View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Hue University Journal of Science (HU JOS)

Tạp chí Khoa học – Đại học Huế
ISSN 1859-1388
Tập 126, Số 3A, 2017, Tr. 79-90

SỬ DỤNG KỸ THUẬT ELISA PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ CHỐNG PROTEIN PHI CẤU TRÚC 3ABC VÀ KỸ THUẬT RT-PCR PHÁT HIỆN GENE ĐẶC HIỆU VIRUS TRONG CHẨN ĐOÁN BỆNH LỞ MỒM LONG MÓNG TẠI QUẢNG NGÃI ĐẦU NĂM 2015

Phạm Hồng Sơn[1]*, Lê Thị Thanh[2], Ngô Hữu Lai[3], Phan Hữu Đức[3]
[1] Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế
[2] Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Quảng Ngãi
[3] Cơ quan Thú vùng 3, TP. Đà Nẵng

Tóm tắt: Sử dụng phương pháp ELISA 3ABC phát hiện kháng thể chống protein phi cấu trúc và RT-PCR phát hiện gene virus lở mồm long móng (LMLM) từ những cặp mẫu bệnh phẩm cho thấy hai phương pháp trên có kết quả khác nhau. Từ 144 mẫu huyết thanh trâu bò thu thập đầu năm 2015 ở địa bàn đã từng xảy ra dịch bệnh LMLM tại Quảng Ngãi phát hiện có 27 con (18,75 %) mang kháng thể 3ABC. Theo địa bàn, Sơn Tịnh có tỷ lệ nhiễm cao (25 %) sai khác so với Đức Phổ là huyện bị nhiễm thấp nhất (12,5 %). Bò có tỷ lệ nhiễm cao hơn trâu, trong đó trâu bò chưa tiêm vaccine có tỷ lệ dương tính 3ABC cao hơn rõ rệt (32,81 % so với 7,5 %, $p < 0,05$) cho thấy tiêm vaccine LMLM trước đó đã không làm tăng tỷ lệ mang kháng thể 3ABC ở trâu bò. Sự phát hiện gene virus LMLM trong 27 mẫu từ trâu bò có và 20 mẫu từ trâu bò không có kháng thể 3ABC nêu trên đã cho thấy kết quả của ELISA 3ABC và RT-PCR không có sự trùng hợp. Trong số 27 con mang kháng thể 3ABC chỉ 1 con bò có gene LMLM, nhưng trong số 20 con không mang kháng thể 3ABC lại có 2 con mang gene virus LMLM trong dịch họng. Như vậy, có những con trâu bò mới nhiễm chưa hình thành kháng thể và cũng có những con đã khỏi bị nhiễm.

Từ khóa: bệnh lở mồm long móng, virus, kháng thể, protein phi cấu trúc

1 Đặt vấn đề

Bệnh lở mồm long móng (LMLM) là một loại bệnh truyền nhiễm cấp tính do virus LMLM gây ra biến đổi bệnh lý chủ yếu trên biểu mô ở động vật móng guốc chẵn như lợn, bò, trâu, hươu, dê... lây lan rất nhanh qua nhiều con đường khác nhau như tiếp xúc trực tiếp giữa động vật với nhau, qua con đường hô hấp, tiêu hóa, sinh dục... Tổ chức Thú y thế giới xếp bệnh LMLM là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm hàng đầu ở động vật do bệnh thường phát tán và lây lan trên diện rộng, gây nên những đợt dịch bệnh trầm trọng. Bệnh xảy ra ở nhiều nước trên thế giới; một số nước đã thanh toán được bệnh, nhưng ở nhiều nước bệnh vẫn tồn tại, gây thiệt hại rất lớn cho phát triển chăn nuôi, xuất khẩu động vật và sản phẩm động vật. Do virus LMLM đa dạng về chủng loại huyết thanh học, gồm các type A, O, C, Asia1, SAT1, SAT2 và SAT3, đều gồm một số subtype khác nhau, động vật miễn dịch với type này không thể được bảo hộ chống lại type khác, nên việc phòng bệnh đặc hiệu bằng vaccine gặp nhiều khó khăn. Vì vậy, chủ động điều tra phát hiện mầm bệnh trên địa bàn là cần thiết trong việc kiểm soát tình hình dịch bệnh. Trong bối cảnh chung, tỉnh Quảng Ngãi đã đầu tư thích đáng vào việc phát hiện bệnh tiềm ẩn

** Liên hệ: sonphdhnl@huaf.edu.vn*

Nhận bài: 20-10-2016; Hoàn thành phản biện: 6-12-2016; Ngày nhận đăng: 01-02-2017

trong đàn gia súc, trong đó có việc sử dụng các kỹ thuật mới như ELISA 3ABC phát hiện kháng thể chống kháng nguyên protein phi cấu trúc (non-structure protein) của virus LMLM [9], [10] và phản ứng RT-PCR [15] phát hiện gene đặc hiệu (RNA) virus LMLM. Tuy nhiên, trong thực tế một số quy trình phối hợp hai phương pháp trên theo cách dùng ELISA để sàng lọc giảm bớt số mẫu phải áp dụng kỹ thuật RT-PCR tạo nên sự nghi vấn cần làm sáng tỏ để sử dụng các phương pháp này thích hợp trong chẩn đoán. Nghiên cứu này của chúng tôi, bên cạnh việc xác định tình trạng cảm nhiễm virus LMLM ở vùng đã xảy ra dịch bệnh tại tỉnh Quảng Ngãi, còn nhằm để trả lời cho những nghi vấn đó.

2 Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nội dung nghiên cứu

Xác định kháng thể kháng protein phi cấu trúc 3ABC của virus LMLM trong huyết thanh của trâu bò lấy ngẫu nhiên từ địa bàn nghiên cứu (3 huyện Sơn Tịnh, Bình Sơn và Đức Phổ của tỉnh Quảng Ngãi) bằng phương pháp ELISA, từ đó chọn riêng các cá thể trâu bò có kháng thể 3ABC.

Xét nghiệm bằng phương pháp RT-PCR các mẫu probang (dịch hầu họng) lấy từ trâu bò có và không có kháng thể 3ABC trong huyết thanh, xác định các cá thể trâu bò mang gene virus LMLM trong số trâu bò có và không có kháng thể 3ABC; so sánh kết quả xét nghiệm bằng hai phương pháp trên các nhóm gia súc.

2.2 Đối tượng, địa bàn và quy tắc chọn mẫu

Đối tượng lấy mẫu là trâu bò từ 6 tháng tuổi trở lên, được nuôi tại các hộ chăn nuôi ở các huyện Sơn Tịnh, Bình Sơn và Đức Phổ của tỉnh Quảng Ngãi. Chủng loại mẫu xét nghiệm mẫu huyết thanh và mẫu dịch họng (probang): từng cặp mẫu, một mẫu huyết thanh cho phản ứng ELISA và một probang cho phản ứng RT-PCR đều được lấy từ mỗi cá thể trâu hoặc bò.

Địa bàn lấy mẫu huyết thanh để xét nghiệm ELISA 3ABC là ba huyện thuộc tỉnh Quảng Ngãi đã từng xảy ra dịch LMLM trong những năm trước năm nghiên cứu (năm 2012, 2013 và 2014). Mẫu được lấy ngẫu nhiên theo đơn vị huyện với số lượng gia súc cần lấy được xác định theo công thức

$$n = [1-(1-CI)^{\frac{1}{d}}][N-\frac{(d-1)}{2}],$$

trong đó n là dung lượng mẫu cần lấy, N là dung lượng quần thể gia súc trong vùng khảo sát, CI là khoảng tin cậy mong muốn và được chọn là CI = 0,95 (CI95 %) và d là tỷ lệ lưu hành ước đoán được xác định trước là 10 %.

Các hộ gia đình trong thôn có nuôi trâu bò trên 6 tháng tuổi được lập danh sách và từ đó, chọn ra những hộ gia đình chỉ nuôi trâu hoặc chỉ nuôi bò rồi chọn hộ một cách ngẫu nhiên trên danh sách đã lập cho đến đủ số lượng yêu cầu. Với địa bàn không đủ số lượng gia đình theo tiêu chí trên thì chọn ngẫu nhiên thêm các hộ gia đình có nuôi cả trâu lẫn bò. Số lượng mẫu đã

lấy cho xét nghiệm là 288 mẫu (144 cặp mẫu), gồm 144 mẫu huyết thanh và 144 mẫu dịch họng (probang), trong đó 46 cá thể bò và 18 cá thể trâu chưa được tiêm trong khi 52 cá thể bò và 28 cá thể trâu đã được tiêm vaccine LMLM trước đó ít nhất 3 tháng, không có mẫu từ trâu bò tiêm vaccine muộn hơn 3 tháng. Các mẫu huyết thanh và dịch họng từ một cá thể được đánh số tương ứng. Tất cả các mẫu huyết thanh được xét nghiệm bằng phương pháp ELISA 3ABC, còn các mẫu dịch họng được lưu trữ đông lạnh sâu (-70 ^{o}C đến -80 ^{o}C). Sau khi đã có kết quả xét nghiệm ELISA 3ABC, tất cả các mẫu dịch họng của tất cả trâu và bò có kết quả ELISA dương tính và 20 mẫu dịch họng khác từ số trâu và bò cho kết quả ELISA âm tính được lấy ra ngẫu nhiên để xét nghiệm bằng RT-PCR phát hiện gene đặc hiệu chung của các type virus LMLM.

2.3 Phương pháp lấy mẫu và xét nghiệm

Phương pháp lấy mẫu huyết thanh: Cố định gia súc trong gióng giá, sát trùng tĩnh mạch cổ (cắt lông nếu lông rậm) hoặc tĩnh mạch đuôi (tại vị trí lấy máu), sát trùng bằng bông cồn 70 %. Sau khi cồn khô, đưa mũi kim vào tĩnh mạch hút lấy 3 ml đến 5 ml máu cho vào ống nghiệm 10 ml vô trùng đã chuẩn bị sẵn. Đặt ống máu nghiêng ở nhiệt độ phòng khoảng 2 giờ cho máu đông và chuyển đến phòng xét nghiệm. Chiết huyết thanh bằng cách quay ly tâm ở tốc độ 1500 vòng/phút trong 10 phút, rót huyết thanh cho vào ống Eppendorf loại 2 ml, đậy nắp và thực hiện phản ứng ngay hoặc bảo quản ở nhiệt độ -20 ^{o}C đến khi thực hiện xét nghiệm ELISA.

Phương pháp lấy mẫu dịch họng: Một cốc probang (probang cup) sạch và một ống vô trùng được dùng để lấy và đựng một mẫu dịch họng [13]. Cố định gia súc trong gióng giá, đứng bên phải đầu của con vật, một tay cầm dây mũi xách lên, tay kia cầm dụng cụ lấy mẫu probang đưa vào miệng con vật (chèn ngón tay vào mép miệng để giữ an toàn cho miệng hở ra), đưa probang đến mức thích hợp (độ 2/3 chiều dài probang). Đẩy probang xuống rồi kéo lên từ từ bốn lần theo nhịp thở để dịch nhầy họng chảy vào cốc rồi lấy ra từ từ theo nhịp thở. Mẫu phù hợp phải chứa dịch nhầy và không chứa máu hoặc nhiều mẫu thức ăn từ dạ cỏ. Rót dịch thu được vào ống chứa mẫu (nếu mẫu không phù hợp, thực hiện lại việc lấy mẫu). Cho dung dịch vận chuyển mẫu vào ống chứa mẫu, đặt lọ chứa mẫu trong thùng giữ lạnh và chuyển đến phòng xét nghiệm. Sát trùng dụng cụ lấy mẫu probang bằng cách ngâm vào dung dịch khử trùng.

Phản ứng ELISA 3ABC: Phản ứng ELISA 3ABC [12] được thực hiện theo hướng dẫn của nhà cung cấp (kit ELISA CHEKIT-FMD-3ABC) và được một số nhóm áp dụng nghiên cứu gần đây [1] với các mẫu huyết thanh đối chứng âm, đối chứng dương và các mẫu huyết thanh kiểm theo từng cặp để tính giá trị trung bình cộng. Huyết thanh được pha loãng ở tỷ lệ 1:100, còn chuẩn đối chứng huyết thanh dương mạnh và đối chứng dương yếu được cung cấp sẵn trong bộ kit. Các mẫu huyết thanh đã pha loãng, đối chứng huyết thanh dương và đối chứng huyết thanh âm được chuyển vào các giếng của đĩa ELISA với lượng đều 100 µl theo sơ đồ định trước. Đĩa được dán kín bằng miếng dán có sẵn trong bộ kit và ủ ở 37 ^{o}C trong 60 phút trong hộp giữ ẩm. Đĩa được rửa 3 lần bằng dung dịch rửa (300 µl/giếng) để loại bỏ huyết thanh không gắn kết. Cho 100 µl conjugate vào mỗi lỗ giếng của đĩa, dán kín bằng miếng dán có sẵn trong bộ kit và ủ ở 37 ^{o}C trong 60 phút cũng trong hộp giữ ẩm. Sau khi rửa 3 lần bằng dung dịch rửa (300 µl/giếng), cho vào mỗi giếng 100 µl TMB (chất phát màu) và ủ ở 18 ^{o}C đến 26 ^{o}C trong 15 phút, dừng phản ứng ở tất cả các giếng đều bằng 100 µl dung dịch kèm theo và đưa vào máy đọc

ELISA, khi màu phát triển đã dừng lại. Giá trị mật độ quang (OD) của mỗi giếng được đọc ở bước sóng 450 nm. Giá trị tỷ suất mật độ quang (% OD) của từng mẫu (so với đối chứng dương) được tính theo công thức:

$$OD\ \% = 100 \times (OD_{spl} - OD_{neg})/(OD_{pos} - OD_{neg}),$$

trong đó OD_{spl} là giá trị mật độ quang của mẫu xét nghiệm, OD_{pos} là giá trị mật độ quang của đối chứng dương, OD_{neg} là giá trị mật độ quang của đối chứng âm. Diễn giải kết quả theo nhà sản xuất: Nếu OD % ≥ 30 % kết quả được coi là dương tính, nếu OD % < 20 % kết quả được coi là âm tính, nếu 20 % ≤ OD % < 30 % kết quả được coi là nghi ngờ.

Phương pháp RT-PCR thời gian thực: Kỹ thuật RT-PCR thời gian thực (hay PCR thực thời – Real time Reverse Transcription PCR, hay rRT-PCR) được sử dụng để nhân gene đặc hiệu virus trong bệnh phẩm là mẫu RNA được tinh chế từ trâu bò qua hai bước tổng hợp DNA từ khuôn RNA virus (cặp mồi Callahan) và tổng hợp các đoạn DNA kèm phát tín hiệu huỳnh quang (cặp mồi SA-IR) đã được mô tả trước đây [7]. Từ dịch họng (probang), RNA tổng số được chiết bằng cách xử lý InviMAG Virus RNA Kit sử dụng máy Thermo Scientific KingFisher 96 (chiết xuất 96 mẫu, theo hướng dẫn của nhà sản xuất), với các dung dịch đệm dung giải chứa protease K, các hạt từ tính có tác dụng va đập làm các tế bào trong dung dịch tan vỡ và giải phóng acid nucleic và cuối cùng là được chiết xuất nhờ dung xuất qua cột ly tâm.

Dùng pipet hút 5 µl mỗi mẫu RNA đã chiết tách tinh chế nêu trên cho vào đĩa PCR 96 giếng đã chứa sẵn 20 µl dung dịch Master Mix mỗi giếng đã được chuẩn bị gồm dung dịch đệm, Taq Mix, mồi xuôi FMDV-Callahan 3DF, mồi ngược FMDV-Callahan 3DR, đoạn dò FMDV-Callahan 3DP, mồi xuôi FMDV-SA-IR-219-246F, mồi ngược FMDV-SA-IR-315-293R, đoạn dò FMDV-SAmulti2-P-IR-292-269R và nước cất vô trùng không có RNase và DNase. Dùng giấy dán đĩa chuyên dụng dán kín bề mặt đĩa, sau đó quay ly tâm lạnh ở 2000 vòng/1 phút trong 10 giây để kéo toàn bộ dung dịch phản ứng xuống đáy giếng của đĩa. Đặt đĩa vào máy Realtime PCR theo sơ đồ bố trí thí nghiệm. Nhập dữ liệu mẫu vào biên bản máy vi tính phù hợp với sơ đồ bố trí mẫu trên máy luân nhiệt để kết quả tín hiệu ghi nhận được phản ánh đúng phản ứng của từng mẫu tương ứng. Chương trình luân nhiệt chuẩn bị sẵn trên phiếu quản lý xét nghiệm PCR, được cài đặt như sau. Sau một chu kỳ 15 phút ở 50 ^oC và một chu kỳ 2 phút ở 95 ^oC, mẫu được chạy luân nhiệt 40 chu kỳ liên tiếp gồm 20 giây ở 94 ^oC (biến tính) và 60 giây ở 60 ^oC (phản ứng kéo dài DNA và ghi nhận tín hiệu). Đọc kết quả bắt đầu từ kiểm tra các mẫu đối chứng dương và đối chứng âm. Phản ứng có giá trị khi mẫu đối chứng dương biểu hiện rõ dương tính, mẫu đối chứng âm biểu hiện rõ âm tính. Từ kết quả mẫu đối chứng dương và đối chứng âm, điều chỉnh đường chuẩn nền (base line) theo 5 % tín hiệu huỳnh quang máy hiển thị và đọc các kết quả xét nghiệm các mẫu dựa theo đường chuẩn nền này. Mẫu được đọc là dương tính khi có giá trị số chu kỳ ngưỡng ít hơn 35 (tức biểu đồ tín hiệu huỳnh quang vượt đường chuẩn nền trước 35 chu kỳ PCR, hay Ct < 35). Mẫu được đọc là âm tính khi không thấy có giá trị Ct sau 40 chu kỳ phản ứng (Ct vô cực), còn mẫu có giá trị 35 ≤ Ct ≤ 40 được coi là nghi ngờ.

Xử lý số liệu: Kết quả nghiên cứu được xử lý thống kê sinh học biểu diễn dưới dạng tỷ lệ phần trăm (số dương tính so với tổng số dương tính và âm tính cùng thuộc tính) và các cặp tỷ số

được xử lý so sánh qua chỉ số giới hạn χ2 (chi bình phương) và tỷ số nguy cơ (risk ratio) RR [16].

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Áp dụng phản ứng 3ABC ELISA đánh giá sự lưu hành virus lở mồm long móng ở các huyện khảo sát

Tình trạng cảm nhiễm xác định bởi kháng thể kháng protein phi cấu trúc virus LMLM ở trâu bò theo địa bàn: Thực hiện phương pháp 3ABC ELISA nhằm phát hiện trâu bò tại ba huyện đã có dịch trước đây là Sơn Tịnh, Bình Sơn và Đức Phổ mang kháng thể chống protein phi cấu trúc 3ABC, tức trâu bò đã từng cảm nhiễm virus LMLM, chúng tôi thu được kết quả như trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phát hiện kháng thể kháng protein phi cấu trúc của virus LMLM bằng phương pháp ELISA 3ABC trong huyết thanh trâu bò thu thập tại ba huyện khảo sát

Tên huyện	Tổng số mẫu kiểm tra	Số mẫu âm tính	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%) lưu hành
Sơn Tịnh	48	36	12	25
Bình Sơn	48	39	9	18,75
Đức Phổ	48	42	6	12,5
Tổng số	**144**	**117**	**27**	**18,75**

Bảng trên cho thấy trong tổng số 144 trâu bò được lấy mẫu huyết thanh một cách ngẫu nhiên tại ba huyện có 27 con chứa kháng thể chống protein phi cấu trúc 3ABC đặc hiệu virus LMLM. Như vậy, trên đàn trâu bò ở các địa bàn này của Quảng Ngãi đã trải qua cảm nhiễm virus LMLM tự nhiên trong quá khứ và có thể vẫn đang lưu hành virus LMLM. Bên cạnh đó, Sơn Tịnh là huyện có trâu bò cảm nhiễm virus LMLM với tỷ lệ cao nhất 25 %. Tỷ lệ nhiễm này sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với tỷ lệ nhiễm 12,5 % ở huyện Đức Phổ, tức là, yếu tố địa bàn ảnh hưởng đến tỷ lệ cảm nhiễm virus LMLM ở bò. Tỷ lệ nhiễm chung 18,75 % nêu trên thấp hơn so với nghiên cứu của nhóm tác giả khác [2] nghiên cứu cũng bằng phản ứng ELISA 3ABC với mẫu thu thập trong vụ dịch năm 2013 tại các huyện Đông Giang và Tây Giang tỉnh Quảng Nam cho thấy tỷ lệ trâu bò dương tính 3ABC đến 42 %. Trong khi đó, theo một nhóm nghiên cứu khác [3] thì các mẫu huyết thanh trâu bò thu thập từ tháng 12 năm 2013 đến tháng 6 năm 2014 tại vùng bắc Hà Tĩnh cho kết quả tỷ lệ mang kháng thể 3ABC virus LMLM là 22,86 %. Kết quả đó tương đương kết quả xét nghiệm các mẫu thu thập tại xã Sơn Tịnh (22,88 % đến 25,12 %) cũng đang trong kỳ sau các vụ dịch. Như vậy, sau khi dịch bệnh LMLM xuất hiện và kết thúc kháng thể 3ABC tồn tại lâu dài trong máu và có thể làm chỉ báo cá thể đã từng bị nhiễm.

Tình trạng cảm nhiễm xác định bởi kháng thể kháng protein phi cấu trúc virus LMLM theo loài động vật: Từ kết quả xét nghiệm kháng thể kháng protein phi cấu trúc 3ABC đặc hiệu

virus lở mồm long móng, tỷ lệ lưu hành được xét theo hai nhóm bò và trâu để khảo sát có hay không có sự khác biệt về tình hình cảm nhiễm của hai loài gia súc này. Kết quả được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Tỷ lệ lưu hành huyết thanh dương tính theo loài động vật chủ

Loại gia súc	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%) lưu hành
Bò	98	19	19,39
Trâu	46	8	17,39
Tổng	**144**	**27**	**18,75**

Bảng 2 cho thấy trong số 98 cá thể bò và 46 cá thể trâu được xét nghiệm ELISA có 19 cá thể bò (19,39 %) và 8 cá thể trâu (17,39 %) dương tính huyết thanh học với kháng nguyên 3ABC của virus LMLM. Kết quả này cho phép đánh giá tỷ lệ bò đã nhiễm virus LMLM dao động từ 19,31 % đến 19,47 %, không sai khác có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) với tỷ lệ dương tính trung bình 18,75 % nhưng cao hơn tỷ lệ dương tính trong khoảng xác định 95 % là 17,28 - 17,50 ở trâu. Sự khác biệt tỷ lệ nhiễm của cá thể bò và trâu không rõ ràng.

Ảnh hưởng của tiêm vaccine đến tỷ lệ cá thể trâu bò mang kháng thể 3ABC tại các địa bàn khảo sát: Tỷ lệ lưu hành huyết thanh đối với các loài được phân chia theo nhóm theo tiêu chí tiêm phòng bằng vaccine trước thời điểm nghiên cứu ít nhất 3 tháng. Trong số 144 cá thể trâu bò được xét nghiệm có 64 con chưa được tiêm vaccine và 80 con đã được tiêm vaccine phòng bệnh LMLM. Kết quả xét nghiệm ELISA 3ABC được phân tích theo hai nhóm đối tượng đó và kết quả được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Tỷ lệ lưu hành huyết thanh học virus lở mồm long móng ở cá thể trâu bò theo nhóm đã tiêm phòng và chưa tiêm phòng bằng vaccine (phương pháp ELISA 3ABC)

Loại gia súc	Số mẫu xét nghiệm	Chưa tiêm vaccine			Đã tiêm vaccine		
		Số con xét nghiệm	Dương tính		Số con xét nghiệm	Dương tính	
			Số con	Tỷ lệ (%)		Số con	Tỷ lệ (%)
Bò	98	46	15	32,61	52	4	7,69
Trâu	46	18	6	33,33	28	2	7,14
Tổng	144	64	21	32,81	80	6	7,5

Kết quả xét nghiệm cho thấy tại ba huyện trong số 64 cá thể trâu bò chưa tiêm vaccine trước đó có 21 con đã từng cảm nhiễm tự nhiên chiếm 32,81 %, trong khi trong số 80 con đã được tiêm vaccine chỉ có 6 con đã bị cảm nhiễm chiếm 7,5 %. Bên cạnh đó, nếu xét riêng từng loài ở bò tỷ lệ này ở nhóm chưa tiêm vaccine và nhóm đã tiêm vaccine lần lượt là 32,61 % và 7,69 %, còn ở trâu thì tỷ lệ nhiễm ở hai nhóm này tương ứng là 33,33 % và 7,14 %. Những cặp tỷ số cảm nhiễm chung hai loài và ở bò và trâu đều sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Điều đó cho thấy tiêm vaccine phòng bệnh LMLM có thể đã giảm tỷ lệ cảm nhiễm virus LMLM và tiêm vaccine cũng không làm tăng tỷ lệ dương tính kháng thể chống kháng nguyên 3ABC của virus đó. Tuy vậy, với các trường hợp gia súc đã tiêm vaccine những xét nghiệm vẫn cho kết quả

dương tính (7,5 % tính chung hai loài, 7,69 % ở bò và 7,14 % ở trâu) có thể do cảm nhiễm virus tự nhiên đã diễn ra trước khi tiêm phòng nhưng không phát bệnh hoặc bệnh nhẹ không phát hiện được, kháng thể tự nhiên được tổng hợp trước và duy trì cả sau tiêm vaccine. Sự giảm đáng kể tỷ lệ nhiễm LMLM tự nhiên ở trâu bò đã tiêm vaccine chứng tỏ vaccine đã tiêm là phù hợp về type với virus tự nhiên. Kết quả trên cũng cho thấy virus mầm bệnh đã tồn tại trong số trâu bò tại địa phương. Các nghiên cứu trên thế giới cho biết trâu bò dương tính 3ABC được biết là có mang trùng, thải virus lâu dài theo dịch hầu, thực quản [13], trên 900 ngày [4]. Tuy nhiên, kết quả xét nghiệm kháng nguyên 3ABC trên đây chỉ là biểu hiện của cảm nhiễm trong quá khứ, còn việc nhận định về thải tiết virus (tức trâu bò mang trùng) cần phải được kiểm chứng bằng xét nghiệm phát hiện gene đặc hiệu virus.

3.2 Áp dụng phản ứng phân tích gene đặc hiệu (RT-PCR) đánh giá sự lưu hành virus lở mồm long móng

Tình hình cảm nhiễm virus lở mồm long móng theo xét nghiệm gene đặc hiệu virus ở trâu và bò tại các địa bàn khảo sát: Theo quy trình nhiều nghiên cứu các mẫu huyết thanh dương tính 3ABC được sử dụng như là biện pháp loại bỏ bớt số mẫu cần xét nghiệm bằng RT-PCR, giúp giảm chi phí xét nghiệm và được sử dụng với mục đích phân lập gene virus (để nghiên cứu dịch tễ học phân tử, chẳng hạn). Tuy nhiên, biện pháp đó có thích hợp hay không cho mục đích chẩn đoán thì còn cần nghiên cứu đánh giá. Trong mục này chúng tôi trình bày kết quả xét nghiệm RT-PCR các mẫu probang của trâu và bò có huyết thanh dương tính theo xét nghiệm ELISA 3ABC (Bảng 4).

Bảng 4. Sự lưu hành virus LMLM qua phân tích RT-PCR các mẫu dương tính kháng thể 3ABC theo loài trên từng địa bàn huyện khảo sát

Huyện	Loại gia súc	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu âm tính	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ % lưu hành
Sơn Tịnh	Bò	10	9	1	10
	Trâu	2	2	0	0
Bình Sơn	Bò	9	9	0	0
	Trâu	0	0	0	0
Đức Phổ	Bò	4	4	0	0
	Trâu	2	2	0	0
Chung	**Bò**	23	22	1	4,35
	Trâu	4	4	0	0
Tổng (2 loài)		**27**	**26**	**1**	**3,7**

Kết quả cho thấy trong số 27 con cả trâu và bò mang kháng thể kháng protein 3ABC virus LMLM có 1 cá thể bò (3,7 %) ở huyện Đức Phổ có gene đặc hiệu virus này trong dịch họng. Tỷ lệ này thấp so với kết quả nghiên cứu của một nhóm nghiên cứu tại bắc Hà Tĩnh [3] cho rằng từ các mẫu probang dịch hầu họng của trâu bò có kháng thể 3ABC phản ứng rRT-PCR cho tỷ lệ dương tính với virus LMLM tại địa bàn nghiên cứu là 11,90 %, nhưng kết quả đó cũng có điểm giống kết quả của chúng tôi rằng phương pháp RT-PCR cho kết quả rất thấp so với ELISA 3ABC. Trong khi đó, kết quả nghiên cứu bằng RT-PCR trong vụ dịch của một nhóm tác giả

khác [2] cho thấy 100 % (20/20) số mẫu probang trâu bò bệnh được xét nghiệm bằng RT-PCR đều dương tính.

Hiện nay, trong xét nghiệm chẩn đoán LMLM thường sử dụng phản ứng ELISA 3ABC để phân biệt huyết thanh dương tính là do nhiễm virus thực địa khỏi dương tính do vaccine. Cơ sở khoa học của phương pháp này là khi virus LMLM nhiễm vào cơ thể gia súc thì quá trình nhân lên của virus sẽ diễn ra trong tế bào. Trong quá trình đó, để tái tạo các hạt virus mới (các virion), gene virus cần phải được làm khuôn tổng hợp nên một số thành phần không tham gia tạo thành các hạt virion mới mà chỉ đóng vai trò là các enzyme tổng hợp thành phần tham gia vào cấu trúc hạt virus. Các thành phần kết hợp thành hạt virus gọi là protein cấu trúc (structure protein), còn các thành phần không tham gia kết hợp thành virion gọi là protein phi cấu trúc (non-structure protein) [9, 10, 11]. Phát hiện kháng thể chống protein phi cấu trúc của virus vì vậy được coi là giúp phát hiện cảm nhiễm virus tự nhiên do protein phi cấu trúc chỉ có mặt trong cơ thể động vật khi xảy ra quá trình nhân lên của virus, còn trong dịch dung giải tế bào bị nhiễm virus LMLM thì polypeptide có tính kháng nguyên cao này tồn tại với nồng độ thấp [6]. Tuy nhiên, mặc dù từ ban đầu ELISA 3ABC được coi là thích hợp nhất trong xét nghiệm phân biệt động vật cảm nhiễm với động vật tiêm vaccine LMLM, nhưng nhiều nghiên cứu cho thấy không một protein phi cấu trúc nào có thể phân biệt động vật cảm nhiễm và động vật đã tiêm vaccine một cách chắc chắn [14]. Kháng thể chống protein 3ABC của virus LMLM phát hiện được từ ngày thứ 8 sau cảm nhiễm và mức phát hiện được duy trì ít nhất là một năm [10]. Cho nên, ELISA 3ABC không thể phát hiện được trường hợp sớm hơn một tuần sau cảm nhiễm virus và ngược lại kết quả ELISA dương tính ngay cả khi cảm nhiễm đã kết thúc. Điều này đòi hỏi phải sử dụng phương pháp khác hiệu quả hơn.

Phương pháp RT-PCR đã được áp dụng khá phổ biến để xác định sự có mặt của RNA virus LMLM trong bệnh phẩm. Để phát hiện gia súc bị nhiễm, đồng thời xác định type virus gây bệnh LMLM dai dẳng ở thực địa, kỹ thuật RT-PCR tỏ ra rất nhạy, nhanh, chính xác, hiệu quả thường được sử dụng bổ sung hoặc thay thế cho phương pháp huyết thanh học [15]. Nhưng nếu hai phương pháp có giá trị như nhau thì các cặp kết quả xét nghiệm từ một động vật duy nhất phải giống nhau. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này của chúng tôi tỷ lệ trâu bò có kết quả RT-PCR dương tính là quá thấp (3,7 %) so với ELISA 3ABC. Từ sự khác biệt này có thể cho rằng phương pháp ELISA 3ABC không giúp phát hiện cá thể nhiễm bệnh tại thời điểm lấy mẫu mà chỉ cho biết những động vật đã cảm nhiễm trong quá khứ (và có thể đã khỏi bệnh).

So sánh hai phương pháp 3ABC ELISA và RT-PCR trong đánh giá sự lưu hành virus lở mồm long móng ở trâu bò: Ngoài 27 cá thể trâu bò có phản ứng huyết thanh học dương tính (có kháng thể chống protein 3ABC) nêu trên chúng tôi còn chọn ngẫu nhiên thêm 20 mẫu dịch họng của trâu bò không có kháng thể 3ABC để thực hiện phản ứng RT-PCR. Kết quả xét nghiệm phát hiện sự hiện diện của gene virus LMLM từ mẫu probang lấy từ trâu bò có kháng thể và không có kháng thể 3ABC virus LMLM được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Sự lưu hành virus LMLM bằng xét nghiệm phát hiện gene virus từ mẫu probang thu từ trâu bò mang kháng thể và không mang kháng thể chống protein 3ABC theo địa bàn

Huyện	Kết quả 3ABC ELISA	Số mẫu xét nghiệm RT-PCR	Số mẫu dương tính RT-PCR	Tỷ lệ RT-PCR dương tính (%)	Số gia súc có kết quả hai xét nghiệm đối lập
Sơn Tịnh	Dương	12	1	8,33	11
	Âm	6	1	16,67	1
Bình Sơn	Dương	9	0	0	9
	Âm	7	0	0	0
Đức Phổ	Dương	6	0	0	6
	Âm	7	1	14,29	1
Chung	**Dương**	**27**	**1**	**3,7**	**26**
	Âm	**20**	**2**	**10**	**2**

Bảng 5 cho thấy ngoài 1 mẫu probang từ 1 cá thể ở huyện Sơn Tịnh bị cảm nhiễm (phát hiện nhờ ELISA 3ABC) còn có 2 cá thể khác (1 ở Sơn Tịnh, 1 ở Đức Phổ) trong số 20 cá thể có huyết thanh không chứa kháng thể kháng protein 3ABC của virus LMLM chứa gene, tức mang virus này. Như vậy, RT-PCR giúp ta phát hiện cảm nhiễm virus ở động vật mà phương pháp ELISA 3ABC không thể phát hiện được. Đây có thể là các gia súc bị cảm nhiễm mới và thời gian cảm nhiễm chưa đủ dài để cơ thể động vật phát triển đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể kể cả kháng thể chống protein 3ABC của virus. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu miễn dịch học đã trở thành quan niệm chung là đáp ứng miễn dịch đặc hiệu lần đầu cần thời gian khá dài (khoảng 1 tuần). Kết quả nghiên cứu này, như vậy, chỉ ra rằng việc phát triển các kit ELISA phát hiện kháng thể phi cấu trúc của virus tuy giúp phân biệt cảm nhiễm tự nhiên với đáp ứng miễn dịch chống virus do tiêm vaccine, nhưng ít có ý nghĩa đối với chẩn đoán bệnh virus.

Các số liệu ở bảng 5 còn thấy rằng ở huyện Sơn Tịnh tỷ lệ (16,67 %) trâu bò hiện nhiễm (mang và thải) virus LMLM cao hơn ở 2 huyện Bình Sơn và Đức Phổ. Điều này liên quan đến thực tế rằng trong những năm vừa qua huyện Sơn Tịnh thường xuyên xảy ra dịch LMLM hơn, số lượng trâu bò mắc bệnh cũng tương đối nhiều so với Bình Sơn và Đức Phổ. Mặt khác, việc virus không còn thải ra trong dịch họng ở một tỷ lệ cao (26 trong số 27) trâu bò đã cảm nhiễm trong quá khứ chứng tỏ bệnh LMLM là bệnh có thể dẫn đến tình trạng động vật khỏi bệnh hoàn toàn đến mức không còn mang và thải virus. Do đó, có thể không nhất thiết phải giết hủy gia súc (ít nhất là đối với trâu và bò) không mắc bệnh trong các vụ dịch như khuyến cáo gần đây của một số nhóm nghiên cứu khác ở châu Âu [5, 8].

Đánh giá sự lưu hành virus LMLM qua phân tích gene từ mẫu probang của các cá thể trâu bò đã tiêm phòng và chưa tiêm phòng: Với những kết quả xét nghiệm thu được bằng rRT-PCR ở trên, chúng ta còn có thể đánh giá nguy cơ trâu bò bị nhiễm virus LMLM trong trường hợp đã tiêm phòng cũng như chưa tiêm phòng có hoặc không có kháng thể 3ABC. Việc đối chiếu tìm sự liên quan giữa số động vật hiện mắc (RT-PCR dương tính) và số động vật đã mắc (3ABC ELISA dương tính) trong hai nhóm động vật đã tiêm vaccine và chưa tiêm vaccine cho phép xác định sự phù hợp giữa chủng loại vaccine đã sử dụng với chủng loại virus lưu hành trong thực địa. Kết quả được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của vaccine áp dụng tiêm phòng bệnh LMLM tại địa bàn khảo sát đến cảm nhiễm qua kết quả xét nghiệm kháng thể chống 3ABC và phát hiện gene virus

Tình trạng của gia súc	Kết quả 3ABC ELISA		Kết quả RT- PCR	Kết quả RT- PCR	Tỷ lệ dương tính RT-PCR (%)
			Dương tính	Âm tính	
Chưa tiêm vaccine	Dương	21	1	20	4,76
	Âm	8	0	8	0
Đã tiêm vaccine	Dương	6	0	6	0
	Âm	12	2	10	16,67
Tổng cộng	Dương	27	1	26	3,7
	Âm	20	2	18	10

Từ kết quả thu được ở bảng 6, khảo sát đại lượng nguy cơ tương đối (RR) xem ảnh hưởng của việc không tiêm vaccine LMLM với cảm nhiễm theo ELISA và theo RT-PCR ta có cặp kết quả sau: $RR_{\text{không vaccine/ELISA}} = 2,17$ và $RR_{\text{không vaccine/RT-PCR}} = 0,31$. Như vậy, không tiêm vaccine đã làm tăng tỷ lệ trâu bò mang kháng thể chống protein 3ABC virus (nhiễm cũ), nhưng việc đã tiêm vaccine cũng không làm giảm tỷ lệ trâu bò nhiễm virus theo kết quả RT-PCR (nhiễm mới). Điều này có thể đưa đến ý niệm rằng có chủng loại virus không phù hợp chủng loại vaccine đã sử dụng mới xuất hiện.

4 Kết luận

Từ mẫu dịch probang hầu họng 144 cá thể trâu bò thu thập đầu năm 2015 tại Quảng Ngãi đã phát hiện 27 con (18,75 %) mang kháng thể 3ABC. Theo địa bàn, Sơn Tịnh là huyện có tỷ lệ nhiễm cao nhất (khoảng ¼) và sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với huyện bị cảm nhiễm thấp nhất Đức Phổ (khoảng 1/8). Xét theo loài, bò có tỷ lệ cảm nhiễm không cao hơn trâu một cách rõ ràng.

Xét đến tình trạng tiêm phòng trước 3 tháng thì thấy được trâu bò chưa tiêm vaccine có tỷ lệ mang kháng thể chống protein 3ABC (32,81 %) cao hơn rõ rệt ($p < 0,05$) so với trâu bò đã được tiêm vaccine (7,5 %), cho thấy tiêm vaccine trước đó đã làm giảm tỷ lệ nhiễm virus.

Kết quả RT-PCR phát hiện gene virus LMLM trong 27 mẫu dương tính và 20 mẫu âm tính 3ABC nêu trên đã cho thấy không có sự trùng hợp giữa các kết quả của phương pháp ELISA 3ABC và phương pháp RT-PCR. Vì vậy hai phương pháp này có giá trị khác nhau và không thể thay thế cho nhau.

Trong số 27 cá thể trâu bò mang kháng thể 3ABC chỉ 1 cá thể bò có gene LMLM, ngược lại, trong số 20 cá thể trâu bò không mang kháng thể 3ABC lại có 2 con mang gene virus LMLM trong dịch họng. Điều này có thể do có những cá thể trâu bò mới nhiễm chưa kịp hình thành kháng thể và cũng có gia súc bị nhiễm virus nhưng đã khỏi và không còn phát hiện thấy virus trong bệnh phẩm.

Trái với phương pháp ELISA 3ABC nêu trên, kết quả phản ứng RT-PCR không tương quan thuận với tình trạng tiêm vaccine LMLM trong quá khứ. Như vậy, có thể đã xuất hiện trường hợp mắc mới với type mới của virus LMLM trong địa bàn khảo sát. Các kết quả trên cho

thấy nên sử dụng RT-PCR để phát hiện tình trạng hiện mắc LMLM, còn ELISA 3ABC có ý nghĩa trong phát hiện tình trạng nhiễm tự nhiên trong quá khứ nhưng không phản ánh được trường hợp mắc mới.

Tài liệu tham khảo

1. Hồ Đình Chúc, Tô Long Thành (2003), Phát hiện trâu bò nhiễm virus lở mồm long móng bằng KIT ELISA-FMD-3ABC, *Khoa học Kỹ thuật Thú y*, X(3), 14-22.
2. Nguyễn Đình Minh, Nguyễn Văn Cảm, Đào Thị Hảo, Nguyễn Thị Thu Hiền, Mai Xuân Thành, Vũ Thị Phương Thúy (2015), Kết quả điều tra sự phơi nhiễm các virus gây bệnh tai xanh, lở mồm long móng và cúm gia cầm trên đàn gia súc, gia cầm nuôi tại tỉnh Quảng Nam, *Khoa học Kỹ thuật Thú y* XXII(6), 20-25.
3. Trần Quang Vui, Lê Đình Huệ, Dương Tất Thắng (2015), Khảo sát sự lưu hành virus lở mồm long móng ở trâu bò trên địa bàn Bắc Hà Tĩnh, *Khoa học Kỹ thuật Thú y* XXII(6), 12-19.
4. Alexandersen S., Quan M., Murphy C., Knight J., Zhang Z. (2003), Studies of quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. *J. Comp. Pathol*.,129, 268-282.
5. Backer J. A., Engel B., Dekker A., van Roermund H. J. (2012), Vaccination against foot-and-mouth disease II: Regaining FMD-free status, *Preventative Veterinary Medicine*, 107(1-2), 41-50.
6. Blanco E., Romero L. J., El Harrach M., Sánchez-Vizcaíno J. M. (2002), Serological evidence of FMD subclinical infection in sheep population during the 1999 epidemic in Morocco. *Veterinary Microbiology*, 85(1), 13-21.
7. Callahan, J. D., Brown, F., Osorio, F.A., Sur, J. H., Kramer, E., Long, G. W., Lubroth, J., Ellis, S. J., Shoulars K. S., Gaffney K. L., Rock D. L., Nelson W. M. (2002), Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 220(11),1636-1642.
8. Charleston B., Bankowski B. M., Gubbins S., Chase-Topping M. E., Schley D., Howey R., Barnett P. V., Gibson D., Juleff N. D., Woolhouse M. E. (2011), Relationship between clinical signs and transmission of an infectious disease and the implications for control, *Science*, 332(6030), 726-729.
9. Chung W. B., Sorensen K. J., Liao P. C., Jong M. H. (2002), Differentiating FMDV infected pigs from vaccinated pigs by blocking ELISA using non-structural protein 3 ABC as antigen and its application to an eradication program. *Journal of Clinical Microbiol*ogy, 40, 2843-2848.
10. De Diego M., Brocchi E., Makay D., De Simone F. (1997), The non-structural polyprotein 3 ABC of FMDV as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle, *Archives of Virology* 142, 2021-2033.
11. Ferris N. P., Dawson M. (1988), Routine application of ELISA in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot and mouth and swine vesicular disease, *Veterinary Microbiology* 16, 201-209.
12. Hamblin, C., Kitching, R. P., Donaldson, A. I., Crowther, J. R., Barnett, I. T. (1987), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. III. Evaluation of antibodies after infection and vaccination, *Epidemiology and Infection* 99(3), 733-744.
13. Ilott M. C., Salt J. S., Gaskell R. M., Kitching R. P. (1997), Dexamethasone inhibits virus production and the secretory IgA response in oesophageal-pharyngeal fluid in cattle persistently infected with foot-and-mouth disease virus, *Epidemiology and Infection* 118, 181-187.

14. Ma L. N., Zhang J., Chen H. T., Zhou J. H., Ding Y. Z., Liu Y. S. (2011), An overview on ELISA techniques for FMD, *Virological Journal*, 8, 419.

15. Reid S. M., Grierson, S. S., Ferris N. P., Hutchings G. H., Alexandersen S. (2003), Evaluation of automated RT-PCR to accelerate the laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virological Methods*, 107, 129-139.

16. Snedecor G. W., Cochran W. G. (1982), *Statistical Methods, 7th edition*. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

USING ELISA FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES TO NON-STRUCTURAL PROTEIN 3ABC AND RT-PCR FOR THE DETECTION OF SPECIFIC VIRAL GENE IN DIAGNOSIS OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE IN QUANG NGAI IN EARLY 2015

Pham Hong Son[1]*, Le Thi Thanh[2], Ngo Huu Lai[3], Phan Huu Duc[3]

[1] College of Agriculture and Forestry, Hue University

[2] Quang Ngai Department of Agriculture and Rural development

[3] Animal Agency, Region 3, Da Nang city

Abstract: The methods of ELISA for detection of antibodies to viral non-structural protein (3ABC ELISA) and RTPCR for detection of viral specific genes in the diagnosis of foot-and-mouth disease (FMD) virus gave different results. From the serum samples of 144 cattle and buffaloes collected in Quang Ngai province in early 2015, 27 individuals (18.75 %) were detected with antibodies to the 3ABC protein. Among the three studied districts, Son Tinh experienced highest prevalance (about 25 %), which was significantly different ($p < 0.05$) from Duc Pho with the lowest rate (about 12.5%). Within the two animal species, the cattle had a higher prevalence than the buffaloes. Regarding early vaccination, there was a higher rate for 3ABC positive individuals in the non-vaccinated group (32.81% compared with 7.5% in vaccinated group), indicating that vaccination has not evoked the 3ABC antibody in the animals. RT-PCR analysis, however, showed that among 27 probang samples of ELISA-positive animals there was only one cattle bearing FMDV gene, meanwhile two individuals among 20 ELISA-negative animals had the viral gene. Thus, there is a fact that existed newly infected animals that have not yet developed antibodies to the viral proteins, on one hand, and also, infected animals that had stopped shedding the virus, or possibly, recovered from the infections, on the other.

Key words: foot-and-mouth disease, virus, antibodies, specific gene, non-structural proteins