độc tính của STb⁹¹. Đặc biệt hơn, khi D30 được thay bằng alanine hoặc valine thì khả năng liên kết với thụ thể tăng gấp đôi nhưng độc tính lại giảm một nửa⁹¹. Ngoài ra, STb có hai cầu nối disulfide giúp ổn định cấu trúc thứ cấp, việc gây đột biến làm mất một trong hai hoặc cả hai cầu nối có thể làm giảm độc lực của STb. Một nghiên cứu đã nghiên cứu độc tính của STb khi đột biến mất một trong hai cầu nối disulfide so với STb tự nhiên. Kết quả đã chứng minh khi mất một cầu nối disulfide đã đủ làm mất hoạt tính của STb so với STb tự nhiên⁹². STb đột biến ở C33S và C71S không làm thay đổi cấu trúc thứ cấp của STb, trong khi STb đột biến ở C44S và C59G làm giảm xoắn α ở thể đột biến này⁹². Nhưng khi STb mất cả hai cầu nối disulfide, xoắn α bị mất đi hoàn toàn, từ đó làm mất cấu trúc thứ cấp gây độc của STb. Các thể đột biến STb được tạo ra và nghiên cứu, nhằm vào sự tương tác với thụ thể cũng như cấu hình có thể làm giảm độc lực của STb nhưng không làm thay đổi các epitope, từ đây STb phù hợp với chiến lược vắc xin kháng độc tố của các chủng ETEC gây bệnh.

Một nghiên cứu vào năm 2011 đã tạo ra protein dung hợp ba độc tố STa-LTB-STb, (SLS, trong đó STa mang đột biến mất hoạt tính) bằng công nghệ protein tái tổ hợp, và đánh giá tính sinh miễn dịch và khả năng trung hoà độc tố STa và STb trên mô hình chuột⁹³. Trước hết, SLS được kiểm tra độc tính, cụ thể nhóm chuột được gây đáp ứng miễn dịch bằng SLS đều tạo ra kháng thể đặc hiệu (IgG) kháng ba loại độc tố khi so sánh với các nhóm đối chứng. Khi được thử nghiệm với ETEC bằng đường uống, tỉ lệ sống của các nhóm chuột SLS, LTb và F4ac bất hoạt lần lượt là 70%, 40% và 20% so với nhóm đối chứng. Nghiên cứu này chứng minh được kháng nguyên dung hợp SLS cho khả năng bảo vệ khỏi chủng ETEC. Bên cạnh đó, chúng minh thêm việc chủng ngừa đường uống bằng

chủng vi khuẩn ETEC bất hoạt có nhiều hạn chế và hiệu quả không cao. Ngoài ra, kết quả đánh giá hiệu quả kháng thể bằng ELISA còn cho thấy LTb giúp cải thiện khả năng sinh miễn dịch của STa và STb.

Với những kết quả thu được, đến năm 2018, SLS được kết hợp với tiêm mao F4ac và F5 (thu từ chủng ETEC gây bệnh) để tạo ra kháng nguyên đa thành phần SLS-F4ac-F5, (V_{SFF}), đây là kháng nguyên tiềm năng có thể cung cấp khả năng bảo vệ toàn diện cho heo⁹⁴. Kháng nguyên này được sử dụng để gây đáp ứng cho heo nái và so sánh với nhóm SLS, nhóm tiêm mao F4ac&F5, nhóm ETEC/F41 bất hoạt và nhóm đối chứng. Hiệu giá kháng thể IgG với kháng nguyên tương ứng được đánh giá 30 ngày trước khi heo sinh con. Giá trị hiệu giá kháng thể cuối cùng của IgG trong kháng huyết thanh và IgG trong sữa non kháng các kháng nguyên mục tiêu sau khi tiêm V_{SFF} đều cho chỉ số cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng ($p < 0,05$). Heo con sinh ra từ các nhóm heo nái đều được theo dõi và đánh giá cảm quan để xác định các triệu chứng bệnh. Kết quả, hầu hết heo con đều không biểu hiện bệnh ngoài trừ nhóm đối chứng, điều này càng chứng minh heo con nhận miễn dịch thu động từ heo mẹ thông qua sữa non^{21,94}.

Một khó khăn khác trong việc phát triển vắc xin phòng ETEC đó là tính không đồng nhất của kháng nguyên (tổ hợp nhiều nhân tố bám dính và độc tố). Năm 2020, Lu T và cộng sự⁹⁵ đã ứng dụng MEFA để phát triển và thử nghiệm vắc xin phòng ETEC. Cụ thể, nghiên cứu này tạo MEFA tiêm mao – độc tố gồm có epitope của LT đóng vai trò khung cơ bản để giữ các epitope của hai tiểu đơn vị bám dính của F18 (FedF), hai tiểu đơn vị bám dính của F4 (FaeG), bốn epitope độc tố STb, Stx2e, hai STa_{N11S}. Chuột được tiêm MEFA đáp ứng mạnh với tiêm mao F4, F18, LT, STb, và đáp ứng vừa phải với Stx2e và STa. Các kháng thể thu được sau khi gây đáp ứng với MEFA có thể ức chế khả năng bám của F4 và F18 vào tế bào ruột của heo và trung hoà được 4 loại độc tố. Với kết quả tích cực này đã chứng minh được khả năng tạo ra vắc xin phòng ETEC phổ rộng và cụ thể là PWD. Tuy nhiên vẫn cần đánh giá thêm MEFA về khả năng và hiệu quả trên mô hình heo trong tương lai. Ngoài ra, nhóm tác giả đề xuất thay đổi vector và hệ thống biểu hiện để biểu hiện protein MEFA trên màng tế bào giúp tối ưu protein này cho dạng vắc xin đường uống.

PHÁT TRIỂN VẮC XIN UỐNG ĐỊNH HƯỚNG TẾ BÀO M

Vắc xin đường uống là dạng vắc xin hiệu quả nhất để phòng vi khuẩn gây bệnh đường ruột nói chung và PWD nói riêng. Bên cạnh những ưu điểm, việc tạo

Bảng 1: Các nghiên cứu vắc xin phòng bệnh PWD do ETEC gây ra.

Cách sử dụng	Kháng nguyên	Động vật thử nghiệm	Tài liệu tham khảo
Tiêm	MBP-STb (toàn bộ STb) MBP-STb2 (AA8 -AA30)	Thỏ	1996 ⁸
Uống	F4	Heo	1999 ⁵⁵
Uống	E. coli/F18ac nhược độc	Heo	2000 ⁶⁴
Uống	E. coli/F18 và F18 đóng gói trong poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)	Heo	2000 ⁶⁶
Tiêm	F4	Heo	2002 ⁷⁰
Tiêm	F4-Vitamin D3 F4-CpG-ODN	Heo	2003 ⁷¹
Tiêm Levamisole và đưa trực tiếp vào ruột	E. coli/F4ac nhược độc và tiêm Levamisole	Heo	2003 ⁶²
Uống	F4 trong viên nang, F4 hoà tan	Heo	2003 ⁶⁷
Uống	plant-produced FaeG (pFaeG)	Heo	2006 ⁵⁶
Uống và hít	F18 tinh sạch kết hợp LTR192G	Heo	2007 ⁵⁷
Tiêm	LTR192G:STaP12F LTR192G:STaA13Q	Thỏ và heo	2010 ⁸⁴
Tiêm	6×His-tagged-LT192-L-linker-STb 6×His-tagged-LT192-Gly:Pro-STb	Thỏ và heo	2010 ⁸⁸
Uống	F4 trong Gantrez®AN	Heo	2011 ⁶⁸
Tiêm	6×His-tagged-FaeG-FedF-LT192A2:B	Chuột và heo	2011 ⁸⁵
Tiêm	STa-LTB-STb	Chuột	2011 ⁹³
Uống	1FaeG-FedF-LTR192GA2:5LTB	Heo	2013 ⁸¹
Uống	E. coli/LTR192G-STb E. coli/LTR192G-STaA13Q	Chuột	2015 ¹⁰
Tiêm	3×STaN12S-dmLT (LTR192G/L211A)	Heo	2017 ⁸⁶
Tiêm	STa-LTB-STb-F4ac-F5 F4ac&F5 ETEC/F41 bất hoạt	Heo	2018 ⁹⁴
Uống	LTA-STaA13Q-STb-LTA2-LTB-STaA13Q-STb	Chuột	2019 ⁸³
Tiêm	3×STaN12S-mnLTR192G/L211A BSA-STaA14T	Chuột và heo	2019 ⁸⁷
Tiêm	FaeG-Fim41a-FanC-FasA và FedF-FasA-Fim41a-FanC	Chuột	2020 ⁷⁵
Tiêm	LTA-FedF-STa-Stx2e-FedF-LTA-STa-FaeG-FaeG-Stb	Chuột	2020 ⁹⁵

ra vắc xin uống vẫn đang đối mặt với nhiều khó khăn nhất định. Đầu tiên, vắc xin uống tiêu phần phải đi qua môi trường khắc nghiệt, có độ pH thấp (pH 1–2) trong dạ dày, với một lượng lớn các enzyme phân giải như pepsin, protease, muối mật, v.v, có thể làm ảnh hưởng đến kháng nguyên của vắc xin⁹⁶. Thứ hai, kháng nguyên của vắc xin bị phân tán trong lòng ruột với diện tích bề mặt niêm mạc ruột rộng lớn, kháng nguyên không thể tiếp xúc hoặc thời gian tiếp xúc quá ngắn, nồng độ không đủ để cơ quan miễn dịch nhận diện và tạo đáp ứng miễn dịch. Ngoài ra, các enzyme tiêu hóa như lysozyme, phospholipase A, v.v, không đảm bảo được tính toàn vẹn của kháng nguyên⁹⁷. Thứ ba, ruột có hiện tượng dung nạp miễn dịch do phải tiếp xúc với nhiều kháng nguyên bên ngoài trong quá trình ăn uống hằng ngày nên không thể kích hoạt đáp ứng miễn dịch⁹⁸. Để giải quyết những khó khăn, cần có định hướng kháng nguyên đến tế bào M của hệ miễn dịch niêm mạc đường ruột.

Tế bào M đóng vai trò như cánh cổng miễn dịch và khởi sự các phản ứng miễn dịch niêm mạc ở đường ruột. Tế bào M là tế bào biểu mô ruột chuyên biệt, có ở biểu mô liên kết nang (follicle-associated epithelium), thuộc đốm Payer (Payer's patches). Đây là tế bào có khả năng nhận diện, và vận chuyển kháng nguyên xuyên màng đến tế bào miễn dịch¹². Tuy nhiên số lượng tế bào này trên biểu mô ruột là khá ít, ở chuột và người (5–10%)^{99,100}, ở heo (20–30%)¹⁰¹, nên việc định hướng kháng nguyên đến tế bào M là cần thiết¹⁰². Việc định hướng kháng nguyên này có thể dựa vào sự tương tác giữa phối tử với các thụ thể trên bề mặt tế bào M. Hiện nay, nhiều cặp thụ thể – phối tử trên bề mặt tế bào M đã được phát hiện, và nghiên cứu về cấu trúc lẫn sự tương tác¹⁰³ (Bảng 2). Claudin-4 (Cldn-4) là một protein xuyên màng được tìm thấy ở tế bào M¹⁰⁴, protein này được chứng minh là thụ thể tương tác với *Clostridium perfringens* enterotoxin (Cpe) tại Ecl2 (the second extracellular loop) của Cldn-4^{105,106}. Cơ chế tương tác giữa cặp thụ thể – phối tử Cldn-4/Cpe đã được nghiên cứu rõ ràng^{106,107}. Trong nghiên cứu của Jun Ling và cộng sự (năm 2008), nhóm tác giả đã dung hợp protein hemagglutinin (HA) ở virus cúm A cùng với trình tự hỗ trợ trimer hoá (ts, từ Fibritin-C) cho HA, có thêm đuôi His (mục đích tinh sạch protein) ở đầu C và dung hợp với Cpe30 (30 amino acid ở đầu C của Cpe (HA-ts-HT-Cpe30) và kết quả cho thấy protein dung hợp này vẫn giữ được tương tác với Cldn-4¹⁰⁷. Năm 2009, HA-ts-HT-Cpe30 được gói trong hạt nano PLGA, sau đó được đưa vào cơ thể chuột bằng đường hít và uống để đánh giá khả năng nhắm định hướng đến tế bào M. Qua kiểm tra mô học, có thể xác định sự hiện diện của hạt nano chứa protein ở biểu mô đường

ruột và đường hô hấp trên¹⁰⁸. Ngoài ra, Cldn-4 cũng biểu hiện vượt mức ở nhiều tế bào ung thư như ung thư vú, đại trực tràng và tuyến tiền liệt¹⁰⁹. Vì vậy, ngoài tiềm năng phát triển vắc xin, việc nhắm định hướng Cldn-4 cũng là chiến lược điều trị ung thư.

Thụ thể Glycoprotein-2 (GP2) cũng là một thụ thể tiềm năng khác trên tế bào M được nghiên cứu. Năm 2014, Hideaki Shima và cộng sự đã tạo ra kháng nguyên tái tổ hợp gồm phần Fab (antigen-binding fragment) của kháng thể và một protein kháng nguyên khác, và cụ thể trong nghiên cứu này là anti-GP2-SA, trong đó anti-GP2 là phần Fab từ chuột, SA là treptavidin, và các protein kháng nguyên được gắn biotin. Nhóm tác giả đã chứng minh kháng nguyên này có thể mang protein gắn biotin đến tế bào M ở ruột, kích hoạt đáp ứng miễn dịch niêm mạc tạo sIgA đặc hiệu ngay cả khi không có tá được¹¹⁰. Năm 2017, Inam Ullah Khan và cộng sự đã tìm ra peptide Gb1 có ái lực với thụ thể GP2. Nghiên cứu sử dụng kháng nguyên mô hình enhanced green fluorescence protein (EGFP) dung hợp với peptide Gb1 tạo ra Gb1-EGFP và sau đó đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch ở chuột. Kháng nguyên này không những cho thấy khả năng định hướng đến tế bào M mà còn kích thích đáp ứng miễn dịch niêm mạc và miễn dịch hệ thống thông qua đánh giá kháng thể đặc hiệu thu từ máu và phân, cytokine và sự hoạt hoá các tế bào miễn dịch¹¹¹.

Năm 2018, peptide Co1 nhắm trúng đích tế bào M được sử dụng trong nghiên cứu tạo vắc xin đường uống phòng bệnh tiêu chảy cấp ở heo (Porcine epidemic diarrhea, PED) do porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) gây ra. Sunting Ma và cộng sự¹¹² đã tạo ra vắc xin là chủng vi khuẩn *Lactobacillus casei* 393 (*L. casei* 393, L393) tái tổ hợp dạng uống chống lại PEDV nhắm định hướng tế bào M. Bằng cách sử dụng thêm peptide nhắm trúng đích tế bào tua DCpep (dendritic cell-targeting peptide) mang kháng nguyên COE (core neutralizing epitope) từ protein gai của PEDV để tạo ra chủng tái tổ hợp pPG-COE-Col-DCpep/L393. Chủng này được định hướng đến tế bào M thông qua tương tác peptide Co1 với thụ thể tương ứng sau đó được vận chuyển qua GALT nơi có sự hiện diện của DC. Sau đó, DCpep cho phép DC bắt lấy COE. Hơn nữa, kháng nguyên COE dung hợp với DCpep còn làm COE được bắt trực tiếp bởi các DC ở giữa các tế bào biểu mô. Nhờ đó, kích thích tế bào lympho B tạo sIgA và tăng sinh tế bào lympho T (Th1 và Th2). Tóm lại, chủng *L. casei* 393 biểu hiện COE của PEDV và dung hợp với peptide định hướng tế bào M là Co1 và peptide định hướng DC là DCpep ở ruột hiệu quả trong việc tạo đáp ứng miễn dịch niêm mạc, miễn dịch dịch thể và miễn dịch qua trung gian

tế bào chống lại PEDV qua đường uống. Trong nghiên cứu vắc xin phòng bệnh lở mồm long móng (Foot and mouth disease, FMD) của Fudong Zhang và cộng sự vào năm 2021¹¹³, cũng sử dụng peptide Co1 để định hướng đến tế bào M nhằm phát triển vắc xin uống chống lại virus gây FMD (FMDV). Nhóm nghiên cứu đã tạo ra chủng *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) mang đa kháng nguyên của FMDV và chủng *L. lactis* mang đa kháng nguyên dung hợp với peptide Co1 lần lượt là *L. lactis*-TB1 và *L. lactis*-TB1-Co1. Sau đó đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch bằng đường uống trên mô hình chuột và chuột lang. *L. lactis*-TB1-Co1 cho thấy khả năng tạo đáp ứng miễn dịch vượt trội so với *L. lactis*-TB1, từ việc thúc đẩy tạo IgG và sIgA đến điều hoà sự tăng sinh tế bào lympho T (T CD4⁺ và T CD8⁺) ở chuột. Tóm lại, *L. lactis*-TB1-Co1 có thể tạo được đáp ứng miễn dịch niêm mạc cũng như miễn dịch hệ thống, cung cấp sự bảo vệ chống lại FMDV.

Gần đây hơn, vào năm 2022, nghiên cứu phát triển vắc xin kiểm soát sự xâm nhiễm của *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Trong những nghiên cứu trước, vắc xin đa giá FvpE chống lại bốn yếu tố độc lực chính của *H. pylori* (Urease, CagA, VacA và NAP). Tuy nhiên trong nghiên cứu này, một hệ thống biểu hiện bề mặt nhằm mục tiêu tế bào M cho *L. lactis* có tên là pLSAM được thiết kế để giúp các kháng nguyên kích thích phản ứng miễn dịch hiệu quả trong đường tiêu hóa. Từ đó, tạo ra *L. lactis* tái tổ hợp nhằm mục tiêu tế bào M LL-pLSAM-FvpE và biểu hiện protein SAM-FVpE trên bề mặt vi khuẩn. Thử nghiệm cho uống LL-pLSAM-FvpE và SAM-FVpE bổ sung tá được đều kích thích tạo IgG, sIgA và tế bào lympho T CD4⁺ chống lại bốn yếu tố độc lực của *H. pylori* kể trên¹¹⁴. Đây là, ứng viên vắc xin tiềm năng để bảo vệ khỏi *H. pylori*.

Bên cạnh việc định hướng, thông qua các hệ thống phân phối như: thể mang kích thước nano, vi khuẩn lactic (*Lactobacillus* spp.), nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), các kháng nguyên được dung hợp / liên hợp với các phối tử định hướng tế bào M, vừa đảm bảo tính toàn vẹn của kháng nguyên cũng như hỗ trợ kích thích đáp ứng miễn dịch¹².

Trong một bài nghiên cứu khác, Mai Quốc Gia và cộng sự đã đề xuất việc biểu hiện các epitope tiềm năng của ETEC dung hợp với các phối tử định hướng tế bào M lên bề mặt của tế bào nấm men. Những công bố trên mang đến tiềm năng phát triển vắc xin uống cụ thể là vắc xin phòng ETEC gây ra bệnh, vì vậy cần thêm nhiều nghiên cứu sâu hơn trong tương lai.

KẾT LUẬN

ETEC là nguyên nhân chính gây bệnh tiêu chảy sau cai sữa ở heo con, ảnh hưởng đến ngành công nghiệp chăn nuôi heo trên toàn thế giới. Mặc dù kiến thức

về chủng ETEC gây bệnh đã được hiểu rõ, tuy nhiên thực tế cho đến nay vẫn không có vắc xin nào có thể cung cấp sự bảo vệ phổ rộng hiệu quả. Như đã đề cập, các chủng gây bệnh không đồng nhất kháng nguyên, chúng có thể tiết một hoặc nhiều độc tố, có thể có hoặc không có tiêm mao bám dính. Vì vậy, các nghiên cứu phát triển vắc xin thế hệ mới tập trung vào việc tạo ra vắc xin có thể kháng ETEC phổ rộng giúp phòng PWD. Hai thành phần kháng nguyên tiềm năng đó là nhân tố bám dính và độc tố, nên vắc xin dựa vào các kháng nguyên này được tập trung nghiên cứu. Việc kết hợp giữa các độc tố ruột không bền nhiệt và độc tố bền nhiệt cùng với các epitope của tiêm mao trong cùng một phân tử là phương pháp đầy hứa hẹn, vừa hỗ trợ tính sinh miễn dịch, vừa đảm bảo đầy đủ các kháng nguyên, từ đó đảm bảo cho heo tạo ra các kháng thể trung hoà độc tố cũng như ức chế sự bám của tiêm mao lên bề mặt biểu mô ruột.

Hầu hết các nghiên cứu kể trên (Bảng 1) đều cho kết quả hiệu quả nhất định khi thử nghiệm *in vitro* và *in vivo*. Các nghiên cứu cũng lựa chọn hình thức thử nghiệm gây đáp ứng ở đường tiêu hoặc đường uống. Tuy nhiên ở mỗi dạng đều có các yếu tố khác nhau ảnh hưởng. Ở dạng tiêm, tính nguyên vẹn của kháng nguyên không bị ảnh hưởng nhiều nhưng chỉ tạo IgG là chủ yếu. Vắc xin đường uống có thể kích thích miễn dịch màng nhầy tạo sIgA cũng như IgG, nhưng vấn đề là phải đảm bảo tính toàn vẹn của kháng nguyên khi đi qua môi trường khắc nghiệt của hệ tiêu hoá. Đối với bệnh đường tiêu hoá do vi khuẩn gây ra thì sử dụng vắc xin đường uống là hiệu quả nhất để kích thích đáp ứng miễn dịch sản xuất sIgA. Ngoài ra, việc gây đáp ứng miễn dịch cho heo nái cũng giúp cung cấp miễn dịch thụ động cho heo con trong giai đoạn sơ sinh thông qua sữa non.

Chiến lược phát triển vắc xin đường uống nhằm định hướng tế bào M là hướng tiếp cận đầy tiềm năng trong tương lai. Mặc dù tế bào M đã được phát hiện, nghiên cứu về cấu tạo, các tương tác giữa các cặp phối tử – thụ thể trên tế bào M từ lâu, nhưng việc ứng dụng trong sản xuất vắc xin uống còn khá ít, trong tương lai cần thêm nhiều nghiên cứu để tạo ra vắc xin uống với chi phí thấp, hiệu quả, đặc biệt là các vắc xin phòng bệnh liên quan đến đường tiêu hoá.

Tóm lại, trong nhiều năm qua, việc nghiên cứu vắc xin phòng PWD do ETEC gây ra đã được thực hiện và đạt nhiều kết quả tích cực. Đây là cơ sở cho những nghiên cứu trong tương lai để xác định lại những kết quả đã đạt được cũng như thử nghiệm trên quy mô lớn hơn để tạo ra một chế phẩm vắc xin hiệu quả. Bên cạnh đó, các loại độc tố ruột này cũng phổ biến ở những chủng ETEC gây bệnh ở người, vì vậy các nghiên cứu được đề cập ở trên cũng là tiền đề để phát triển vắc xin phòng ETEC ở người.

Bảng 2: Các cặp phối tử – thụ thể của tế bào M [12].

	Phối tử tương ứng	Thụ thể trên tế bào M
Protein	FimH, FimHrb	GP2
	Hsp60	PrPc
	Invasin	β 1-integrin
	SlpA	Uromodulin
	CPE	Claudin 4
	protein σ 1	α -L-sialic acid
Lectin	UEA-1	glycoprotein chứa α -L-fucose
Kháng thể	SIgA	Dectin-1, Siglec-5
	NKM 16-2-4	glycoprotein chứa α -L-fucose
	3G7-H9	GP2
	9C7	Siglec-F
Peptide	Gb1	GP2
	P25d	nd
	RGD, GRGDS	β 1-integrin
	Co1, OmpH	C5aR
	CTGKSC, LRVC	nd
	CPE30, CPE16, CPE12	Claudin 4
	CKS9	nd
nd, không xác định		

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

cAMP Cyclic adenosine monophosphate
 CFU Colony-forming units
 cGMP Cyclic guanosine monophosphate
 Cldn-4 Claudin-4
 Cpe *Clostridium perfringens* enterotoxin
 CT Cholera toxin
 EAST1 Enteroaggregative heat-stable toxin 1
 ETEC Enterotoxigenic *Escherichia coli*
 GC-C Guanylate cyclase C
 HA Hemagglutinin
 IgA Immunoglobulin A
 IgG Immunoglobulin G
 IL Interleukin
 kDa Kilodalton
 LT Heat-labile enterotoxin
 MBP Maltose binding protein
 MEFA Multiepitope fusion antigen
 NST Nhiễm sắc thể
 PLGA Poly(lactide-co-glycolide)
 PWD Post-weaning diarrhea
 sIgA Secretory Immunoglobulin A

ST Heat-stable enterotoxin
 EGFP Enhanced Green Fluorescence protein
 PED Porcine epidemic diarrhea
 PEDV Porcine epidemic diarrhea virus
 GALT Gut-associated lymphoid tissue

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả cam kết không có xung đột lợi ích

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Ngô Phan Minh Vũ: Tổng hợp, viết, và chỉnh sửa bản thảo.

Mai Quốc Gia: Chỉnh sửa bản thảo.

Trần Văn Hiếu: Lên ý tưởng, chỉnh sửa, và chấp thuận bản thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol.* 2005;295(6-7):443-454; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.003>.
- Mezoughem C. Livestock and Poultry: World Markets and Trade 2023 ; Available from: <https://www.fas.usda.gov/data/livestock-and-poultry-world-markets-and-trade>.

3. Eadie J. Post-weaning Diarrhea in Pig Farming 2022; Available from: <https://swinweb.com/post-weaning-diarrhea-in-pig-farming/>.
4. Liu W, Yuan C, Meng X, Du Y, Gao R, Tang J, Frequency of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from suckling pigs with diarrhoea in China. *Vet J.* 2014;199(2):286-289; PMID: 24378293. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.11.019>.
5. Duan Q, Xia P, Nandre R, Zhang W, Zhu G. Review of Newly Identified Functions Associated With the Heat-Labile Toxin of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:292-302; PMID: 31456954. Available from: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00292>.
6. Bourgeois AL, Wierzbza TF, Walker RI. Status of vaccine research and development for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vaccine.* 2016;34(26):2880-2886; PMID: 26988259. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.02.076>.
7. Svennerholm AM, Holmgren J. Oral vaccines against cholera and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea. *Adv Exp Med Biol.* 1995;371B:1623-1630.
8. Dubreuil JD, Letellier A, Harel J. A recombinant *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) fusion protein eliciting neutralizing antibodies. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996;13(4):317-323; PMID: 8739196. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1996.tb00257.x>.
9. Dubreuil JD. *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology (Reading).* 1997;143 (Pt 6):1783-1795; PMID: 9202453. Available from: <https://doi.org/10.1099/00221287-143-6-1783>.
10. Liu W, Li J, Bao J, Li X, Guan W, Yuan C. Simultaneous oral immunization of mice with live attenuated *Escherichia coli* expressing LT192-STa 13 and LT 192-STb fusion immunogen, respectively, for polyvalent vaccine candidate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(9):3981-3992.
11. Dubreuil JD. Pig vaccination strategies based on enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins. *Braz J Microbiol.* 2021;52(4):2499-2509; PMID: 34244980. Available from: <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00567-3>.
12. Thanh DM, Anh LDH, Hieu TV. M cell: intestinal immunity's gateway. *VNUHCM Journal of Natural Sciences.* 2021;5(4):1732-1747.
13. Alexander T, Gyles C. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, UK. 1994:151-170.
14. Dubreuil JD, Isaacson RE, Schifferli DM. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus.* 2016;7(1); PMID: 27735786. Available from: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0006-2016>.
15. Nam HV, Nguyễn NTĐ, Thạch PN. Bệnh nội khoa gia súc. Hà Nội: NXB Nông nghiệp; 1997.
16. Kobayashi H. Prevalence of pathogenic *Escherichia coli* in a swine breeding environment in Can Tho province, Vietnam. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ.* 2003;37(1):59-63; Available from: <https://doi.org/10.6090/jarq.37.59>.
17. Morin M, Turgeon D, Jollette J, Robinson Y, Phaneuf J, Sauvageau RI. Neonatal diarrhoea of pigs in Quebec: infectious causes of significant outbreaks. *Canadian Journal of Comparative Medicine.* 1983;47(1):11-17.
18. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Veterinary Research.* 1999;30(2-3):259-284.
19. Khai LTL, Lâm NT, Chi NTH. Khảo sát tỷ lệ nhiễm và xác định gene kháng kháng sinh của Enterotoxigenic *Escherichia coli* trên heo con tiêu chảy tại tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ.* 2015;(39):7-17.
20. Dubreuil JD. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;278(2):137-145; PMID: 17995951. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00967.x>.
21. Fairbrother JM, Nadeau E, Belanger L, Tremblay CL, Tremblay D, Brunelle M. Immunogenicity and protective efficacy of a single-dose live non-pathogenic *Escherichia coli* oral vaccine against F4-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge in pigs. *Vaccine.* 2017;35(2):353-360; PMID: 27916413. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.045>.
22. Luppi A, Gibellini M, Gin T, Vangroenweghe F, Vandembroucke V, Bauerfeind R, Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. *Porcine Health Manag.* 2016;2:20; PMID: 28405446. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40813-016-0039-9>.
23. Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL. *Escherichia coli* in post-weaning diarrhoea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev.* 2005;6(1):17-39; PMID: 16164007. Available from: <https://doi.org/10.1079/AHR2005105>.
24. Gyles CL, Fairbrother JM. *Escherichia coli*. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 2010:267-308; Available from: <https://doi.org/10.1002/9780470958209.ch15>.
25. Wolf MK. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(4):569-584.
26. Van den Broeck W, Cox E, Oudega B, Goddeeris BM. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. *Vet Microbiol.* 2000;71(3-4):223-244; PMID: 10703706. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00174-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00174-1).
27. Grange PA, Mouricout MA, Lavery SB, Francis DH, Erickson AK. Evaluation of receptor binding specificity of *Escherichia coli* K88 (F4) fimbrial adhesin variants using porcine serum transferrin and glycosphingolipids as model receptors. *Infect Immun.* 2002;70(5):2336-2343; PMID: 11953368. Available from: <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2336-2343.2002>.
28. Smeds A, Hemmann K, Jakava-Viljanen M, Pelkonen S, Imberechts H, Palva A. Characterization of the adhesin of *Escherichia coli* F18 fimbriae. *Infect Immun.* 2001;69(12):7941-7945; PMID: 11705982. Available from: <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7941-7945.2001>.
29. Tiels P, Verdonck F, Smet A, Goddeeris B, Cox E. The F18 fimbrial adhesin FedF is highly conserved among F18+*Escherichia coli* isolates. *Vet Microbiol.* 2005;110(3-4):277-283; PMID: 16169688. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.08.004>.
30. Byun JW, Jung BY, Kim HY, Fairbrother JM, Lee MH, Lee WK. Real-time PCR for differentiation of F18 variants among enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from piglets with diarrhoea and oedema disease. *Vet J.* 2013;198(2):538-540; PMID: 23992871. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.021>.
31. Vögeli P, Bertschinger HU, Stamm M, Stricker C, Hagger C, Fries R, et al. Genes specifying receptors for F18 fimbriated *Escherichia coli*, causing oedema disease and postweaning diarrhoea in pigs, map to chromosome 6. *Anim Genet.* 1996;27(5):321-328.
32. Schroyen M, Stinckens A, Verhelst R, Niewold T, Buys N. The search for the gene mutations underlying enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ab/ac susceptibility in pigs: a review. *Veterinary Research.* 2012;43(1):70; PMID: 23061722. Available from: <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-70>.
33. Conway PL, Welin A, Cohen PS. Presence of K88-specific receptors in porcine ileal mucus is age dependent. *Infect Immun.* 1990;58(10):3178-182; PMID: 1976112. Available from: <https://doi.org/10.1128/iai.58.10.3178-3182.1990>.
34. Willemsen PT, de Graaf FK. Age and serotype dependent binding of K88 fimbriae to porcine intestinal receptors. *Microbial Pathogenesis.* 1992;12(5):367-375; PMID: 1354324. Available from: [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(92\)90099-A](https://doi.org/10.1016/0882-4010(92)90099-A).
35. Jobling MG, Holmes RK. Fusion proteins containing the A2 domain of cholera toxin assemble with B polypeptides of cholera toxin to form immunoreactive and functional holotoxin-like chimeras. *Infect Immun.* 1992;60(11):4915-4924; PMID: 1399002. Available from: <https://doi.org/10.1128/iai.60.11.4915-4924.1992>.
36. Dubreuil JD. The whole Shebang: the gastrointestinal tract,

- Escherichia coli enterotoxins and secretion. *Curr Issues Mol Biol.* 2012;14(2):71-82.
37. Zhang W, Berberov EM, Freeling J, He D, Moxley RA, Francis DH. Significance of heat-stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity studies. *Infection Immunology.* 2006;74(6):3107-3114;PMID: 16714538. Available from: <https://doi.org/10.1128/IAI.01338-05>.
 38. Mohlatlale RP, Madoroba E, Muchadeyi FC, Chimonyo M, Kanengoni AT, Dzomba EF. Virulence profiles of enterotoxigenic, shiga toxin and enteroaggregative Escherichia coli in South African pigs. *Trop Anim Health Prod.* 2013;45(6):1399-1405;PMID: 23417826. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0377-4>.
 39. Rousset E, Harel J, Dubreuil JD. Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of Escherichia coli enterotoxin b. *Infect Immun.* 1998;66(12):5650-5657;PMID: 9826338. Available from: <https://doi.org/10.1128/IAI.66.12.5650-5658.1998>.
 40. Yoshimura S, Ikemura H, Watanabe H, Aimoto S, Shimomishi Y, Hara S. Essential structure for full enterotoxigenic activity of heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic Escherichia coli. *FEBS Lett.* 1985;181(1):138-142;PMID: 3972100. Available from: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)81129-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)81129-7).
 41. Duan Q, Zhang W. Structure, Enterotoxicity, and Immunogenicity of Enterotoxigenic Escherichia coli Heat-Stable Type I Toxin (StA) and Derivatives. In: Stiles B, Alape-Girón A, Dubreuil JD, Mandal M, Gopalakrishnakone P, editors. *Microbial Toxins.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2018; 223-244; Available from: https://doi.org/10.1007/978-94-007-6449-1_31.
 42. Dubreuil JD. EAST1 toxin: An enigmatic molecule associated with sporadic episodes of diarrhea in humans and animals. *J Microbiol.* 2019;57(7):541-549;PMID: 31016564. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8651-4>.
 43. Aarestrup FM, Oliver Duran C, Burch DG. Antimicrobial resistance in swine production. *Anim Health Res Rev.* 2008;9(2):135-148;PMID: 18983723. Available from: <https://doi.org/10.1017/S1466252308001503>.
 44. WHO. *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) - Early Implementation 2020.* Geneva, Switzerland; 2020;.
 45. Cứ Đ.T. Sử dụng chế phẩm sinh học Biosubtyl để phòng bệnh tiêu chảy trước và sau cai sữa. *Tạp chí KHKT Thú Y.* 2000;VII(2):58-62;.
 46. Vịnh TT và Hoè Đ.T. Một số kết quả sử dụng các chế phẩm sinh học để phòng bệnh tiêu chảy của lợn con. *Tạp chí KHKT Thú Y.* 2002;54-56;.
 47. Bình Đ.X, Tạo LV và Hạnh TT. Nghiên cứu chế tạo bột kháng thể lòng đỏ trứng gà (YP-99) và hiệu quả điều trị tiêu chảy do E. coli ở lợn con theo mẹ. *Báo cáo khoa học Chăn nuôi Thú y* 2002-2003. 2003:56-60;.
 48. Lăng PS, Lan NTK, Mỹ LN. Ký sinh trùng, bệnh ký sinh trùng ở vật nuôi. NXB Giáo dục Việt Nam. 2009;221-227;.
 49. Thịnh TV. Ký sinh trùng thú y. NXB Nông Nghiệp, Hà Nội. 1985;24;173;.
 50. Đạt Đ.T, Phượng PT, Lê Ngọc Mỹ HVK. Bệnh ở lợn nái và lợn con. Hà Nội: NXB Nông nghiệp. 1996;57-147;.
 51. Hiếu PK. Dược lý học thú y. 1997;350-351;.
 52. Bianchi. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996;93(2):705-708;PMID: 8570620. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.2.705>.
 53. Van den Broeck W. Antibacterial effect of garlic and omeprazole on Helicobacter pylori. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1999;43(6):837-839;PMID: 10404325. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/43.6.837>.
 54. Fairbrother JM, Nadeau É, Gyles CL. Escherichia coli in post-weaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews.* 2005;6(01):17-39;PMID: 16164007. Available from: <https://doi.org/10.1079/AHR2005105>.
 55. Van den Broeck W, Cox E, Goddeeris BM. Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 fimbriae. *Infect Immun.* 1999;67(2):520-526;PMID: 9916054. Available from: <https://doi.org/10.1128/IAI.67.2.520-526.1999>.
 56. Joensuu JJ, Verdonck F, Ehrstrom A, Peltola M, Siljander-Rasi H, Nuutila AM. F4 (K88) fimbrial adhesin FaeG expressed in alfalfa reduces F4+ enterotoxigenic Escherichia coli excretion in weaned piglets. *Vaccine.* 2006;24(13):2387-2394; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.11.056>.
 57. Verdonck F, Tiels P, van Gog K, Goddeeris BM, Lycke N, Clements J, Mucosal immunization of piglets with purified F18 fimbriae does not protect against F18+ Escherichia coli infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;120(3-4):69-79; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.06.018>.
 58. Tiels P, Verdonck F, Coddens A, Ameloot P, Goddeeris B, Cox E. Monoclonal antibodies reveal a weak interaction between the F18 fimbrial adhesin FedF and the major subunit FedA. *Vet Microbiol.* 2007;119(2-4):115-120;.
 59. Tiels P, Verdonck F, Coddens A, Goddeeris B, Cox E. The excretion of F18+ E. coli is reduced after oral immunisation of pigs with a FedF and F4 fimbriae conjugate. *Vaccine.* 2008;26(17):2154-2163;PMID: 18543416. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.054>.
 60. Bakker D, Willemsen PT, Willems RH, Huisman TT, Mooi FR, Oudega B., Identification of minor fimbrial subunits involved in biosynthesis of K88 fimbriae. *J Bacteriol.* 1992;174(20):6350-6358;PMID: 1400188. Available from: <https://doi.org/10.1128/jb.174.20.6350-6358.1992>.
 61. Gia MQ, Hiếu TV. Tạo dòng, biểu hiện nhân tố bám dính F18 trên bề mặt tế bào nấm men Pichia pastoris. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ.* 2020;56(6):139-145; Available from: <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2020.152>.
 62. Bozic F, Bilic V, Valpotic I. Levamisole mucosal adjuvant activity for a live attenuated Escherichia coli oral vaccine in weaned pigs. *J Vet Pharmacol Ther.* 2003;26(3):225-231;PMID: 12755907. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2003.00458.x>.
 63. Melkebeek V, Goddeeris BM, Cox E. ETEC vaccination in pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013;152(1-2):37-42;PMID: 23068270. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.024>.
 64. Bertschinger HU, Nief V, Tschape H. Active oral immunization of suckling piglets to prevent colonization after weaning by enterotoxigenic Escherichia coli with fimbriae F18. *Vet Microbiol.* 2000;71(3-4):255-267;PMID: 10703708. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00166-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00166-2).
 65. Atroshi F, Alaviuhkola T, Schildt R, Sandholm M. Fat globule membrane of sow milk as a target for adhesion of K88-positive Escherichia coli. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 1983;6(3):235-245;PMID: 6354573. Available from: [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(83\)90016-4](https://doi.org/10.1016/0147-9571(83)90016-4).
 66. Felder CB, Vorlaender N, Gander B, Merkle HP, Bertschinger HU. Microencapsulated enterotoxigenic Escherichia coli and detached fimbriae for peroral vaccination of pigs. *Vaccine.* 2000;19(7-8):706-715;PMID: 11115691. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00264-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00264-4).
 67. Snoeck V, Huyghebaert N, Cox E, Vermeire A, Vancaeneghem S, Remon JP. Enteric-coated pellets of F4 fimbriae for oral vaccination of suckling piglets against enterotoxigenic Escherichia coli infections. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;96(3-4):219-227;PMID: 14592734. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2003.08.003>.
 68. Vandamme K, Melkebeek V, Cox E, Remon JP, Vervaeet C. Adjuvant effect of Gantrez®AN nanoparticles during oral vaccination of piglets against F4+enterotoxigenic Escherichia coli. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;139(2-

- 4):148-155;PMID: 21130503. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.09.009>.
69. Bianchi ATJ, Scholten JW, van Zijderveld AM, van Zijderveld FG, Bokhout BA. Parenteral vaccination of mice and piglets with F4+Escherichia coli suppresses the enteric anti-F4 response upon oral infection. *Vaccine*. 1996;14(3):199-206;PMID: 8920700. Available from: [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(95\)00192-4](https://doi.org/10.1016/0264-410X(95)00192-4).
 70. Van Der Stede Y, Cox E, Goddeeris BM. Antigen dose modulates the immunoglobulin isotype responses of pigs against intramuscularly administered F4-fimbriae. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002;88(3-4):209-216;PMID: 12127418. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00168-X](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00168-X).
 71. Van Der Stede Y, Cox E, Verdonck F, Van Caeneghem S, Goddeeris BM. Reduced faecal excretion of F4+E coli by the intramuscular immunisation of suckling piglets by the addition of 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3 or CpG-oligodeoxynucleotides. *Vaccine*. 2003;21(9-10):1023-1032;PMID: 12547616. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00553-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00553-4).
 72. Van Der Stede Y, Verfaillie T, Cox E, Verdonck F, Goddeeris BM. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 increases IgA serum antibody responses and IgA antibody-secreting cell numbers in the Peyer's patches of pigs after intramuscular immunization. *Clin Exp Immunol*. 2004;135(3):380-390;PMID: 15008969. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2003.02377.x>.
 73. Ruan X, Knudsen DE, Wollenberg KM, Sack DA, Zhang W. Multipitope fusion antigen induces broadly protective antibodies that prevent adherence of Escherichia coli strains expressing colonization factor antigen I (CFA/I), CFA/II, and CFA/IV. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(2):243-249; Available from: <https://doi.org/10.1128/CVI.00652-13>.
 74. Duan Q, Lee KH, Nandre RM, Garcia C, Chen J, Zhang W. MEFA (multipitope fusion antigen)-Novel Technology for Structural Vaccinology, Proof from Computational and Empirical Immunogenicity Characterization of an Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) Adhesin MEFA. *Vaccines*. 2017;8(4):367-373;.
 75. Duan Q, Wu W, Pang S, Pan Z, Zhang W, Zhu G. Coimmunization with Two Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) Fimbrial Multipitope Fusion Antigens Induces the Production of Neutralizing Antibodies against Five ETEC Fimbriae (F4, F5, F6, F18, and F41). *Appl Environ Microbiol*. 2020;86(24);PMID: 32169934. Available from: <https://doi.org/10.1128/AEM.00217-20>.
 76. Boedeker EC. Vaccines for enterotoxigenic Escherichia coli: current status. *Curr Opin Gastroenterol*. 2005;21(1):15-19;.
 77. Takeda T, Nair GB, Suzuki K, Zhe HX, Yokoo Y, De Mol P. Epitope mapping and characterization of antigenic determinants of heat-stable enterotoxin (STh) of enterotoxigenic Escherichia coli by using monoclonal antibodies. *Infect Immun*. 1993;61(1):289-294;.
 78. Taxt A, Aasland R, Sommerfelt H, Nataro J, Puntervoll P. Heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli as a vaccine target. *Infect Immun*. 2010;78(5):1824-1831;PMID: 20231404. Available from: <https://doi.org/10.1128/IAI.01397-09>.
 79. Hasegawa M, Shimonishi Y. Recognition and signal transduction mechanism of Escherichia coli heat-stable enterotoxin and its receptor, guanylate cyclase C. *J Pept Res*. 2005;65(2):261-271;PMID: 15705168. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2005.00218.x>.
 80. Marx UC, Klodt J, Meyer M, Gerlach H, Rosch P, Forssmann WG. One peptide, two topologies: structure and interconversion dynamics of human uroguanylin isomers. *Pept Res*. 1998;52(3):229-240;PMID: 9774236. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1998.tb01480.x>.
 81. Ruan X, Zhang W. Oral immunization of a live attenuated Escherichia coli strain expressing a holotoxin-structured adhesin-toxoid fusion (1FaeG-FedF-LTA2:5LTB) protected young pigs against enterotoxigenic E. coli (ETEC) infection. *Vaccine*. 2013;31(11):1458-1463;PMID: 23375979. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.030>.
 82. Zhang W, Zhao M, Ruesch L, Omot A, Francis D. Prevalence of virulence genes in Escherichia coli strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol*. 2007;123(1-3):145-152;PMID: 17368762. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.018>.
 83. Feng N, Guan W. Expression fusion immunogen by live attenuated Escherichia coli against enterotoxins infection in mice. *Microb Biotechnol*. 2019;12(5):946-961;PMID: 31210426. Available from: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13447>.
 84. Zhang W, Zhang C, Francis DH, Fang Y, Knudsen D, Nataro JP. Genetic fusions of heat-labile (LT) and heat-stable (ST) toxoids of porcine enterotoxigenic Escherichia coli elicit neutralizing anti-LT and anti-STa antibodies. *Infect Immun*. 2010;78(1):316-325;PMID: 19858307. Available from: <https://doi.org/10.1128/IAI.00497-09>.
 85. Ruan X, Liu M, Casey TA, Zhang W. A tripartite fusion, FaeG-FedF-LT(192)A2:B, of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) elicits antibodies that neutralize cholera toxin, inhibit adherence of K88 and F18 fimbriae, and protect pigs against K88ac/heat-labile toxin infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(10):1593-1599;PMID: 21813665. Available from: <https://doi.org/10.1128/CVI.05120-11>.
 86. Nandre RM, Duan Q, Wang Y, Zhang W. Passive antibodies derived from intramuscularly immunized toxoid fusion 3xSTaN12S-dmLT protect against STa+ enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) diarrhea in a pig model. *Vaccine*. 2017;35(4):552-556;PMID: 28017433. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.12.021>.
 87. Seo H, Lu T, Nandre RM, Duan Q, Zhang W. Immunogenicity characterization of genetically fused or chemically conjugated heat-stable toxin toxoids of enterotoxigenic Escherichia coli in mice and pigs. *FEMS Microbiol Lett*. 2019;366(4):fnz037;PMID: 30772899. Available from: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz037>.
 88. Zhang W, Francis DH. Genetic fusions of heat-labile toxin (LT) and heat-stable toxin b (STb) of porcine enterotoxigenic Escherichia coli elicit protective anti-LT and anti-STb antibodies. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(8):1223-1231;PMID: 20505006. Available from: <https://doi.org/10.1128/CVI.00095-10>.
 89. Peterson JW, Whipp SC. Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of Escherichia coli. *Infect Immun*. 1995;63(4):1452-1461;PMID: 7890409.
 90. Erume J, Berberov EM, Kachman SD, Scott MA, Zhou Y, Francis DH. Comparison of the contributions of heat-labile enterotoxin and heat-stable enterotoxin b to the virulence of enterotoxigenic Escherichia coli in F4ac receptor-positive young pigs. *Infect Immun*. 2008;76(7):3141-3149;PMID: 18426880. Available from: <https://doi.org/10.1128/IAI.01743-07>.
 91. Labrie V, Beausoleil HE, Harel J, Dubreuil JD. Binding to sulfatide and enterotoxicity of various Escherichia coli STb mutants. *Microbiology (Reading)*. 2001;147(Pt 11):3141-3148;PMID: 11700365. Available from: <https://doi.org/10.1099/00221287-147-11-3141>.
 92. Arriaga YL, Harville BA, Dreyfus LA. Contribution of individual disulfide bonds to biological action of Escherichia coli heat-stable enterotoxin B. *Infect Immun*. 1995;63(12):4715-4720;PMID: 7591127. Available from: <https://doi.org/10.1128/iai.63.12.4715-4720.1995>.
 93. You J, Xu Y, He M, McAllister TA, Thacker PA, Li X. Protection of mice against enterotoxigenic E. coli by immunization with a polyvalent enterotoxin comprising a combination of LTb, STa, and STb. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;89(6):1885-1893;PMID: 21085949. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2991-7>.
 94. Zhang H, Xu Y, Zhang Z, You J, Yang Y, Li X. Protective immunity of a Multivalent Vaccine Candidate against piglet di-

- arrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in a pig model. *Vaccine*. 2018;36(5):723-728;PMID: 29287679. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.026>.
95. Lu T, Moxley RA, Zhang W. Application of a Novel Epitope- and Structure-Based Vaccinology-Assisted Fimbria-Toxin Multiepitope Fusion Antigen of Enterotoxigenic *Escherichia coli* for Development of Multivalent Vaccines against Porcine Postweaning Diarrhea. *Appl Environ Microbiol*. 2020;86(24):e00274-20;PMID: 32144103. Available from: <https://doi.org/10.1128/AEM.00274-20>.
 96. Davitt CJ, Lavelle EC. Delivery strategies to enhance oral vaccination against enteric infections. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;91:52-69;PMID: 25817337. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.007>.
 97. Kang SH, Hong SJ, Lee YK, Cho S. Oral Vaccine Delivery for Intestinal Immunity-Biological Basis, Barriers, Delivery System, and M Cell Targeting. *Polymers (Basel)*. 2018;10(9):1519;PMID: 30960873. Available from: <https://doi.org/10.3390/polym10090948>.
 98. Zhu Q, Berzofsky JA. Oral vaccines: directed safe passage to the front line of defense. *Gut Microbes*. 2013;4(3):246-252;PMID: 23493163. Available from: <https://doi.org/10.4161/gmic.24197>.
 99. Owen RL, Jones AL. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology*. 1974;66(2):189-203; Available from: [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(74\)80102-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(74)80102-2).
 100. Owen RL. Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. *Gastroenterology*. 1977;72(3):440-451;PMID: 832793. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(77\)80254-0](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(77)80254-0).
 101. Stokes CR, Bailey M, Wilson AD. Immunology of the porcine gastrointestinal tract. *Vet Immunol Immunopathol*. 1994;43(1-3):143-150;PMID: 7856046. Available from: [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)90130-9](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)90130-9).
 102. Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:301-332;PMID: 11031239. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.301>.
 103. Kim SH, Jang YS. Antigen targeting to M cells for enhancing the efficacy of mucosal vaccines. *Exp Mol Med*. 2014;46(3):e85;PMID: 24626171. Available from: <https://doi.org/10.1038/emm.2013.165>.
 104. Rahner C, Mitic LL, Anderson JM. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*. 2001;120(2):411-422;PMID: 11159882. Available from: <https://doi.org/10.1053/gast.2001.21736>.
 105. Lo D, Tynan W, Dickerson J, Scharf M, Cooper J, Byrne D. Cell culture modeling of specialized tissue: identification of genes expressed specifically by follicle-associated epithelium of Peyer's patch by expression profiling of Caco-2/Raji co-cultures. *Int Immunol*. 2004;16(11):91-99;PMID: 14688064. Available from: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh011>.
 106. Takahashi A, Kondoh M, Masuyama A, Fujii M, Mizuguchi H, Horiguchi Y. Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin in its interaction with claudin-4. *J Control Release*. 2005;108(1):56-62;PMID: 16091298. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.07.008>.
 107. Ling J, Liao H, Clark R, Wong MS, Lo DD. Structural constraints for the binding of short peptides to claudin-4 revealed by surface plasmon resonance. *J Biol Chem*. 2008;283(45):30585-30595;PMID: 18782762. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M803548200>.
 108. Rajapaksa TE, Stover-Hamer M, Fernandez X, Eckelhoefer HA, Lo DD. Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery. *J Control Release*. 2010;142(2):196-205;PMID: 19896996.
 109. Hwang TL, Changchien TT, Wang CC, Wu CM. Claudin-4 expression in gastric cancer cells enhances the invasion and is associated with the increased level of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression. *Oncol Lett*. 2014;8(3):1367-1371;PMID: 25120725. Available from: <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2295>.
 110. Shima H, Watanabe T, Fukuda S, Fukuoka S, Ohara O, Ohno H. A novel mucosal vaccine targeting Peyer's patch M cells induces protective antigen-specific IgA responses. *Int Immunol*. 2014;26(11):619-625;PMID: 24908678. Available from: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu061>.
 111. Khan IU, Huang J, Liu R, Wang J, Xie J, Zhu N. Phage display-derived ligand for mucosal transcytotic receptor GP-2 promotes antigen delivery to M cells and induces antigen-specific immune response. *SLAS Discov*. 2017;22(7):879-886;PMID: 28346102. Available from: <https://doi.org/10.1177/2472555217690483>.
 112. Ma S, Wang L, Huang X, Wang X, Chen S, Shi W. Oral recombinant *Lactobacillus* vaccine targeting the intestinal microfold cells and dendritic cells for delivering the core neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus. *Microb Cell Fact*. 2018;17(1):20;PMID: 29426335. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0861-7>.
 113. Zhang F, Zhang Z, Li X, Li J, Lv J, Ma Z. Immune responses to orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing multi-epitope proteins targeting M cells of foot-and-mouth disease virus. *Viruses*. 2021;13(10):2036;PMID: 34696469. Available from: <https://doi.org/10.3390/v13102036>.
 114. Guo L, Zhang F, Wang S, Li R, Zhang L, Zhang Z. Oral immunization with a M cell-targeting recombinant *L. lactis* vaccine LL-pISAM-FVpE stimulate protective immunity against *H. pylori* in mice. *Front Immunol*. 2022;(13):918160;PMID: 35911756. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.918160>.

Vaccine for enterotoxigenic *Escherichia coli* causing post-weaning diarrhea (PWD) in piglets

Minh-Vu Phan Ngo, Quoc-Gia Mai, Hieu Tran-Van*

ABSTRACT

Post-weaning diarrhea (PWD) in piglets is primarily caused by the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains. ETEC expresses adhesins attached to the intestinal mucosa, specifically fimbriae such as F4, F5, F6, F7 and F18. F4 and F18 are particularly prevalent in strains that cause PWD. ETEC then releases enterotoxins that play a central role in the pathogenic process, such as heat-labile enterotoxin (LT), heat-stable enterotoxin (ST), and a small amount of enteroaggregative heat-stable toxin 1 (EAST1), which lead to dehydration, electrolyte imbalances, damage to the intestine, reduced nutrient absorption, growth rate, and resulting in death. Vaccination is the most effective preventive measure against PWD. Although there is an existing ETEC vaccine based on fimbrial immunization, enterotoxins are the primary cause of diarrhea in ETEC. Therefore, the development of new-generation vaccine that target both adhesins and enterotoxins has been carried out. In recent years, many studies have successfully generated fusion antigens of these two factors and tested for their ability to induce immune responses in mouse, rabbit, and pig models. Along with the development of targeted M cell strategies, this opens a promising new direction for the creation of both general and specific ETEC oral vaccines. In this paper, the development strategies for vaccines based on fimbrial adhesins and enterotoxins to protect piglets from PWD are summarized. These studies also serve as a basis for the development of ETEC vaccines in humans.

Key words: Adhesin factor, enterotoxins, enterotoxigenic *Escherichia coli*, M cells, post-weaning diarrhea, vaccine

Laboratory of Biosensors, Faculty of
Biology and Biotechnology, University of
Science, Vietnam National University
Ho Chi Minh City, Vietnam

Correspondence

Hieu Tran-Van, Laboratory of
Biosensors, Faculty of Biology and
Biotechnology, University of Science,
Vietnam National University Ho Chi Minh
City, Vietnam

Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

History

- Received: 12-4-2023
- Accepted: 24-5-2024
- Published Online: 30-6-2024

DOI : <https://doi.org/10.32508/stdjns.v8i2.1281>



Copyright

© VNUHCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Ngo M P, Mai Q, Tran-Van H. Vaccine for enterotoxigenic *Escherichia coli* causing post-weaning diarrhea (PWD) in piglets . *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2024, 8(2):2900-2919.