

XÁC ĐỊNH TÌNH HÌNH ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH DỊCH THỂ VÀ CẢM NHIỄM VIRUS ĐẠI Ở CHÓ NUÔI TRÊN ĐỊA BÀN THÀNH PHỐ HUẾ BẰNG PHƯƠNG PHÁP HI VÀ SSDHI

Phạm Hồng Sơn¹, Nguyễn Thị Ngọc Hiền²

¹Khoa Chăn nuôi-Thú y, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

²Phường Võ Dạ, thành phố Huế, Thừa Thiên Huế

Liên hệ email: sonphdhnl@huan.edu.vn

TÓM TẮT

Bằng phương pháp ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) và trắc định xê lệch ngăn trở ngưng kết hồng cầu trực tiếp chuẩn (SSDHI) chúng tôi đã xác định đáp ứng miễn dịch dịch thể chống bệnh dại và tình hình cảm nhiễm virus dại trên chó nuôi ở một số địa bàn thuộc thành phố Huế vào nửa cuối năm 2016. Kháng thể chống dại được xét nghiệm thấy ở 90,9%, 97,72% và 97,72% chó nuôi tại các phường theo trình tự An Hòa, Tây Lộc và Võ Dạ với tỷ lệ dương tính chung là 95,45%. Tỷ lệ chó được bảo hộ miễn dịch (có hiệu giá kháng thể $4 \log_2$ trở lên) theo địa bàn trên lần lượt là 72,73%; 77,27% và 75% với cường độ miễn dịch đều cao hơn mức bảo hộ đàn (hiệu giá trung bình nhân kháng thể) là 16, tương ứng là 17,59; 24,48 và 24,48. Tỷ lệ nhiễm virus dại trên chó nuôi tại các phường An Hòa là 4,11%, Tây Lộc là 2,70% và Võ Dạ là 4,11%, trong khi tỷ lệ nhiễm chung là 3,64%, chứng tỏ còn nguy cơ phát sinh bệnh dại tại địa bàn.

Từ khóa: bệnh dại, ngăn trở, ngưng kết hồng cầu, SSDHI, virus

Nhận bài: 27/05/2017

Hoàn thành phản biện: 12/06/2017

Chấp nhận bài: 15/06/2017

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dại có thể gặp ở nhiều loài động vật máu nóng và người. Theo ước tính, khoảng 20.000 người chết mỗi năm do nhiễm dại từ chó, bệnh lây truyền chủ yếu do các chất tiết bị nhiễm, thường do vết cắn, vết liếm của động vật mắc bệnh, dẫn tới tử vong 100% khi đã có biểu hiện triệu chứng (Hatz và cs., 2012; Yousaf và cs., 2012). Bệnh dại sẽ có nguy cơ lan rộng nếu không có những biện pháp can thiệp kịp thời và đồng bộ (Banyard và cs., 2013). Trong thời gian trước 1995, trung bình mỗi năm ở Việt Nam có trên 100 người chết vì bệnh dại, chiếm tỷ lệ cao nhất so với các bệnh truyền nhiễm gây dịch ở nước ta (Đình Kim Xuyên và Nguyễn Thị Thanh Hương, 2006) và gần đây bệnh dại vẫn còn tiếp tục là bệnh gây hậu quả nghiêm trọng (Ủy ban Nhân dân tỉnh Thừa Thiên Huế, 2013; Doãn Hòa, 2017). Thường xuyên tổ chức tiêm vaccine để phòng bệnh dại trên đàn chó, mèo là việc làm thường xuyên của ngành thú y, là một biện pháp phòng bệnh mang tính quyết định nhằm ngăn ngừa sự truyền lây virus dại từ chó sang người. Tuy nhiên số lượng đàn chó, mèo tăng rất khó kiểm soát và thói quen thả rông chó làm tăng nguy cơ lây truyền bệnh dại (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2014; Bộ Y tế, 2013). Việc xét nghiệm đánh giá thường xuyên tình hình dịch bệnh là rất cần thiết, nhưng hầu như không được vận dụng trong thực tế do gặp phải trở ngại phổ biến là các phương pháp hiện tại (ELISA, RT-PCR) đều đắt tiền, thiếu tính chủ động vì các yếu tố xét nghiệm đều phải nhập khẩu. Xuất phát từ đó, trên cơ sở những thí nghiệm đã đạt được trong quá trình nghiên cứu chẩn đoán một số bệnh cảm nhiễm virus khác nhau ở động vật nông nghiệp trước đây (Phạm Hồng Sơn, 2004; Phạm Hồng Sơn, 2004a;

Phạm Hồng Sơn và cs., 2005; Phạm Hồng Sơn và cs., 2009; Nguyễn Thị Hoàng Oanh và cs., 2012; Phạm Hồng Sơn và cs., 2013; Phạm Hồng Sơn và cs., 2014), chúng tôi thực hiện đề tài này.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và nội dung nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là đàn chó nuôi trên một số địa bàn thành phố Huế. Mẫu xét nghiệm gồm máu để tách huyết thanh và nước bọt chó được lấy trong thời gian từ tháng 9/2016 đến tháng 1/2017 tại Trạm chẩn đoán xét nghiệm và điều trị bệnh động vật thuộc Chi cục Chăn nuôi và Thú y tỉnh Thừa Thiên Huế và địa bàn ba phường An Hòa, Tây Lộc, Võ Dạ thuộc thành phố Huế và xét nghiệm tại Phòng thí nghiệm Vi trùng - Truyền nhiễm, khoa Chăn nuôi - Thú y, trường Đại học Nông Lâm Huế với các nội dung:

- Xác định hiệu giá kháng thể của mẫu huyết thanh thu thập từ chó nuôi trên các địa bàn (sử dụng phản ứng HI) và qua đó đánh giá bảo hộ miễn dịch đàn chống bệnh dại;

- Xác định tỷ lệ và cường độ nhiễm thu được qua mẫu nước bọt chó thu được (sử dụng phản ứng SSDHI).

2.2. Vật liệu và lấy mẫu nghiên cứu

2.2.1. Vật liệu chủ yếu cho phản ứng

Vật liệu chủ yếu cho phản ứng gồm dung dịch sinh lý NaCl pH 7,2, dung dịch chống đông máu, vaccine dại Rabisin[®] Merial hoặc Rabigen[®] mono Virbac (hệ thống Thú y cung ứng), kháng huyết thanh kháng dại (Viện Pasteur Nha Trang, dịch tiêm, phòng ngừa phát bệnh dại ở người phơi nhiễm, hệ thống Y tế công cộng cung ứng), hồng cầu thu từ ngan có thể trọng hơn 2,5 kg bằng cách rửa ba lần trong nước sinh lý và pha thành huyền dịch 1% (1 phần cặn tế bào hồng cầu pha vào 200 phần dung dịch sinh lý). Phản ứng HA, HI và SSDHI được thực hiện trên các khay vi chuẩn độ (microtitration plate) 96 lỗ đáy U với 8 dãy mỗi dãy 12 lỗ, với pipet tự động có cỡ thuận tiện cho việc hút và chuyển 25 μ L.

2.2.2. Lấy mẫu

- Mẫu nước bọt: Dùng panh kẹp bông sạch cho vào miệng để nước bọt chó ngấm vào bông trong khoảng 1 - 2 phút lấy ra cho vào túi ni lông sạch hoặc lọ nhỏ sạch, kèm mẫu giấy ghi các thông tin về mẫu nước bọt và đặt vào hộp đựng nước đá chuyển nhanh về phòng thí nghiệm. Tại phòng thí nghiệm các mẫu được hút bằng pipet với dung tích 25 μ L để áp dụng cho một xét nghiệm ngay hoặc bảo quản ở tủ lạnh sâu khoảng -20 °C và sau đó được giải đông và sử dụng cho phản ứng xét nghiệm như nước bọt tươi mới.

- Mẫu huyết thanh: Dùng bơm tiêm gắn kim tiêm lấy máu tĩnh mạch khoảng 2 mL, hút thêm không khí vào ống bơm, để nghiêng một góc khoảng 30° ở nhiệt độ phòng khoảng 2 giờ để huyết khối hình thành dọc theo thành ống. Dùng pipet hút huyết thanh vào Eppendorf, đánh dấu và bảo quản ở nhiệt độ -20 °C cho đến khi làm xét nghiệm. Trước khi tiến hành phản ứng, sử dụng đầu pipet trộn đều huyết thanh rồi ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ tế bào hoặc các mẫu tổ chức.

2.3. Phản ứng xét nghiệm

2.3.1. Phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA) và pha virus 4 HA

Phản ứng HA giữa virus vaccine dại và huyền dịch hồng cầu ngan không có sự khác biệt với các mô tả trước đây (Hirst, 1941, mô tả lại trong Cottral, 1989) với việc vận dụng khay vi chuẩn độ 96 lỗ (8 dãy×12 lỗ/dãy) áp dụng xét nghiệm một lần được 8 mẫu. Trình tự các bước như sau:

Bước 1: Cho vào tất cả các lỗ của mỗi dãy 25 μ L dung dịch sinh lý (NaCl 0,9%).

Bước 2: Cho 25 μL virus vaccine đại vào lỗ thứ nhất rồi bằng chính pipet (ống hút định lượng) đó trộn bằng cách hút nhả 4 - 5 lần rồi hút chuyển 25 μL sang lỗ thứ hai, tiếp tục trộn chuyển cho đến hết lỗ thứ 10 thì hút bỏ 25 μL (để chừa hai lỗ 11 và 12 không có virus làm đối chứng âm).

Bước 3: Cho vào tất cả các lỗ mỗi lỗ 25 μL huyền dịch hồng cầu ngan 0,5% (huyền dịch này sử dụng cho tất cả các phản ứng tiếp theo: HI, SSDHI; lắc đều thường xuyên khi sử dụng làm phản ứng để có sự đồng đều).

Bước 4: Để yên và đọc kết quả phản ứng bằng mắt thường sau khoảng 15 - 60 phút phụ thuộc vào kết quả ở 2 lỗ số 11 và 12, đọc từng dãy từ khi hồng cầu ở hai lỗ đối chứng âm của mỗi dãy chìm ở tâm đáy lỗ khay tạo thành một chấm đỏ. Lỗ có ngưng kết hồng cầu biểu hiện màu đỏ đều của huyền dịch hồng cầu, không tạo thành chấm đỏ đậm ở tâm đáy lỗ khay và tương phản với lỗ đối chứng âm. Hiệu giá ngưng kết hồng cầu được xác định là độ pha loãng lớn nhất của virus còn cho phản ứng ngưng kết hồng cầu. Số lỗ có ngưng kết hồng cầu của mỗi dãy phản ứng cho phép đọc kết quả phản ứng, như ngưng kết ở 5 lỗ khay ở một dãy cho biết nồng độ virus trong dịch virus gốc (vaccine) được xét nghiệm ở dãy đó là $5 \log_2$ tương ứng nồng độ virus $2^5 = 32$ đơn vị ngưng kết hồng cầu (32 HA).

Bước 5: Pha virus gốc để có dịch virus làm việc nồng độ 4 HA dựa vào kết quả phản ứng trên. Nếu đã có 4 HA ($2 \log_2$) thì giữ nguyên, nếu $3 \log_2$ (8 HA) thì pha thêm dung dịch sinh lý cho loãng 2 lần (tỷ lệ 1:1), nếu có 4, 5 hoặc 6,... \log_2 thì pha loãng 4, 8 hoặc 16,... lần (tỷ lệ pha 1:3, 1:7 hoặc 1:15,...). Kiểm tra lại dịch virus 4 HA bằng phản ứng HA với 4 lỗ khay (lần lượt cho dung dịch sinh lý vào 4 lỗ, cho virus vào lỗ thứ nhất, trộn chuyển để có dãy 2 HA, 1 HA, 0,5 HA và 0,25 HA, rồi cho hồng cầu vào và đọc kết quả sau 15 - 60 phút, kết quả 2 lỗ bên trái ngưng kết và 2 lỗ bên phải không ngưng kết là đúng nồng độ 4 HA. Nếu không đúng và có 3 lỗ ngưng kết thì pha thêm dung dịch sinh lý, nếu chỉ 1 lỗ ngưng kết thì phải pha thêm dịch virus gốc và thử lại phản ứng 4 HA).

2.3.2. Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) và pha kháng thể $4 \log_2$ (hay 16 HI)

Phản ứng HI được thực hiện với dung dịch sinh lý, huyền dịch hồng cầu 0,5% và dịch kháng nguyên virus làm việc 4 đơn vị ngưng kết hồng cầu (4 HA) nêu trên và huyết thanh cần kiểm (Cottral, 1989). Khi cho kháng nguyên virus tiếp xúc trước với huyết thanh nếu trong huyết thanh có kháng thể thì virus bị giảm hiệu giá ngưng kết hồng cầu. Trình tự các bước ở mỗi dãy như sau.

Bước 1: Cho vào tất cả các lỗ mỗi lỗ 25 μL dung dịch sinh lý (NaCl 0,9%).

Bước 2: Cho 25 μL huyết thanh cần kiểm vào lỗ thứ nhất, trộn và hút 25 μL chuyển sang lỗ tiếp theo, lại trộn và chuyển như vậy lần lượt đến lỗ thứ 10 thì hút bỏ 25 μL . Chừa lỗ thứ 11 và 12 không có huyết thanh làm đối chứng âm tính kháng thể.

Bước 3: Cho vào tất cả các lỗ từ số 1 đến 11 mỗi lỗ 25 μL dịch virus 4 HA, chừa lỗ 12 làm đối chứng không virus lần không kháng thể. Để yên 10 phút.

Bước 4: Cho vào tất cả các lỗ mỗi lỗ 25 μL huyền dịch hồng cầu 4 HA đã được kiểm tra HA ở mục trên. Để yên và chờ đọc kết quả sau khoảng 15 - 60 phút phụ thuộc vào kết quả lỗ thứ 12 (chỉ bao gồm hồng cầu và dung dịch sinh lý), khi đó hồng cầu ở lỗ 12 đã chìm xuống và tạo thành chấm đỏ ở tâm lỗ khay. Phản ứng ngăn trở ngưng kết cho hình ảnh đọc được bằng mắt thường: các hồng cầu chìm xuống và tạo thành chấm đỏ đậm ở đáy của lỗ, tương tự như ở lỗ thứ 12 và đối lập với lỗ thứ 11 có hồng cầu không chìm xuống tâm đáy lỗ. Hiệu giá kháng thể là độ pha loãng lớn nhất của huyết thanh còn cho phản ứng dương tính.

Các mẫu huyết thanh dương tính được pha loãng để có nồng độ kháng thể $4 \log_2$ (tức 16 HI). Với các mẫu $4 \log_2$ (có hiệu giá HI biểu hiện ở lỗ thứ nhất đến lỗ thứ 4) thì để nguyên, các mẫu 5, 6, 7... \log_2 được pha loãng 2, 4, 8... lần (tỷ lệ huyết thanh/dung dịch sinh lý tương ứng là 1:1, 1:3, 1:7...). Bảo quản các mẫu huyết thanh $4 \log_2$ trong từng ống nhỏ mỗi ống 1 mL ở nhiệt độ khoảng -20°C chuẩn bị cho phản ứng SSDHI phát hiện virus dại. Mỗi lần thực hiện xét nghiệm SSDHI cần giải đông một số ống huyết thanh vừa đủ cho số mẫu cần kiểm.

2.3.3. Phản ứng trắc định xê lệch ngăn trở ngưng kết hồng cầu trực tiếp chuẩn (SSDHI)

Phản ứng SSDHI được thực hiện với dung dịch sinh lý, huyền dịch hồng cầu 0,5%, dịch kháng nguyên virus làm việc 4 đơn vị ngưng kết hồng cầu (4 HA) và kháng huyết thanh kháng dại đã pha ở nồng độ $4 \log_2$ (tức 16 đơn vị HI) nêu trên và dịch nước bọt chó cần kiểm. Khi trong nước bọt chó có kháng nguyên virus thì việc tiếp xúc trước của virus với kháng thể trong huyết thanh làm huyết thanh giảm hiệu giá ngăn trở ngưng kết hồng cầu và phản ứng sẽ xê lệch sang phía trái (có ít lỗ khay có HI dương tính hơn so với phản ứng chuẩn $4 \log_2$ với 4 lỗ khay có ngăn trở ngưng kết).

Phản ứng thực hiện trên khay 96 lỗ xoay dọc, mỗi khay xét nghiệm được 11 mẫu nước bọt kèm theo 1 phản ứng chuẩn âm tính (tức phản ứng ngăn trở ngưng kết $4 \log_2$) trong đó ở lỗ đầu tiên của dãy 25 μL dung dịch sinh lý được sử dụng thế chỗ cho 25 μL nước bọt. Trình tự các bước ở các dãy kiểm và dãy chuẩn có sự khác biệt và thực hiện như sau.

Bước 1: Cho vào các lỗ của từng dãy mỗi dãy 25 μL dung dịch sinh lý (NaCl 0,9%), trừ lỗ thứ nhất đối với các dãy kiểm, còn ở dãy chuẩn (1 dãy được đánh dấu trong số 12 dãy của một khay 96 lỗ) thì cho dung dịch sinh lý vào đủ 8 lỗ.

Bước 2: Cho vào lỗ thứ nhất của mỗi dãy kiểm mỗi lỗ 25 μL dịch nước bọt cần kiểm (để nguyên dãy chuẩn đã có sẵn dung dịch sinh lý).

Bước 3: Cho vào lỗ thứ nhất của mỗi dãy mỗi lỗ 25 μL huyết thanh $4 \log_2$ (tức 16 HI), trộn rồi hút chuyển 25 μL sang lỗ thứ hai, lại trộn và tiếp tục hút chuyển lần lượt cho đến lỗ thứ 7 thì hút bỏ 25 μL (chừa lỗ thứ 8 làm đối chứng HI dương tính giả định: chỉ gồm hồng cầu và dung dịch sinh lý, để xác định thời điểm đọc phản ứng).

Bước 4: Cho vào các lỗ từ lỗ 1 đến lỗ 7 mỗi lỗ 25 μL dịch virus 4 HA nêu trên và để yên 10 phút cho kháng thể (nếu còn) kết hợp với kháng nguyên.

Bước 5: Cho vào tất cả các lỗ mỗi lỗ 25 μL huyền dịch hồng cầu 0,5% nêu trên, để yên ở nhiệt độ phòng và đọc kết quả sau khoảng 15 - 60 phút dựa vào kết quả của dãy chuẩn và lỗ dương tính giả định (lỗ số 12), khi ở các lỗ 12 và 4 lỗ phía bên trái không có ngưng kết hồng cầu (các hồng cầu chìm xuống giữa đáy lỗ khay tạo thành chấm đỏ đậm) trong khi 3 lỗ còn lại có ngưng kết (hồng cầu phân bố dàn trải, không tạo chấm đỏ ở tâm lỗ). Thông thường do chủ ý pha kháng huyết thanh ở $4 \log_2$ nên ta có 4 lỗ trái có ngăn trở ngưng kết, giúp phát hiện được các mẫu nước bọt chứa kháng nguyên có hiệu giá đến $4 \log_2$ (Hình 2), nhưng nếu cần ta có thể tăng nồng độ kháng thể chuẩn để có 5 hoặc 6, ... lỗ ngăn trở ngưng kết với mục đích phát hiện virus ở nồng độ cao hơn. Lây ranh giới giữa ngưng kết và ngăn trở ngưng kết ở dãy chuẩn làm tiêu chuẩn để đánh giá sự xê lệch phản ứng ở các dãy kiểm. Khi đó, mẫu không xê lệch so với dãy chuẩn là không có kháng nguyên virus tương ứng (âm tính), mẫu có dãy lệch trái 1 lỗ có hiệu giá virus $1 \log_2$ (tức tương ứng 2 HA), tương tự, các mẫu lệch trái 2 hoặc 3... lỗ có hiệu giá virus tương ứng là 2 hoặc 3... \log_2 , các mẫu lệch phải so với dãy chuẩn có chứa kháng thể (với trường hợp kiểm tra dịch nội quan hoặc huyết thanh).

2.4. Xử lý số liệu

- Tỷ lệ nhiễm được xác định theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ nhiễm virus (tỷ lệ dương tính) (\%)} = \frac{\text{Số mẫu dương tính}}{\text{Tổng số mẫu xét nghiệm}} \times 100$$

- Tỷ lệ mẫu có mức kháng thể bảo hộ theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ bảo hộ (\%)} = \frac{\text{Số mẫu } \geq 4 \log_2}{\text{Tổng số mẫu xét nghiệm}} \times 100$$

Mức hiệu giá kháng thể $4 \log_2$ được coi là mức hiệu giá kháng thể bảo hộ (Phạm Hồng Sơn và cs., 2014).

- Hiệu giá trung bình nhân được tính theo công thức: $\text{GMT} = \sqrt{T_1 \times T_2 \times \dots \times T_n}$, trong đó, T_1, T_2, \dots, T_n là hiệu giá kháng nguyên của các mẫu bệnh phẩm xét nghiệm, n là số mẫu. Khi tính GMT, để tránh kết quả về phải bằng không (0) khi có ít nhất một mẫu âm tính ($T = 0$), cần logarit hóa (theo cơ số 2 là hệ số pha loãng cho tiện tính toán): $\log_2 \text{GMT} = (\log_2 T_1 + \log_2 T_2 + \dots + \log_2 T_n) / n$, sau đó chuyển thành $\text{GMT} = 2^{\log_2 \text{GMT}}$ (Surin và cs., 1986). Giá trị trung bình nhân hiệu giá kháng nguyên được coi là cường độ cảm nhiễm virus của quần thể, trong khi giá trị trung bình nhân hiệu giá kháng thể được coi là cường độ bảo hộ miễn dịch của quần thể.

Sự khác biệt của hai tỷ lệ được kiểm chứng thống kê qua chỉ số χ^2 (Snedecor và Cochran, 1980). Giá trị χ^2 thực nghiệm được tính theo công thức:

$$\chi^2 = \frac{(p_1 - p_2)^2}{p(1-p) \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

Trong đó p_1 và p_2 là hai tỷ số xuất hiện thuộc tính theo dõi cần so sánh, n_1 và n_2 là số lượng cá thể mỗi mẫu, p là tỷ số gộp chung của hai mẫu. So sánh với giá trị χ^2 giới hạn lý thuyết phân bố chuẩn 3,84 ở xác suất tương đồng cho phép 5% ($\alpha=0,05$) khi đó nếu χ^2 thực nghiệm bé hơn 3,84 thì hai tỷ số không có sự sai khác. Bên cạnh đó xác suất P ngoài giới hạn tương đồng suy ra từ giá trị χ^2 thực nghiệm cũng được vận dụng trong đánh giá so sánh.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tình hình đáp ứng miễn dịch chống bệnh dại trên địa bàn thành phố Huế

Để đánh giá tình hình miễn dịch chống bệnh dại tại thành phố Huế, chúng tôi xét nghiệm mẫu huyết thanh chó tại các phường An Hòa, Tây Lộc, Vỹ Dạ thuộc thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế bằng phương pháp HI và đã thu được kết quả ở bảng 1. Trên cơ sở dữ liệu thu được và kết quả nghiên cứu so sánh của Phạm Hồng Sơn và cs. (2014) cho biết mức hiệu giá kháng thể $4 \log_2$ tương đương mức bảo hộ 0,5 IU/mL mà WTO áp dụng đối với chó xuất nhập cảnh ở châu Âu (Chappuis, 1996), chúng tôi thu được bảng 1 sau đây.

Bảng 1. Tỷ lệ bảo hộ miễn dịch của chó nuôi tại các địa bàn khảo sát thuộc thành phố Huế cuối năm 2016

Địa điểm	Tổng số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính		Số mẫu bảo hộ		Giá trị χ^2 so sánh với tỷ lệ bảo hộ thấp nhất	Cường độ bảo hộ (GMT)
		Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)		
An Hòa	44	40	90,9	32	72,73	0,000	17,59
Tây Lộc	44	43	97,72	34	77,27	0,242	24,48
Vỹ Dạ	44	43	97,72	33	75	0,059	24,48
Tổng	132	126	95,45	99	75,8	0,000	21,93

Bảng 1 cho thấy tại hai phường Tây Lộc và Võ Dạ có 43/44 số mẫu huyết thanh xét nghiệm chứa kháng thể kháng virus dại, đạt tỷ lệ 97,72%. Trong đó, số mẫu huyết thanh đạt tỷ lệ bảo hộ (hiệu giá kháng thể $\geq 4 \log_2$) tại phường Tây Lộc là 34/44 mẫu, đạt tỷ lệ 77,27%, ở phường Võ Dạ tỷ lệ này đạt 33/44 mẫu tương ứng 75% được bảo hộ. Tỷ lệ này khá cao so với những nghiên cứu trước đây đã được thực hiện tại cùng địa phương trong những năm qua, với tỉ lệ chó đạt mức hiệu lực miễn dịch bảo hộ ước tính cuối năm 2013 chỉ đạt khoảng 55,56% so với tổng đàn (Phạm Hồng Sơn và cs., 2014). Với phường An Hòa, tỷ lệ số mẫu dương tính khi xét nghiệm bằng HI là 40 mẫu/44 mẫu xét nghiệm, đạt tỷ lệ 90,9% số mẫu có kháng thể khi xét nghiệm và đạt tỷ lệ bảo hộ 72,73%. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu cũng cho tỷ lệ bảo hộ cao tương ứng với cường độ bảo hộ cao, GMT chung của các địa bàn là 21,93, trong đó ở An Hòa là 17,59, ở Tây Lộc là 24,48 còn ở Võ Dạ là 21,93 và đều cao hơn mức 4 \log_2 (mức tương đương 16 HI). Để ngăn chặn được quá trình lây lan mầm bệnh truyền nhiễm cần tạo miễn dịch đàn hiệu quả trên 70 - 80% số cá thể miễn dịch (Shimizu và cs., 1999). Như vậy, việc tiêm phòng ở các địa bàn nghiên cứu thuộc thành phố Huế trong nghiên cứu này là đã đạt yêu cầu để ngăn ngừa bệnh dại lây lan. Có thể, người dân đã chú tâm hơn trong việc tiêm phòng vaccine dại cho vật nuôi.

Hình 1 cho thấy phản ứng HI xác định hiệu giá kháng thể chống virus dại trong huyết thanh chó với hồng cầu ngan và kháng nguyên virus dại vaccine Rabigen[®] mono (Virbac). Việc đọc phản ứng HI với virus dại là dễ dàng bằng mắt thường nhờ so sánh các lỗ có pha huyết thanh với hai lỗ cuối cùng của cùng dãy. Kết quả 8 mẫu huyết thanh đầu tiên được xét nghiệm với hiệu giá lần lượt là: 6, 6, 4, 5, 4, 4, 4 và 6 \log_2 , đều đạt và vượt mức bảo hộ miễn dịch.



Hình 1. Ảnh chụp kết quả phản ứng HI xác định hiệu giá kháng thể chống bệnh dại ở huyết thanh chó thu thập cuối năm 2016 tại thành phố Huế

Phản ứng HI xác định hiệu giá kháng thể chống virus dại trong huyết thanh chó, như vậy, là phương pháp thuận tiện cho việc nghiên cứu tình hình miễn dịch chống bệnh này vì với nguyên liệu chủ yếu chỉ gồm vaccine dại và hồng cầu ngan.

3.2. Tình hình lưu hành virus dại trên chó nuôi tại các địa bàn khảo sát thuộc thành phố Huế

Xét nghiệm các mẫu nước bọt chó lấy ở phường An Hòa, Tây Lộc và Võ Dạ thuộc thành phố Huế bằng phản ứng trắc định xê lệch ngăn trở ngưng kết hồng cầu trực tiếp chuẩn (SSDHI) cho kết quả như ở bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Phân bố hiệu giá kháng nguyên virus dại và cường độ cảm nhiễm virus dại ở chó

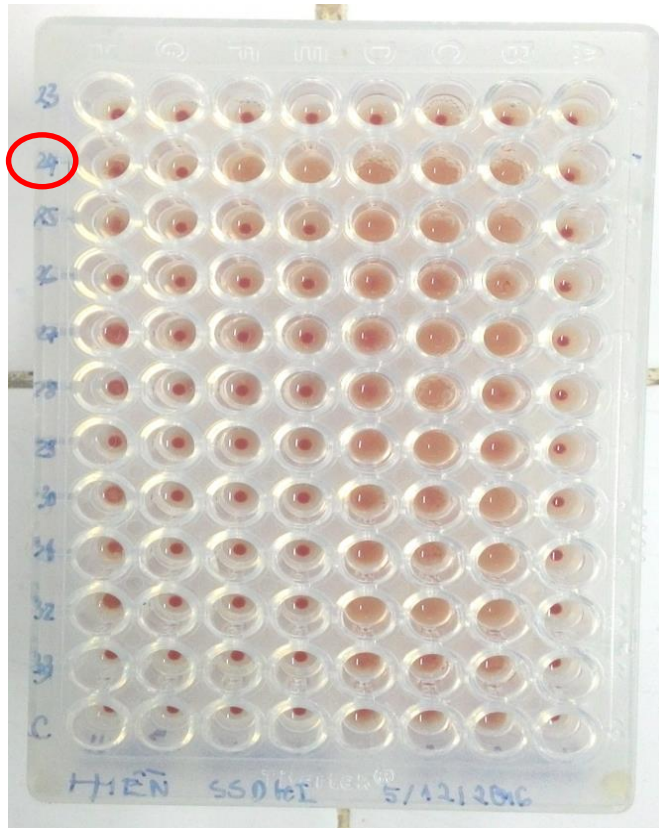
Địa bàn	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ dương tính (%)	Giá trị χ^2 so sánh với tỷ lệ thấp nhất	Phân bố hiệu giá kháng nguyên ($\times \log_2$)				Cường độ cảm nhiễm (GMT)
					1	2	3	4	
An Hòa	73	3	4,11	0,2214	2	0	1	0	1,05
Tây Lộc	74	2	2,70	0,0000	2	0	0	0	1,02
Võ Dạ	73	3	4,11	0,2214	2	1	0	0	1,04
Tổng	220	8	3,64	0,1469	6	1	1	0	1,04

Kết quả nghiên cứu cho thấy trong tổng số 220 mẫu nước bọt xét nghiệm ở ba phường An Hòa, Tây Lộc và Võ Dạ, thành phố Huế có 8 mẫu dương tính chiếm tỷ lệ 3,64%, hiệu giá các mẫu dương tính phân bố chủ yếu ở mức 1 log₂, không có mức cao hơn 3 log₂, với cường độ nhiễm (hiệu giá trung bình nhân toàn đàn, GMT) virus dại là 1,04. Như vậy, việc thiết kế phản ứng SSDHI với hiệu giá chuẩn âm tính 4 log₂ (16 HI) là phù hợp.

Trong số các mẫu được xét nghiệm, tại từng địa bàn An Hòa, Tây Lộc và Võ Dạ với số mẫu xét nghiệm tương ứng là 73, 74 và 75 có 3, 2 và 3 mẫu dương tính chiếm tỷ lệ tương ứng là 4,11%, 2,7% và 4,11%, ứng với cường độ nhiễm virus dại là 1,05, 1,02 và 1,04. Các tỷ lệ nhiễm không sai khác có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ thấp nhất của An Hòa là 2,7% (các giá trị χ^2 thực nghiệm đều nhỏ hơn χ^2 lý thuyết là 3,84 ứng với 1 bậc tự do và xác suất ngoài giới hạn 5%). Từ kết quả trên cho thấy sự lưu hành của virus dại ở chó tại ba phường thấp như nhau nhưng mầm bệnh vẫn tồn tại.

Kết quả nghiên cứu này tương đương với kết quả của nhóm nghiên cứu Phạm Hồng Sơn và cs. (2014) bằng phương pháp SSIA cho thấy từ chó nuôi ở Thừa Thiên Huế năm 2013 và đầu năm 2014 có 4,03% số mẫu dương tính virus dại với hiệu giá trung bình nhân là 1,028, trong đó ở Kim Long tỷ lệ dương tính là 6,9%, Tây Lộc 6,25, Thuận Hòa 5,26%, còn ở Hương Chữ là 0% và có xu hướng gia tăng tỉ lệ chó nhiễm virus dại từ năm 2013 (4,71%) sang năm 2014 (5,97%) ở địa bàn khảo sát.

Hình 2 cho thấy trong số 11 mẫu (số 23 đến số 33) được xét nghiệm SSDHI có 1 mẫu (số 24) dương tính với hiệu giá virus 2 log₂, tức lệch trái 2 lỗ so với dây chuẩn (C, ở dưới cùng). Như vậy, là phương pháp vận dụng mới nhưng phản ứng SSDHI phát hiện virus dại đáp ứng yêu cầu xét nghiệm chẩn đoán nhờ biểu hiện rõ ràng, phản ứng đối chứng âm ổn định, phản ứng ở các mẫu kiểm luôn được đối chiếu với mẫu đối chứng nên dễ phân định kết quả. Các mẫu âm tính biểu hiện đồng nhất, mẫu dương tính biểu hiện khá nhanh chóng, đọc được bằng mắt thường sau khoảng 30 phút. Việc phát hiện của chúng tôi về phản ứng ngưng kết giữa hồng cầu ngan với virus dại, như vậy, có ý nghĩa quan trọng trong chẩn đoán xác định bệnh dại.



Hình 2. Hình ảnh chụp kết quả SSDHI phát hiện virus dại trong mẫu nước bọt chó cuối năm 2016 tại thành phố Huế. Một mẫu (số 24, có khoanh số) trong số 11 mẫu nước bọt có chứa virus dại (nồng độ 2 log₂: lệch trái 2 lỗ so với dãy chuẩn có ký hiệu C ở cuối cùng).

3.3. Ảnh hưởng của mùa vụ đến sự lưu hành virus dại trên các địa bàn khảo sát

Qua quá trình lấy mẫu và tiến hành xét nghiệm trên hai đợt, đợt 1 từ tháng 9 đến hết tháng 10, đợt 2 từ tháng 11 đến hết tháng 12 năm 2016, từ đàn chó nuôi tại phường An Hòa, Tây Lộc và Võ Dạ, chúng tôi thu được kết quả như sau (bảng 3).

Bảng 3. Phân bố hiệu giá kháng nguyên virus dại của chó tại phường An Hòa, Tây Lộc và Võ Dạ, qua hai đợt lấy mẫu năm 2016

Địa bàn	Đợt	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ dương tính (%)	Giá trị χ^2 so sánh tỷ lệ giữa hai đợt khảo sát	Phân bố hiệu giá kháng nguyên ($\times \log_2$)				GMT
						1	2	3	4	
An Hòa	Đợt 1	38	3	7,89	2,8826 (P~0,14)	2	0	1	0	1,0955
	Đợt 2	35	0	0		0	0	0	0	1,0000
	Tổng	73	3	4,11		2	0	1	0	1,0486
Tây Lộc	Đợt 1	36	0	0	1,9474 (P~0,17)	0	0	0	0	1,0000
	Đợt 2	38	2	5,3		2	0	0	0	1,0372
	Tổng	74	2	2,7		2	0	0	0	1,0189
Võ Dạ	Đợt 1	36	2	5,56	0,3768 (P~0,54)	2	0	0	0	1,0393
	Đợt 2	37	1	2,7		0	1	0	0	1,0382
	Tổng	73	3	4,11		2	1	0	0	1,0387
Chung	Đợt 1	110	5	4,55	0,5189 (P~0,46)	4	0	1	0	1,0451
	Đợt 2	110	3	2,73		2	1	0	0	1,0255
	Tổng	220	8	3,64		6	1	1	0	1,0353

Kết quả ở bảng 3 cho thấy tỷ lệ nhiễm chung là 3,36% trong số 220 mẫu được xét nghiệm, với cường độ nhiễm (tức hiệu giá trung bình nhân toàn đàn, GMT) là 1,0353.

Trong 73 mẫu ở An Hòa được xét nghiệm có 3 mẫu dương tính chiếm tỷ lệ 4,11%, với cường độ nhiễm virus đại là 1,0189. Trong đợt 1 với tổng số mẫu được xét nghiệm là 38 có 3 mẫu dương tính chiếm 7,89%, với cường độ nhiễm là 1,0486. Trong đợt 2 với tổng số mẫu xét nghiệm là 35 có 0 mẫu dương tính.

Xét nghiệm các mẫu nước bọt thu được từ đàn chó nuôi tại phường Tây Lộc, cho thấy trong số 74 mẫu được xét nghiệm có 2 mẫu dương tính chiếm tỷ lệ 2,7% với cường độ nhiễm virus đại là 1,0189. Trong đợt 1 với tổng số mẫu được xét nghiệm là 36 có 0 mẫu dương tính. Trong đợt 2 với tổng số mẫu xét nghiệm là 38 có 2 mẫu dương tính chiếm 5,3% với cường độ nhiễm virus đại là 1,0372.

Tương tự, từ đàn chó nuôi tại phường Võ Dạ, ta thấy trong tổng số 73 mẫu xét nghiệm có 3 mẫu dương tính chiếm tỷ lệ 4,11%, với cường độ nhiễm virus đại là 1,0387. Trong đợt 1 với tổng số mẫu được xét nghiệm là 36 có 2 mẫu dương tính chiếm 5,56%, với cường độ nhiễm là 1,0451. Trong đợt 2 với tổng số mẫu xét nghiệm là 37 có 1 mẫu dương tính chiếm 2,7% số mẫu xét nghiệm, với cường độ nhiễm là 1,0387.

Những kết quả trên cho thấy sự lưu hành của virus đại ở chó trên địa bàn phường An Hòa, Tây Lộc và Võ Dạ nhìn chung với tỷ lệ nhiễm không cao và có sự khác biệt giữa các tỷ lệ nhiễm tính theo từng đợt cũng như theo địa bàn. Tuy nhiên, xử lý thống kê cho thấy sự sai khác của các tỷ lệ nhiễm giữa 2 đợt tính chung cả địa bàn cũng như tính riêng theo từng phường đều không có ý nghĩa thống kê. Kết quả nghiên cứu như vậy cũng cho thấy virus nguy hiểm này vẫn tồn tại trên đàn chó và đòi hỏi lưu ý đến các biện pháp phòng ngừa thích hợp.

4. KẾT LUẬN

Đáp ứng miễn dịch dịch thể chống đại ở đàn chó nuôi tại các phường An Hòa, Tây Lộc và Võ Dạ thuộc thành phố Huế lần lượt là 90,9%, 97,72% và 97,72% với tỷ lệ dương tính chung là 95,45%. Tỷ lệ bảo hộ miễn dịch ở chó nuôi tại các phường nêu trên cũng lần lượt là 72,73%; 77,27% và 75% với cường độ bảo hộ tương ứng là 17,59; 24,48 và 24,48, đều cao hơn mức 16 (tương ứng 4 log₂). Đây là kết quả khả quan trong vấn đề phòng chống dịch bệnh đại tại địa phương, phản ánh những nỗ lực trong công tác tiêm phòng của thú y cơ sở cũng như chủ vật nuôi.

Tỷ lệ nhiễm virus đại trên chó nuôi tại các phường An Hòa là 4,11%, Tây Lộc là 2,70% và Võ Dạ là 4,11%, trong khi tỷ lệ nhiễm chung là 3,64%, chứng tỏ mầm bệnh đại vẫn tồn tại và có nguy cơ gây bệnh. Do đó, cần phải có biện pháp phòng tránh thích hợp, triển khai tiêm phòng đại theo quy định. Hai đợt xét nghiệm cho các kết quả tuy có sự khác biệt nhưng không sai khác có ý nghĩa thống kê khi xét riêng theo từng địa bàn cũng như xét chung.

Sử dụng HI và SSDHI trong xét nghiệm chẩn đoán bệnh đại là phương pháp hiệu quả, cho kết quả nhanh và có tính chủ động cao, đáp ứng cho việc xử lý các tình huống dịch bệnh cũng như nghiên cứu dịch tễ học bệnh đại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, (2014). *Công điện khẩn về việc tăng cường công tác phòng chống bệnh đại trên động vật*, số 03/CĐ-BNN-TY.

Bộ Y tế, (2013). *Về việc tăng cường phòng chống bệnh Đại*, số 5632/BYT-DP, ngày 11/9/2013.

Doãn Hòa, (24/3/2017). Một xã có 53 người nghi bị chó đại cắn, bé 4 tuổi tử vong.

Nguyễn Thị Hoàng Oanh, Phạm Thị Hồng Lam, Đỗ Thị Lợi & Phạm Hồng Sơn, (2012). Sử dụng tổ hợp phản ứng ngưng kết hồng cầu trực tiếp với trắc định xê dịch ngăn trở ngưng kết hồng cầu

chuẩn (HA-SSDHI) và trắc định xê dịch ngưng kết gián tiếp chuẩn (SSIA) trong chẩn đoán bệnh Niucatxon. *Khoa học Kỹ thuật Thú y*, XIX(1), 48-56.

Phạm Hồng Sơn. (2004). Sử dụng phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu gián tiếp phát hiện kháng nguyên dịch tả lợn. *Khoa học Kỹ thuật Thú y*, XI(1), 87-89.

Phạm Hồng Sơn, (2004a). Tình hình bệnh dịch tả lợn qua chẩn đoán huyết thanh học tại Thừa Thiên Huế. *Khoa học Kỹ thuật Thú y*, XI(2), 11-18.

Phạm Hồng Sơn, (2005). Tình hình cảm nhiễm dịch tả lợn ở lợn giết mổ tại Thừa Thiên - Huế. *Khoa học Kỹ thuật Thú y XII, 1*, 6-11.

Phạm Hồng Sơn, (2009). Nghiên cứu tạo kháng nguyên ngưng kết hồng cầu gián tiếp gắn virus cúm A và vận dụng mới trong chẩn đoán bệnh cúm ở gia cầm. *Khoa học Kỹ thuật Thú y XVI, 2*, 12-22.

Phạm Hồng Sơn, Nguyễn Thị Thu Hiền, Võ Thị Tân, Trần Thùy Hoan, Trần Văn An, Nguyễn Đình Thành, Hồ Thị Mỹ Nữ, Trần Quang Vui & Lê Xuân Ánh, (2014). Phát hiện virus dại trong nước bọt và kháng thể kháng dại trong huyết thanh của chó nuôi ở Bắc Trung Bộ bằng kỹ thuật SSIA và IHA. *Khoa học Kỹ thuật Thú y*, XXI(8), 5-16.

Ủy ban Nhân dân tỉnh Thừa Thiên Huế, (16/9/2013). *Công điện về việc tăng cường phòng, chống bệnh Dại năm 2013*, số 12/CD-UBND ngày 16/9/2013.

Tài liệu tiếng nước ngoài

Banyard, A. C., Horton, D. L., Freuling, C., Müller, T., & Fooks, A. R., (2013). Control and prevention of canine rabies: The need for building laboratory-based surveillance capacity. *Antiviral Research*, 98, 357-364.

Chappuis, G., (1996). *Development of rabies vaccines. Third International Symposium on Rabies control in Asia*. Elsevier, 61-69.

Cottral, G. E., (1889). *Standardized Methods for Veterinary Microbiology*. Cornell University Press, Ithaca & London, 69-74.

Hatz, C. F., Kuenzli, E., & Funk, M., (2012). Rabies: relevance, prevention, and management in travel medicine. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(3), 739-753.

Hirst, G. K., (1941). The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus, *Science*, 94:22-23.

Pham Hong Son, Pham Hong Ky, Nguyen Thi Lan Huong, & Pham Thi Hong Ha, (2013). Application of Shifting assay of standardized indirect agglutination (SSIA) for detection of antigens of Newcastle disease and Infectious Bursal disease viruses in chicken faeces, *Tạp chí Khoa học (Journal of Science)*, 83, 99-111.

Shimizu, Y., Kanoe, M., Tabuchi, K., Hiramune, T., & Mikami, T. (ed.), (1999). *Juui densenbyou gaku (Thú y truyền nhiễm bệnh học) daigoban*, Kindai shuppan, Tokyo, 22.

Snedecor, G. W., Cochran, W. G., (1980). *Statistical methods, 7th ed.*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

Surin, V. N., Belousova, P. B., Solovjev, K. V., & Fomina, N. V., (1986). *Spravotchnik metody laboratornoi diagnostiki virusnykh boleznei zhyvotnykh*. Agroproizdat, Moskva.

Yousaf, M. Z., Qasim, M., Zia, S., Khan, M., Ashfaq, U. A., Khan, S., (2012). Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment. *Virology Journal*, 21(9), 50.

DETERMINATION OF HUMORAL IMMUNITY TO RABIES AND PREVALENCE OF THE VIRUS IN DOGS REARED IN SOME LOCALITIES OF HUE CITY WITH THE METHODS OF HI AND SSDHI

Pham Hong Son¹, Nguyen Thi Ngoc Hien²

¹Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine,
University of Agriculture and Forestry, Hue University

²Vy Da ward, Hue city, Thua Thien Hue province

Contact email: sonphdhn1@huaf.edu.vn

ABSTRACT

With the methods of Haemagglutination Inhibition (HI) and Shifting Assay of Standardized Direct Haemagglutination Inhibition (SSDHI), this study determined humoral immune to rabies and the virus infection percentages in dogs reared in several wards of Hue city in the late of 2016. Anti-rabies antibodies were detected in 90.9, 97.72 and 97.72% dogs reared in An Hoa, Tay Loc and Vy Da, respectively, with the common positive rate of 95.45%. The rates of dogs having immune protection (with antibody titer level not smaller than 4 log₂) are 72.3, 77.27 and 75% respectively with common immune intensity (geometric mean titer) higher than herd protection level of 16, reaching 17.59, 24.48 and 24.48 in turn. Rabies virus carrier rates are 4.11% in An Hoa, 2.7% in Tay Loc, and 4.11% in Vy Da, with common prevalence at 3.64%, indicating that the virus threat is still present at the localities.

Key words: haemagglutination, inhibition, rabies, SSDHI, virus

Received: May 27, 2017

Reviewed: June 12, 2017

Accepted: June 15, 2017

