

XÁC LẬP THÔNG SỐ CHỈ BÁO MỨC BẢO HỘ MIỄN DỊCH CỦA KHÁNG THỂ CHỐNG BỆNH DO PARVOVIRUS (CPV) TRONG HUYẾT THANH CHÓ

Phạm Hồng Sơn*, Ngô Thị Thanh Trà

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

*Tác giả liên hệ: sonphdhnl@huaf.edu.vn

Nhận bài: 08/09/2020 Hoàn thành phân biên: 18/10/2020 Chấp nhận bài: 29/10/2020

TÓM TẮT

Được coi là “tiêu chuẩn vàng” trong đánh giá miễn dịch đặc hiệu nhưng phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) chưa được vận dụng trong thực tế để kiểm soát chất lượng vaccine phòng bệnh CPV ở chó. Hơn nữa, hiệu giá kháng thể huyết thanh trong các xét nghiệm HI thường nhật của chúng tôi thường thấp hơn mức một số nhóm trước đây sử dụng làm ngưỡng bảo hộ miễn dịch đã đòi hỏi thiết lập lại quy trình. Trong nghiên cứu này, phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA) và HI được thực hiện với thể tích 25 μ L các thành phần gồm dung dịch NaCl 0,9%, dịch hồng cầu gà 1%, dịch virus vaccine CPV hiệu giá 04 HAU và huyết thanh nguyên dạng của chó tiêu chảy xuất huyết. Đối chiếu các kết quả HI huyết thanh với kết quả phát hiện kháng nguyên CPV trong phân theo từng cá thể đã xác minh mức kháng thể HI 4 log₂ trở lên theo quy trình này là một chỉ báo trạng thái bảo hộ miễn dịch chống CPV ở chó. Nghiên cứu cũng cho thấy vaccine CPV sử dụng tại khu vực thành phố Huế có hiệu lực, như cường độ miễn dịch ở nhóm chó đã từng được tiêm vaccine (60,59 HIU) cao hơn ($P < 0,001$) so với nhóm chưa tiêm (6,73 HIU). Tương tự, tỷ lệ chó mắc bệnh CPV (có virus này trong phân) ở nhóm đã từng được tiêm vaccine (2,63%) thấp hơn ($P < 0,001$) so với nhóm chưa tiêm (59,38%).

Từ khóa: Bảo hộ miễn dịch, Chó, Huyết thanh, Parvovirus, Tiêu chảy

DETERMINATION OF A PARAMETER INDICATING PROTECTIVE LEVELS OF IMMUNE ANTIBODIES IN DOGS' SERA AGAINST CANINE PARVOVIRUS (CPV)

Pham Hong Son*, Ngo Thi Thanh Tra

University of Agriculture and Forestry, Hue University

ABSTRACT

Though considered as “the gold standard” for evaluation of specific immunity, the reaction of haemagglutination inhibition (HI) is still not applied in practice for controlling the quality of CPV vaccination in dogs. Moreover, that serum antibody titers in our routine HI tests are often much lower than the level previous authors applied as the threshold of immune protection requested re-establishing the procedures. In this research, the techniques of haemagglutination (HA) and HI reactions were performed with the same pipette volumes of 25 μ L of 0.9% saline solution, chicken red blood cell 1% suspension, CPV vaccine virus of 4 HAU titre and untreated sera of haemorrhagic diarrhea-suffered dogs. Individually matching the serum antibodies and faecal CPV antigens suggested that, according to this protocol, the level of 4 log₂ HI of serum antibody titer be an indicator of protective immune status of dogs against CPV. The study also showed that the CPV vaccines used in the studied region were effective as the immune intensity in vaccinated dogs was much higher (60.59 HIU) than ($P < 0.001$) in unvaccinated dogs (6.73 HIU). In addition, the rate (2.63%) of dogs contracted with CPV (having the virus in their faeces) amongst the vaccinated dogs was much ($P < 0.001$) lower than that (59.38%) of the unvaccinated ones.

Keywords: Diarrhea, Dog, Immune protection, Serum, Parvovirus

1. MỞ ĐẦU

Chó nuôi thường mắc khá nhiều loại bệnh. Trong số các bệnh viêm ruột xuất huyết ở chó, bệnh parvo ở chó do CPV (Canine *Parvovirus* type 2) gây ra là bệnh có tầm quan trọng toàn thế giới (Prettie, 2004). Với cấu trúc virion không có áo ngoài và bộ gene là DNA một sợi tái sản tự lập thuộc họ *Parvoviridae* (Siegl và cs., 1985), parvovirus chó có tính đề kháng rất cao với các điều kiện bất lợi của môi trường nên bệnh lây lan trên diện rộng trong các quần thể chó nhà và chó hoang (Parrish, 1990). Chó bệnh thường viêm dạ dày ruột, nôn mửa, tiêu chảy ra máu đưa đến kết quả trầm trọng nếu không chữa trị kịp thời (Phạm Sỹ Lăng và cs., 1998; Nguyễn Văn Dũng và cs., 2018). Ở chó gây nhiễm thực nghiệm không điều trị tỷ lệ chết đạt đến 97% (Prettie, 2004). Bệnh lây nhiễm nhanh, tỷ lệ chó nhiễm và tỷ lệ chó chết khá cao, thường thấy ở trên chó non từ 6 - 20 tuần tuổi và tập trung vào khoảng 08 tuần tuổi, thời điểm miễn dịch thụ động từ sữa mẹ đã hết mà cơ thể chó con chưa tự tạo miễn dịch (Mahon và cs., 2017). Việc kiểm tra kháng thể huyết thanh chó con trước khi tiêm vaccine nhằm tránh được tác động bất lợi của kháng thể thụ động từ sữa mẹ đến vaccine cũng như để đánh giá chất lượng tiêm vaccine phòng bệnh cho đàn là rất cần thiết. Tiêm vaccine để phòng bệnh CPV cho chó được xác định là biện pháp phòng bệnh hữu hiệu. Hiện nay, tuy thị trường đã có một số loại vaccine phòng bệnh CPV, nhưng chúng ta còn chưa có nghiên cứu tại chỗ về hiệu quả của vaccine sau khi tiêm cho chó. Việc mặc định rằng đã tiêm vaccine là có hiệu lực, tức chó đã được miễn dịch, có thể dẫn đến những hậu quả đáng tiếc do hiệu quả miễn dịch sau tiêm vaccine phụ thuộc vào chất lượng vaccine, chế độ bảo quản, liều tiêm... và kỹ thuật tiêm. Chó đã được tiêm vaccine

mà không có miễn dịch bảo hộ có nguy cơ nhiễm bệnh cao do không được áp dụng biện pháp khác để phòng bệnh, đặc biệt ở các tâm điều trị bệnh thú cưng. Dù rất cần thiết, việc kiểm tra miễn dịch sau tiêm vaccine bằng các xét nghiệm hiện có trong thú y như phương pháp ELISA (Waner và cs., 1996) hay sắc ký miễn dịch (Oh và cs., 2006) trong nghiên cứu dịch tễ học quy mô mẫu lớn còn hạn chế, chủ yếu do sinh phẩm thiết yếu không có sẵn nên giá thành cao và thiếu chủ động. Trong bối cảnh đó, chúng tôi đã chọn sử dụng kỹ thuật ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) để nghiên cứu đánh giá miễn dịch ở chó chống CPV như đã áp dụng đánh giá đáp ứng miễn dịch của các động vật đối với các virus có thuộc tính ngưng kết hồng cầu (virus HA) đã được biết (Phạm Hồng Sơn và Nguyễn Thị Ngọc Hiền, 2017; Lê Đình Quang và cs., 2018; Phan Ngọc Tuyết và cs., 2018; Lê Duy Báu và cs., 2019). Phương pháp HI được coi là “tiêu chuẩn vàng” (the gold standard) đối với các xét nghiệm định lượng kháng thể (Prittie, 2004; Oh và cs., 2006). Tuy nhiên, ngưỡng hiệu giá kháng thể chỉ thị bảo hộ miễn dịch là vấn đề rất đáng quan tâm. Một số nghiên cứu về tác động ức chế miễn dịch đặc hiệu sau tiêm vaccine bởi kháng thể thụ động qua sữa mẹ bằng phản ứng HI với hồng cầu lợn và huyết thanh chó đã xử lý kaolin (Carmichael và cs., 1980; Pollack và Carmichael, 1982) đã suy định và áp dụng mức hiệu giá HI 1:80 làm mức tiêu chuẩn bảo hộ miễn dịch ở chó chống lại virus này. Tuy nhiên, theo một nghiên cứu khác (Mahon và cs., 2017) nếu lấy mức hiệu giá HI của kháng thể huyết thanh là 1:80, tức huyết thanh chứa ít nhất 80 đơn vị ngăn trở ngưng kết hồng cầu (80 HIU) trong mỗi đơn vị thể tích tham gia phản ứng, làm mức chuẩn của nồng độ kháng thể bảo hộ thì có sự bất cập. Xét nghiệm với kỹ thuật HI tương tự đã cho thấy chỉ có 81%

(65/80) chó đang được điều trị tích cực tại trung tâm thú y đạt mức kháng thể bảo hộ miễn dịch chống CPV mặc dù trước đó chúng đã được tiêm phòng bệnh này. Trong quy trình đó, việc xử lý huyết thanh chó bằng kaolin trước khi thực hiện phản ứng xét nghiệm HI (Carmichael và cs., 1980; Pollack và Carmichael, 1982; Mahon và cs., 2017) làm mất nhiều thời gian và đòi hỏi lượng huyết thanh lấy từ động vật phải nhiều hơn mức cần thiết. Ngoài ra, do việc xử lý làm loãng huyết thanh nên nguồn huyết thanh thu được không còn thích hợp cho xét nghiệm phát hiện kháng nguyên virus với mục đích chẩn đoán bệnh cảm nhiễm các virus HA ở động vật (Phạm Hồng Sơn và Nguyễn Thị Ngọc Hiền, 2017; Phan Ngọc Tuyết và cs., 2018; Lê Duy Bái và cs., 2019). Những bất cập đó đã thúc đẩy chúng tôi phải tìm loại hồng cầu mới phù hợp hơn, có thể thực hiện trực tiếp với huyết thanh không qua xử lý. Từ đó, việc phát hiện kháng nguyên *Parvovirus* trong bệnh phẩm bởi kỹ thuật trắc định xê lệch ngăn trở ngưng kết hồng cầu trực tiếp chuẩn (SSDHI) (Nguyễn Thị Hoàng Oanh và cs., 2012; Phạm Hồng Sơn và Nguyễn Thị Ngọc Hiền, 2017; Phan Ngọc Tuyết và cs., 2018; Lê Duy Bái và cs., 2019) cũng đã được thực hiện thành công với đối chứng dương tính là parvovirus vaccine. Bằng 02 kỹ thuật HI và SSDHI, chúng tôi đã xét nghiệm xác định hiệu giá kháng thể trong huyết thanh và kháng nguyên *Parvovirus* chó trong dịch chiết từ phân của chó bệnh tiêu chảy xuất huyết. Từ các kết quả xét nghiệm mẫu bất cập kháng nguyên - kháng thể của từng cá thể chó, chúng tôi đã xác định giá trị ngưỡng hiệu giá kháng thể HI trong huyết thanh chó nguyên dạng ứng với mức bảo hộ miễn dịch của chó. Đồng thời, với ngưỡng bảo hộ được xác lập đó, hiệu quả tiêm vaccine CPV trên địa bàn nghiên cứu đã được đánh giá.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Đánh giá khả năng sử dụng hồng cầu gà trong việc thực hiện phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA) với virus vaccine parvo chó (Biocan P, dạng lỏng) trong thành phần của vaccine Biocan Puppy Inj. (Bioveta, Szech, do Công ty Greenvet định dạng và cung cấp, hay Biocan Puppy Inj., Bioveta - Greenvet).

- Xác định hiệu giá kháng thể trong huyết thanh và sự có mặt của parvovirus trong phân chó tiêu chảy đã tiêm vaccine và chưa tiêm vaccine.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Hồng cầu thu từ máu gà trống trưởng thành.

Chó trên 03 tháng tuổi (để chắc chắn không còn chịu ảnh hưởng của kháng thể thụ động từ sữa mẹ) nuôi trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế được đưa đến điều trị ở Trung tâm Chẩn đoán và Điều trị động vật thuộc Chi cục Thú y tỉnh Thừa Thiên Huế trong giai đoạn nghiên cứu (từ tháng 07 năm 2019 đến tháng 01 năm 2020) vì lý do tiêu chảy xuất huyết nghi mắc bệnh CPV.

2.2.2. Thiết bị và vật liệu nghiên cứu

Dụng cụ chủ yếu của phản ứng là pipet tự động có cỡ thuận tiện cho việc hút và chuyển 25 μ L và khay vi chuẩn độ (microtitration plate) 96 lỗ đáy U. Vật liệu chủ yếu cho phản ứng gồm dung dịch sinh lý NaCl (NaCl 0,9% trong nước), dung dịch chống đông máu (natri citrate 3%), vaccine bệnh parvovirus chó (parvo virus enteritidis canis) vô hoạt (thành phần P của vaccine Biocan Puppy Inj., Bioveta - Greenvet, dạng lỏng), huyền dịch hồng cầu gà 1%. Đồng thời thành phần D (virus febris contagiose canis vaccine, đông khô) của vaccine cũng được sử dụng làm nguồn

kháng nguyên virus làm đối chứng cho kết quả phản ứng HA của virus vaccine CPV).

2.2.3. Lấy mẫu xét nghiệm

Hồng cầu gia cầm được lấy từ tĩnh mạch cánh vào bơm tiêm chứa dung dịch chống đông máu tại phòng thí nghiệm hoặc thu tại lò mổ bằng cách hứng các bình chứa dung dịch chống đông máu dưới dòng máu gia cầm bị cắt tiết, lắc nhẹ cho trộn đều với chất chống đông máu. Thêm dung dịch sinh lý muối, trộn đều và quay ly tâm 2.000 vòng/phút trong 02 phút để giữ lại cặn tế bào ở đáy ống. Lặp lại việc trộn dịch sinh lý và rửa 02 lần nữa. Sau khi quay ly tâm lần cuối, một thể tích hồng cầu được hút từ đáy ống nghiệm bằng pipet và pha vào 100 thể tích dung dịch sinh lý.

Huyết thanh chó được chiết theo cá thể từ máu được lấy từ tĩnh mạch cánh và cho máu đông dọc thành ống bơm tiêm đến khi huyết thanh tách ra thì rót vào ống Eppendorf và bảo quản tủ lạnh ở âm 10°C cho đến khi làm xét nghiệm.

Phân chó tiêu chảy được lấy vào bao PE và thêm vào đó một lượng nước cất tương đương, vò từ phía ngoài bao bằng các đầu ngón tay cho phân trộn đều, để nghiêng cho dịch chảy sang một góc bao, hút 1,0 mL vào ống Eppendorf và quay ly tâm ở 15.000 vòng/phút trong 05 phút rồi hút lấy 0,1 mL dịch trong suốt chuyển sang một ống mới để làm nguyên liệu xét nghiệm hoặc nắp kín để bảo quản ở âm 10°C cho đến khi xét nghiệm.

Ngoài ra, trong quá trình lấy mẫu, các thông tin liên quan đến chó được lấy mẫu như tính biệt, tuổi, cân nặng, tiêm phòng, hình thức nuôi... được thu thập kèm theo. Trước khi xét nghiệm, các mẫu huyết thanh và dịch phân được để rã đông hoàn toàn ở nhiệt độ phòng và trộn đều.

2.3. Tiến trình thí nghiệm

2.3.1. Kiểm tra thuộc tính ngưng kết hồng cầu (HA) của virus vaccine cần kiểm

Phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA) được thực hiện với 25 μ L các yếu tố: dung dịch sinh lý, huyền dịch hồng cầu gà 1% và dịch virus vaccine cần kiểm có bố trí đối chứng âm tính ở hai lỗ cuối cùng (số 11 và 12) như đã mô tả trước đây (Phạm Hồng Sơn và Nguyễn Thị Ngọc Hiền, 2017). Khi ở hai lỗ số 11 và 12 các hồng cầu chìm ở tâm đáy tạo thành chấm đỏ thì đọc kết quả của dãy phản ứng ở các lỗ còn lại. Hiệu giá ngưng kết hồng cầu (HA) của dịch virus gốc được xác định là độ pha loãng lớn nhất của dịch virus còn cho kết quả tương phản với lỗ 11 và 12. Đại lượng này là số đơn vị ngưng kết hồng cầu, hay số HAU, biểu hiện số lượng tối thiểu các thể tích 25 μ L có thể pha được từ dịch virus (vaccine) gốc đủ để làm lượng 0,25 mg tế bào hồng cầu trong 25 μ L huyền dịch (mỗi lỗ) kết nối với nhau thành mạng lưới (ngưng kết) chắc chắn.

2.3.2. Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) kiểm tra hiệu giá kháng thể huyết thanh

Phản ứng HI sử dụng kháng nguyên virus vaccine 4 HAU, huyền dịch hồng cầu 1% và dung dịch sinh lý NaCl để pha loãng mẫu huyết thanh cần kiểm như đã mô tả trước đây (Phạm Hồng Sơn và Nguyễn Thị Ngọc Hiền, 2017) với lượng đồng nhất 25 μ L dung dịch sinh lý, huyết thanh cần kiểm, dịch virus vaccine 4 HAU và dịch hồng cầu gà 1% từ phản ứng HA từ mục trên. Các lỗ số 11 và 12 được sử dụng để xác định thời điểm đọc phản ứng, lỗ thứ 10 không có huyết thanh để làm đối chứng 4 HA. Phản ứng HI dương tính có biểu hiện tương tự ở lỗ số 11 và 12.

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

Ngoài huyền dịch hồng cầu gà 1% và virus vaccine 4 HAU nêu trên, phản ứng SSDHI còn cần có thêm dịch huyết thanh có nồng độ 4 log₂ HI được điều chỉnh đến gần mức 16 đơn vị HI, hay 16 HIU, với khoảng xê lệch 10% (tức khoảng 16 - 17,6 HIU). Để có kháng huyết thanh này chúng tôi đã tiêm vaccine CPV (thành phần P của Biocan Puppy Inj., Bioveta - Greenvet) cho chó ba lần, hai lần tiêm đầu tiên cách nhau 04 tuần, lần cuối cách lần trước đó 7 ngày và lấy máu để thu huyết thanh vào ngày thứ 10 sau lần tiêm cuối cùng. Phản ứng SSDHI được thực hiện với dịch chiết từ phân chó trên khay vi chuẩn độ 96 lỗ được đặt dọc để có 12 dãy mỗi dãy 8 lỗ, trong đó 11 dãy được dùng cho phản ứng xét nghiệm mẫu cần kiểm và một dãy còn lại dành cho mẫu đối chứng âm tính. Dãy đối chứng âm tính có phản ứng HI được thực hiện lại với kháng huyết thanh chuẩn 4 log₂ HI. Các dãy kiểm khác với dãy chuẩn ở chỗ 25 µL dung dịch sinh lý ở lỗ thứ nhất được thay thế bằng 25 µL dịch phân chó trước khi cho 25 µL huyết thanh chuẩn 4 log₂ HI vào dãy lỗ này để tiếp tục các thao tác thực hiện lại HI.

2.4. Xử lý số liệu

Tỷ lệ chó nhiễm parvovirus và chó có kháng thể CPV được tính từ thương số của tổng các cá thể dương tính so với tổng số mẫu được xét nghiệm. Giá trị trung bình nhân hiệu giá kháng thể (GMT) được tính toán qua đại lượng trung bình cộng các giá trị logarit hóa của hiệu giá từng mẫu kiểm, tức $GMT = 2^{(\log_2 T_1 + \log_2 T_2 + \dots + \log_2 T_n)/n}$, trong đó T_1, T_2, \dots, T_n là hiệu giá các mẫu. Giá trị này được sử dụng như cường độ miễn dịch quần thể (miễn dịch đàn) của chó tại địa bàn nghiên cứu (Surin và cs., 1986). Sự khác biệt giữa các tỷ lệ được kiểm định

theo giá trị P từ chisq.test (Snedecor và Cochran, 1980). Chỉ số hiệu giá kháng thể bảo hộ miễn dịch được xác định bằng cách xác định biên độ của hiệu giá kháng thể trong huyết thanh của nhóm chó tiêu chảy mang virus. Giá trị hiệu giá kháng thể cao hơn biên độ đó được coi là mức hiệu giá kháng thể bảo hộ.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát thuộc tính ngưng kết của CPV với hồng cầu gà

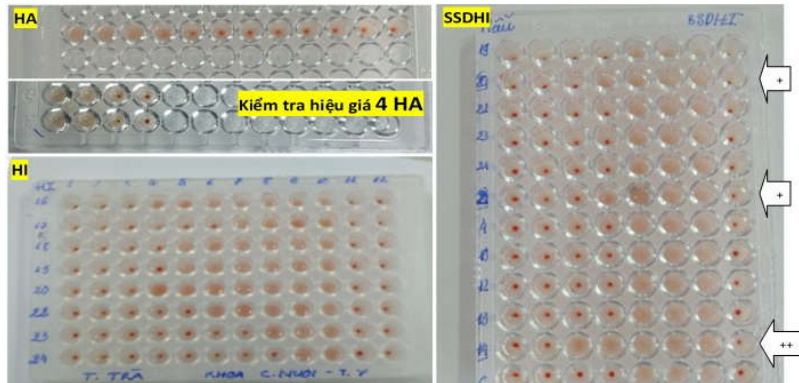
Qua nhiều lần lặp lại việc trộn dây pha loãng dịch virus vaccine với hồng cầu trên những dây lỗ khay vi chuẩn độ (Bảng 1 và ảnh trên bên trái ở Hình 1) chúng tôi khẳng định virus parvo chó (CPV) gây ngưng kết hồng cầu gà trông tưởng thành một cách chắc chắn, không bị ảnh hưởng bởi yếu tố cá thể gà.

Hình ảnh cho thấy với thể tích đồng đều 25 µL dịch hồng cầu gà 1% và virus vaccine CPV pha loãng dần, biểu hiện của phản ứng HA âm tính rõ ràng, kết quả dương tính tương phản. Phản ứng này thể hiện hiệu giá kháng nguyên virus vaccine CPV ở mức 4 log₂ HA (16 HAU). Phản ứng kiểm tra hiệu giá 2 log₂ HA thể hiện rõ ràng hai lỗ đầu có ngưng kết và hai lỗ sau không có ngưng kết. Trong ảnh dưới cùng bên trái, hiệu giá kháng thể HI trong huyết thanh chó có mức cao nhất là 8 log₂ HI (hay 256 HIU). Kết quả phản ứng SSDHI ở đây (ảnh bên phải) có 03 trong số 11 chó tiêu chảy xuất huyết có CPV trong phân, trong đó có 02 mẫu phân xê lệch sang trái 01 lỗ (1+) và 01 mẫu phân xê lệch sang trái 02 lỗ (2+) thể hiện có virus đặc hiệu.

Tất cả các lọ vaccine CPV đều ngưng kết với tất cả các mẫu hồng cầu gà trông được thử, với hiệu giá virus ở mức ổn định, các lọ có biểu hiện 4 log₂ HA hoặc 5 log₂ HA phụ thuộc vào lô huyền dịch hồng cầu của gà (có thể do hút hồng

cầu có lẫn hay không lẫn nhiều dung dịch sinh lý) mà không phụ thuộc vào loại vaccine làm kháng nguyên virus, trong khi các loại vaccine bệnh sởi chó không có thuộc tính này một cách ổn định. Hồng cầu gà trống tươi mới thu thập từ các điểm giết mổ gia cầm cũng không cần phải xử lý đặc

biệt, chỉ bảo đảm vô trùng khi lấy máu vào dung dịch chống đông máu, rửa với dung dịch sinh lý muối và pha đúng tỷ lệ 1% (theo thể tích) để có kết quả hiệu giá ổn định qua các lần xét nghiệm.



Hình 1. Kết quả các phản ứng HA (trên trái), HI (dưới trái) và SSDHI (phải)

Bảng 1. Kết quả biểu hiện hiệu giá virus trong một số lọ vaccine CPV và vaccine Carré theo phản ứng ngưng kết với huyền dịch 1% hồng cầu từ máu của một số gà trống

Vaccine	Hiệu giá (log ₂) ngưng kết hồng cầu (HA) với đương lượng huyền dịch hồng cầu 1%				
	Gà 1	Gà 2	Gà 3	Gà 4	Gà 5
P1	4	4	4	4	5
P2	4	4	4	4	5
P3	4	4	4	4	5
P4	4	4	4	4	5
D1	0	0	0	0	0
D2	0	0	0	0	0
D3	0	0	0	0	0
D4	0	0	0	0	0

Từ kết quả thử thách các mẫu hồng cầu với các mẫu virus vaccine chúng ta đã có thể khẳng định huyền dịch hồng cầu gà trống trong hỗn hợp dịch với virus CPV luôn bị kết nối với nhau tạo mạng lưới đa chiều và lơ lửng trong dịch sinh lý một cách ổn định. Hiện tượng ngưng kết hồng cầu (HA) của virus đã từng được sử dụng như một phương tiện phát hiện và định lượng virus trong dịch virus thuần khiết (lúa cây, vaccine) và xác định hàm lượng kháng thể đặc hiệu chống virus dưới dạng phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) đã từ lâu (Hirst, 1941; Clarke và Casals, 1958). Do phản ứng HA là thuộc tính tự nhiên của một số virus đối với hồng cầu một số động vật, còn liên kết kháng

nguyên-kháng thể trong phản ứng HI là đặc hiệu và biểu hiện rõ ràng nên phản ứng HI được coi là “tiêu chuẩn vàng” trong việc xác định tình trạng miễn dịch chống virus ở động vật. Với trường hợp parvovirus chó, đây không phải là lần đầu tiên áp dụng phản ứng HA và HI. Tuy nhiên, đối với hồng cầu gà dưới dạng huyền dịch 1% và lượng ổn định 25 µL phản ứng với parvovirus và huyết thanh chó sử dụng ở dạng nguyên sơ (không xử lý) thì đây là lần đầu. Ưu điểm của hồng cầu gà là loại hồng cầu có nhân này bền hơn hồng cầu lợn và việc thu hoạch hồng cầu từ máu gà giết mổ (ở gia đình, chợ và điểm giết mổ) cũng dễ dàng hơn rất nhiều. Kết quả như trình bày ở Bảng 1 và Hình 1

(ảnh trên cùng ở bên trái) cho thấy với nồng độ 1% và thể tích các thành phần đều 25 μL phản ứng HA thể hiện rõ ràng, dễ đọc kết quả. Với lượng 25 μL hồng cầu pha thêm vào dịch sinh lý ở lượng tương đương, huyền dịch hồng cầu trở thành 0,5% đã thể hiện ngưng kết đồng đều ở bốn lỗ đầu tiên. Ở lỗ thứ 05 (ảnh trên cùng bên trái ở Hình 1) biểu hiện sa lắng tự nhiên của hồng cầu không hoàn toàn như ở các lỗ đối chứng âm tính (số 11 và 12) chứng tỏ virus có nồng độ cao trên mức trung gian để có những tế bào hồng cầu kết nối với nhau qua một số lượng đủ lớn các hạt virus, nhưng sự kết nối này thưa và chỉ khi hồng cầu chìm xuống và tập trung lại sát nhau hơn ở gần tâm đáy lỗ khay mới có kết nối đủ dày để thể hiện sự khác biệt so với các lỗ đối chứng âm tính. Trong những trường hợp thể này, cần điều chỉnh giảm nồng độ virus trong huyền dịch tham gia phản ứng để không còn biểu hiện ngưng kết trung gian khi áp dụng cho phản ứng HI. Kết quả pha loãng virus với tỷ lệ 1/5 (01 phần virus gốc với 04 phần dung dịch sinh lý) thay cho tỷ lệ 1/4 (01 phần virus với 03 phần dung dịch sinh lý) để chuyển từ hiệu giá 4 \log_2 HA về hiệu giá 2 \log_2 HA đã cho kết quả phản ứng 2 \log_2 HA có sự khác biệt rõ ràng giữa ngưng kết và không ngưng kết (ảnh giữa bên trái ở Hình 1) đã chứng tỏ điều đó. Tuy vậy, cũng còn có một điểm cần lưu ý khác là huyền dịch hồng cầu gà 1% ở đây cho kết quả hiệu giá HA virus vaccine (16 HAU và 32 HAU) thấp hơn nhiều so với hiệu giá tối thiểu 1024 HAU (tức 10 \log_2 HA) do nhà sản xuất công bố. Điều này có thể do bề mặt tế bào hồng cầu gà có nhiều thụ thể hấp thụ virus parvo hơn so với bề mặt tế bào lợn. Bên cạnh đó, việc sử dụng huyền dịch hồng cầu có nồng độ thấp, thường 0,5%, đòi hỏi phải tăng thể tích các thành phần phản ứng đến 50 - 100 μL để có đủ lượng tế bào hồng cầu cần thiết cho việc quan sát sự sa lắng. Khi đó, do thể tích vaccine tăng tương đương trong khi diện tích bề mặt tổng số hồng cầu trong mỗi đơn vị thể tích huyền dịch giảm nên hấp

phụ ít hạt virus hơn. Điều đó dẫn đến làm tăng trị số biểu hiện hiệu giá virus. Từ thí nghiệm này và từ số liệu do hãng sản xuất công bố, có thể ước tính số lượng hạt virus hấp phụ bởi tế bào hồng cầu gà nhiều gấp khoảng 10 - 20 lần so với số lượng hạt virus mà hồng cầu lợn có thể hấp phụ.

Như vậy, hồng cầu gà là nguyên liệu phù hợp cho phản ứng ngưng kết hồng cầu để đánh giá hiệu giá kháng nguyên virus parvo chó. Tuy nhiên, các kết quả HA với huyền dịch hồng cầu gà không thể làm tham chiếu để so sánh với các kết quả HA với huyền dịch hồng cầu lợn. Hơn nữa, để có các số liệu hiệu giá HA có tính so sánh cần phải làm rõ nồng độ và thể tích của các thành phần tham gia phản ứng này.

3.2. Xác lập thông số hiệu giá kháng thể chỉ báo hộ miễn dịch

Hình 1 (ảnh dưới cùng bên trái) cho thấy phản ứng HI với lượng đồng đều 25 μL các thành phần trong hỗn hợp, tổng cộng 75 μL , với huyền dịch hồng cầu gà 1% pha loãng với huyết thanh và dịch virus 4 HAU thành tỷ lệ cuối cùng là 0,33% cũng thể hiện rõ ràng sự ngưng kết. Điều này chứng tỏ các tế bào hồng cầu trong 0,25 mg phân tán trong 75 μL chất dịch vẫn có khoảng cách đủ gần để có thể tạo mạng lưới chắc chắn qua kết nối bởi các hạt virus. Khi trong huyết thanh có các kháng thể đặc hiệu, chúng phong bế các hạt virus trong hỗn hợp. Khi đó các tế bào hồng cầu không còn bị virus kết nối nữa nên chìm xuống đáy lỗ như ở các lỗ đối chứng HA âm tính (lỗ 11 và 12 ở ảnh dưới bên trái Hình 1). Số lượng hạt virus có ở trong đó là chưa biết, mặc dù có tài liệu (Carter và cs., 1995) cho biết có khoảng 10^4 virion virus cúm trong mỗi đơn vị ngưng kết hồng cầu (HA unit) mà không cho biết thể tích mỗi đơn vị phản ứng nên không thể tham chiếu. Khi có phản ứng HI xảy ra thì một lượng ổn định kháng thể trong huyết thanh đã phong bế hết số các hạt virus trong dịch virus 4 HAU và đưa hoạt tính HA của chúng về mức gần không (zero) để hồng cầu trở nên tự do và chìm

xuống vào tâm lỗ khay. Nếu sử dụng nồng độ virus 8 HAU (gấp đôi) cho phản ứng HI cũng với huyền dịch hồng cầu 1% thì số lượng các phân tử kháng thể đặc hiệu phải cao gấp đôi so với ở trường hợp dịch virus 4 HAU. Như vậy, hiệu giá HI 1:80 được xác định với dịch virus 8 HAU bởi các nhóm tác giả trước đây (Carmichael và cs., 1980; Pollack và Carmichael, 1982; Oh và cs., 2006) tương đương với hiệu giá HI 1:160 theo cách thực hiện HI của chúng tôi. Mức hiệu giá 160 HIU đó là rất cao so với những kết quả chúng tôi thu được (cao nhất chỉ 8 log₂, tức 256 HIU). Nếu so với việc vận dụng mức hiệu giá HI quy đổi 1:160 làm chỉ báo bảo hộ miễn dịch thì việc tiêm vaccine CPV phòng bệnh cho chó trong nghiên cứu này của chúng tôi đã thất bại vì quá ít chó (03 trong số 38 con) thu được bảo hộ miễn dịch. Nếu lấy từ mức thấp hơn, từ 7 log₂ HI (128 HIU), thì cũng chỉ có 13 con trong số 38 chó đã được tiêm vaccine CPV (34,2%) đạt mức bảo hộ miễn dịch. Trong khi đó, muốn ngăn chặn dịch lây lan cần từ 70% trở lên cá thể có miễn dịch hữu hiệu (Shimizu và cs., 1999). Ngược lại, Carmichael và cộng sự (1980) còn coi huyết thanh có hiệu giá kháng thể HI dưới mức 1:40 (tức 40 HIU) là âm tính kháng thể miễn dịch (immunonegative). Nếu áp dụng mức đó vào nghiên cứu này thì có đến 24 con trong số 38 con (63,16%) đã được tiêm vaccine CPV không có miễn dịch. Bất cập này cũng đã đề cập bởi nhóm nghiên của Mahon và cs. (2017). Vì vậy, nếu không liên hệ với tình trạng mắc bệnh CPV (có virus trong phân) và không mắc bệnh CPV (không có virus trong phân) từ các xét

nghiệm phát hiện virus thì kết quả tiêm vaccine CPV trong nghiên cứu này là không giải thích được. Kết quả xét nghiệm bằng kỹ thuật SSDHI ở Hình 1 (ảnh bên phải) đã giúp chúng tôi xác định kết quả chẩn đoán lâm sàng các trường hợp mắc bệnh do Parvovirus chó.

Đồng thời, từ phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu với các mẫu huyết thanh thu được cũng từ những con chó tiêu chảy xuất huyết đó chúng tôi đã thiết lập được bảng tương liên kết quả theo từng mức hiệu giá kháng thể HI (Bảng 2).

Từ kết quả ở Bảng 2 ta thấy tất cả những cá thể có hiệu giá kháng thể chống CPV từ mức 4 log₂ HI (16 HIU) trở lên đều không có virus đó trong phân tiêu chảy, tức không phải tiêu chảy do CPV. Như vậy, mức kháng thể 4 log₂ HI xứng đáng được coi là chỉ báo mức bảo hộ miễn dịch ở chó theo quy trình xét nghiệm này của chúng tôi (với hồng cầu gà 1%, virus CPV ở nồng độ 4 HAU và huyết thanh chó không qua xử lý).

Quy trình kỹ thuật của các nhóm trước đây liên quan nghiên cứu và áp dụng tổ hợp phản ứng HA-HI trong chẩn đoán bệnh CPV ở chó còn có thêm một số khác biệt, ngoài sử dụng hiệu giá virus 8 HAU thay cho 4 HAU, so với quy trình kỹ thuật của chúng tôi. Huyết thanh cần kiểm tra trước khi áp dụng cho HI đã được trộn với kaolin và hồng cầu lợn, cho nên không tránh khỏi việc pha loãng (nồng độ kháng thể sau xử lý giảm 10 lần). Việc xử lý này có thể đã làm biểu hiện của hiệu giá kháng thể HI tăng lên do loại bỏ được các yếu tố ức chế không đặc hiệu trong huyết thanh.

Bảng 2. Bảng tương liên tần suất xuất hiện cá thể chó mang kháng nguyên CPV trong phân tiêu chảy ứng với các mức hiệu giá kháng thể HI trong huyết thanh

Hiệu giá kháng thể HI (log ₂)	Nhóm chó chưa được tiêm vaccine phòng bệnh CPV			Nhóm chó đã được tiêm vaccine phòng bệnh CPV		
	Kết quả HI theo từng mức hiệu giá (con)	Số chó có parvovirus trong phân (SSDHI+)	Tỷ lệ chó mang virus (%)	Kết quả HI theo từng mức hiệu giá (con)	Số chó có parvovirus trong phân (SSDHI+)	Tỷ lệ chó mang virus (%)
0	0			0		
1	0			0		
2	13	13	100	0		
3	14	6	42,86	1	1	100
4	5	0	0	4	0	0
5	0			8	0	0
6	0			12	0	0
7	0			10	0	0
8	0			3	0	0
9	0			0		
10	0			0		
Tổng cộng	32	19	59,38	38	1	2,63

Tuy nhiên, yếu tố này được biết là không toàn năng với mọi loài. Chẳng hạn, đối với hồng cầu gà thì huyết thanh vịt được xác định là có ức chế không đặc hiệu trong khi huyết thanh gà không có tác động này (Surin và cs., 1986). Đối với chúng tôi thì việc xử lý huyết thanh là thao tác cần tránh vì tốn thêm công sức và bỏ mất nguồn tài nguyên hữu ích cho phản ứng SSDHI phát hiện kháng nguyên đặc hiệu virus. Do đó, việc thay thế hồng cầu lợn bằng hồng cầu gà để xét nghiệm huyết thanh chó là một lợi điểm lớn vì đã giúp

tránh được tác động bất lợi của yếu tố ức chế không đặc hiệu đến mức không cần đến xử lý huyết thanh, tránh được hao hụt kháng huyết thanh.

3.3. Đánh giá chất lượng tiêm vaccine CPV phòng bệnh ở chó

Kết quả các phản ứng HI tất cả các mẫu huyết thanh chó tiêu chảy xuất huyết đã xét nghiệm được trình bày ở Bảng 3, trong đó chúng tôi sử dụng mức hiệu giá 4 log₂ HI làm thông số chỉ báo bảo hộ miễn dịch chống CPV.

Bảng 3. Tình hình đáp ứng miễn dịch chống CPV ở chó tiêu chảy xuất huyết được đưa đến chẩn trị tại Trung tâm chẩn đoán và điều trị động vật thuộc Chi cục thú y tỉnh Thừa Thiên Huế trong thời gian khảo sát

Nhóm chó	Số chó được xét nghiệm huyết thanh	Số chó có kháng thể trong huyết thanh	Số chó có hiệu giá kháng thể 4 log ₂ HI trở lên	Tỷ lệ chó có mức kháng thể từ 4 log ₂ HI trở lên (%)	Giá trị P (χ^2 -test) so sánh giữa các nhóm	Cường độ (GMT) miễn dịch (HIU)
Đã tiêm vaccine phòng bệnh CPV	38	38	37	97,4	0,000 (48,36)	60,59
Chưa từng được tiêm vaccine CPV	32	32	5	15,6		6,73
Tổng	70	70	42	60		22,18

Bảng 3 cho thấy tất cả các chó được xét nghiệm HI đều có kháng thể trong huyết thanh. Đối với nhóm được tiêm phòng tỷ lệ chó có hiệu giá kháng thể từ 4 log₂ HI trở lên (tức đạt mức bảo hộ miễn dịch) khá cao, 37 chó trong số 38 con được

xét nghiệm, đạt 97,3%, cao hơn nhiều ($P < 0,01$) so với nhóm không được tiêm phòng chỉ đạt 15,6%. Kết quả xét nghiệm ở Bảng 3 (ở mục trên) cũng cho thấy chỉ một con trong số 38 con chó đã được tiêm phòng mang virus mầm bệnh CPV được phát

hiện, chiếm tỉ lệ 2,6%, thấp hơn nhiều ($P < 0,001$) so với số chó mang mầm bệnh trong phân ở nhóm không được tiêm phòng (19 con trong số 32 con được xét nghiệm có kháng nguyên, hay 59,38%). Điều đó chứng tỏ tiêm vaccine phòng bệnh parvovirus liên quan chặt chẽ với tình trạng sạch mầm bệnh này ở chó. Như vậy, việc tiêm vaccine phòng bệnh CPV cho chó tại địa bàn nghiên cứu đã có tác dụng làm giảm nguy cơ nhiễm bệnh.

4. KẾT LUẬN

Hồng cầu gà là nguyên liệu thích hợp cho phản ứng HA bởi virus parvo chó (CPV) cũng như trong phản ứng phôi sinh HI (xác định hiệu giá kháng thể đặc hiệu CPV) và SSDHI (xác định sự hiện diện của kháng nguyên CPV trong bệnh phẩm) dù có sự khác biệt không nhỏ trong biểu hiện giá trị HA và HI so với hồng cầu lợn được sử dụng trong các nghiên cứu của các tác giả trước. Các yếu tố liên quan đến các phản ứng xét nghiệm này vì vậy cần được chuẩn hóa để có thể tham chiếu.

Việc phát hiện parvovirus chó có thuộc tính gây ngưng kết hồng cầu gà ổn định và không bị tác động xấu của các yếu tố ức chế không đặc hiệu trong huyết thanh chó là quan trọng giúp phát triển một hệ thống xét nghiệm mới khảo sát miễn dịch và mang trùng, hệ thống HA-HI-SSDHI, đối với parvovirus chó (CPV), cho kết quả nhanh và chủ động về nguồn vật liệu nên có giá thành thấp.

Mức hiệu giá kháng thể $4 \log_2$ HI theo quy trình mô tả ở nghiên cứu này (với huyền dịch hồng cầu gà 1%, virus vaccine CPV 4 HAU, đều với lượng 25 μ L) được xác định là thông số chỉ báo bảo hộ miễn dịch ở chó chống bệnh CPV.

Vaccine CPV sử dụng ở khu vực nghiên cứu có hiệu quả tốt.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả cảm ơn cán bộ viên chức và lao động Trung tâm chẩn đoán và điều trị động vật thuộc Chi cục Thú y tỉnh Thừa Thiên Huế đã giúp đỡ lấy mẫu thực hiện đề

tài. Công trình với kinh phí cá nhân này là sản phẩm kế tục hệ quả của các đề tài KH-CN trước đây: B2004-08-07-TĐ và DHH2013-02-32.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

- Lê Duy Báu, Phạm Thị Yến Hoa, Lê Thị Ngọc Khánh và Phạm Hồng Sơn. (2019). Đánh giá miễn dịch và cảm nhiễm virus dại trên chó nuôi tại huyện Tuyên Hóa tỉnh Quảng Bình bằng kỹ thuật HI và SSDHI, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*, 3(1), 1003 - 1012.
- Nguyễn Văn Dũng, Phạm Xuân Thảo, Vũ Kim Chiến và Ken Maeda. (2018). Dịch tễ học phân tử Parvovirus trên chó nuôi tại thành phố Hồ Chí Minh, *Khoa học Kỹ thuật Thú y*, 25(4), 12 - 16.
- Phạm Sỹ Lăng, Trần Minh Châu, Hồ Đình Chúc, Lê Thanh Hải, Đào Hữu Thanh và Dương Công Thiện. (1998). *Bệnh thường thấy ở chó và cách phòng trị*. Hà Nội: Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Nguyễn Thị Hoàng Oanh, Phạm Thị Hồng Lam, Đỗ Thị Lợi và 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*, 19(1), 48 - 56.
- Lê Đình Quang, Hồ Thị Ngọc Ánh, Hồ Thị Lê, Bùi Thị Lan, Nguyễn Hữu Lợi và Phạm Hồng Sơn. (2018). Đáp ứng miễn dịch của gà con đối với vaccine La Sota phòng bệnh Newcastle thay đổi theo điều kiện sinh thái chăn nuôi. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*, 3(1), 1117 - 1128.
- Phạm Hồng Sơn và Nguyễn Thị Ngọc Hiền. (2017). Xác định tình hình đáp ứng miễn dịch thể và cảm nhiễm virus dại ở chó nuôi trên địa bàn thành phố Huế bằng phương pháp HI và SSDHI, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*, 1(1), 119 - 129.
- Phan Ngọc Tuyết, Nguyễn Thị Mỹ Trinh, Phạm Thị Thanh Thúy và Phạm Hồng Sơn. (2018). Đánh giá hiệu lực vaccine phòng dại trên chó nuôi tại huyện Minh Hóa tỉnh

Quảng Bình, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*, 2(2), 767 - 780.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Carmichael, L. E., Joubert, J. C., & Pollock, R. V. H. (1980). Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *American Journal of Veterinary Research*, (41), 784 - 791.
- Carter, G. R., Roberts, A. W., & Chengappa, M. M. (1995). *Essentials of Veterinary Microbiology, 5th revised edition*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Mahon, J. L., Rozanski, E. A., & Paul, A. L. (2017). Prevalence of serum antibody titers against canine distemper virus and canine parvovirus in dogs hospitalized in an intensive care unit. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 250(12), 1413 - 418. doi: 10.2460/javma.250.12.1413.
- Oh, J.-S., Ha, G.-W., Cho, Y.-S., Kim, M.-J., An, D.-J., Hwang, K.-K., Lim, Y.-K., Park, B.-K., Kang, B.-K., & Song, D.-S. (2006). One-Step Immunochromatography Assay Kit for Detecting Antibodies to Canine Parvovirus. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(4), 520 - 524. doi: 10.1128/CVI.13.4.520-524.2006.
- Parrish, C. R. (1990). Emergence, natural history, and variation of canine, mink, and feline parvoviruses. *Advances in Virus Research*, (38), 403 - 450.
- Pollack, R. V., & Carmichael, L. E. (1982). Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline and interference with vaccination. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, (180), 37 - 42.
- Prittie, J. (2004). Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management and prevention. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, (14), 167-176. doi.org/10.1111/j.1534-6935.2004.04020.x.
- Shimizu, Y., Kanoe, M., Tabuchi, K., Hiramune, T., & Mikami, T. (ed.). (1999). *Juui densenbyou gaku daigoban*. Kindai shuppan, Tokyo, 22.
- Siegl, G., Bates, R. C., Berns, K. I., Carter, B. J., Kelly, D. C., Kurstak, E., & Tattersall, P. (1985). Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology*, (23), 61 - 73.
- Snedecor, G. W., & Cochran, W. G. (1980). *Statistical methods, 7th edition*. The United States of America: Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Surin, V. N., Belousova, P. B., Solovjev, K. V., & Fomina, N. V. (1986). *Spravotchnik metody laboratornoi diagnostiki virusnykh boleznei zhyvotnykh*. Agropromizdat, Moskva.
- Waner, T., Naveh, A., Wudovsky, I., & Carmichael, L. E. (1996). Assessment of maternal antibody decay and response to canine parvovirus vaccination using a clinic-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, (8), 427 - 432.