

# **Sử dụng tổ hợp phản ứng ngưng kết hồng cầu trực tiếp với trắc định xê lệch ngăn trở ngưng kết hồng cầu chuẩn (HA-SSDHI) và trắc định xê lệch ngưng kết gián tiếp chuẩn (SSIA) trong chẩn đoán bệnh Niucatxon**

*Nguyễn Thị Hoàng Oanh, Phạm Thị Hồng Lam,  
Đỗ Thị Lợi và Phạm Hồng Sơn  
Đại học nông lâm Huế*

## **TÓM TẮT**

Sử dụng các phản ứng tổ hợp ngưng kết hồng cầu trực tiếp với trắc định xê lệch ngăn trở ngưng kết trực tiếp chuẩn (HA-SSDHI) và phản ứng trắc định xê lệch ngưng kết gián tiếp chuẩn (SSIA) đều đã phát hiện được kháng nguyên virus trong dịch phân và dịch họng gà. Xét nghiệm cho thấy phản ứng SSIA tỏ ra nhạy hơn nhưng sự sai khác không có ý nghĩa thống kê so với phương pháp HA-SSDHI. Phân gà là bệnh phẩm chứa kháng nguyên virus với tỷ lệ cao hơn dịch họng gà nhưng sai khác này cũng không có ý nghĩa thống kê. Kết quả nghiên cứu còn cho thấy khoảng 20% gà ở Thừa Thiên- Huế mang virus Niucatxon.

**Từ khóa:** Bệnh Niucatxon, Gà, Ngưng kết hồng cầu, Ngăn trở ngưng kết hồng cầu, Ngưng kết hồng cầu gián tiếp, Trắc định xê lệch ngưng kết gián tiếp chuẩn.

## **Application of combination of direct haemagglutination with shifting assay of direct haemagglutination inhibition (HA-SSDHI) and shifting assay of indirect agglutination inhibition (SSIA) in diagnosis of Newcastle disease**

*Nguyen Thi Hoang Oanh, Pham Thi Hong Lam,  
Do Thi Loi and Pham Hong Son*

## **SUMMARY**

Using of the combined method of direct haemagglutination with shifting assay of standardized direct haemagglutination inhibition (HA-SSDHI) and shifting assay of standardized indirect agglutination (SSIA) could detect Newcastle disease virus antigens both in supernatant centrifuge liquids of fecal samples and in mouth exudates of chickens. The research showed that the SSIA is slightly more sensible than HA-SSDHI in detection of NDV antigens in chickens, meanwhile fecal samples had a higher percentage of the virus antigens than those of mouth exudates, but the both differences were not statistically significant. The research did also show that about 20% of chickens in Thua Thien Hue are infected with the virus.

**Key words:** Chicken, Newcastle disease, HA, HI, IHA, SSIA, SSDHI.

## **I. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Chẩn đoán phát hiện kháng nguyên virus bệnh Niucatxon ở gà nhanh chóng là biện pháp quan trọng đối với bệnh dịch lây nhanh này (Nguyễn Vĩnh Phước & cs, 1978). Tuy nhiên, các kỹ thuật phát hiện virus mầm bệnh hoặc các yếu tố đặc hiệu mầm bệnh như phân lập virus trong phôi gà hoặc lú cá tế bào và phát hiện bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu (Hirst, 1941, dẫn trong Cottral, 1978) là kỹ thuật mất nhiều thời gian, còn kỹ thuật ELISA phát hiện kháng nguyên và kháng thể cũng như kỹ thuật RT-PCR thì đắt tiền, phải dùng một số hóa chất độc hại và không có tính chủ động do đến nay vẫn phụ thuộc vào nguồn sinh phẩm nhập khẩu. Gần đây, kỹ thuật trắc định xê lệch ngưng kết gián tiếp chuẩn (SSIA, một dạng mở rộng của phương pháp ngưng kết gián tiếp - IHA) được chúng tôi thiết lập và sử dụng có hiệu quả trong chẩn đoán bệnh cúm A ở gia cầm (Phạm Hồng Sơn, 2006). Từ kết quả đó chúng tôi đã vận dụng SSIA vào chẩn đoán bệnh Niucatxon và nhận thấy đây là phương pháp chẩn đoán hữu hiệu mặc dù cần nghiên cứu thêm khả năng bảo tồn các sinh phẩm để chủ động sẵn sàng xét nghiệm khi cần. Đồng thời, trong quá trình

nghiên cứu các mẫu dịch li tâm cao tốc 14000 vòng/phút trong 5 - 10 phút của các mẫu phân và khí quản gà trong nước sinh lí (1:10) chúng tôi nhận thấy rằng các dịch trong suốt này không gây trở ngại cho phản ứng ngưng kết hồng cầu và ngăn trở ngưng kết hồng cầu nếu trong các mẫu đó không có mặt của kháng nguyên virus gây ngưng kết hồng cầu (như virus Lasota pha thêm vào mẫu) hoặc kháng thể chống lại chúng. Thậm chí các dịch lọc này có thể sử dụng thay thế cho nước sinh lí trong các phản ứng đó với kết quả không thay đổi. Từ những quan sát đó, chúng tôi đã giả thuyết rằng có thể sử dụng phản ứng ngưng kết hồng cầu để phát hiện những mẫu phân hoặc dịch hòng chứa các virus gây ngưng kết, sau đó dùng các mẫu dịch lọc HA dương tính đó thay thế nước sinh lí trong phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) (Cottral, 1978) với kháng huyết thanh đặc hiệu chống virus Niucatxon có hiệu giá đã biết thì sẽ phát hiện được các bệnh phẩm chứa virus Niucatxon, nhờ virus trong bệnh phẩm làm giảm hiệu giá ngăn trở ngưng kết hồng cầu của kháng huyết thanh. Chúng tôi gọi phương pháp này là “tổ hợp ngưng kết hồng cầu trực tiếp với trắc định suy giảm hiệu giá ngăn trở ngưng kết đặc hiệu”, hay “tổ hợp ngưng kết hồng cầu trực tiếp với trắc định xô lệch ngăn trở ngưng kết hồng cầu trực tiếp” (kí hiệu tắt là HA-SSDHI - từ các chữ haemagglutination và shifting assay of standardized direct haemagglutination inhibition)”. Việc phối hợp sàng lọc bằng HA không đặc hiệu với trắc định sau đó bằng kháng thể đặc hiệu trong HA-SSDHI giúp ta giảm được một lượng lớn kháng thể đặc hiệu chống virus Niucatxon là yếu tố phải sản xuất với giá thành cao và điều kiện nghiêm ngặt, một trở ngại lớn khi cần xét nghiệm số lớn các mẫu bệnh phẩm. Tuy nhiên, trong nghiên cứu có tính kiểm chứng này, chúng tôi thực hiện xét nghiệm song song tất cả các mẫu phân và hòng bằng cả ba phương pháp HA, SSDHI và SSIA và phân tích kết quả với các phương pháp (đơn và tổ hợp): HA-SSDHI, HA, SSDHI và SSIA. Bài viết này trình bày những kết quả đạt được từ những xét nghiệm đó.

## II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Lấy mẫu phân và xử lí mẫu phân gà

Phân gà được lấy cá thể từ các gà ở một số địa bàn trong tỉnh Thừa Thiên- Huế bằng cho vào một túi ppolyethylene (PE) sạch. Buộc miệng túi chứa phân và cho vào một túi PE thứ hai, kèm mẫu giấy ghi các thông tin về mẫu phân, buộc chặt miệng túi thứ hai và đặt vào hộp đựng nước đá chuyên về phòng thí nghiệm. Tại đó các mẫu được sử dụng ngay hoặc bảo quản ở tủ lạnh sâu -20 °C cho đến khi sử dụng. Khi chiết mẫu cần tính trước lượng dịch cần thiết cho các phản ứng từ mỗi mẫu phân. Nếu cần thực hiện một phản ứng từ một mẫu phân thì cần nhỏ vào một ống Eppendorf (vô trùng) 100 µl nước sinh lí, dùng nạo xương y tế số #0001 đưa vào bao PE chứa mẫu phân đang được giữ bởi tay khác (qua thành túi) và lấy đầy phân vào lòng nạo. Đưa đầu nạo vào nước sinh lí trong ống Eppendorf và khuấy kĩ để phân hòa đều. Có thể dùng tấm tre để làm thuận lợi việc hòa đều mẫu vào nước sinh lí. Mỗi lần như vậy hòa được 10 mg phân vào 100 µl nước sinh lí. Khi cần thực hiện số phản ứng nhiều hơn thì tăng lượng nước sinh lí và lượng phân với bội số tương ứng (trong nghiên cứu này: hòa 10 nạo phân vào 1000 µl nước sinh lí cho 10 phản ứng). Huyền dịch phân sau đó được quay li tâm 5 phút ở tốc độ 14000 vòng/phút. Hút lấy dịch trong suốt ở trên ống cho vào một ống Eppendorf mới (ghi sẵn kí hiệu) để làm nguyên liệu cho các phản ứng. Cát tủ lạnh sâu -20 °C các mẫu dịch chiết trong suốt này khi chưa thực hiện phản ứng.

### 2.2 Lấy mẫu phân và xử lí mẫu hòng gà

Dùng nạo xương nêu trên đưa vào hòng gà lấy mỗi lần được 10 mg dịch hòng, khuấy kĩ vào 100 µl nước sinh lí trong một lọ Eppendorf, quay li tâm 14000 vòng/ phút trong 5 phút và hút thu lấy nước trong chuyển sang ống Eppendorf mới.

### 2.3 Chế kháng huyết thanh đặc hiệu chống virus Niucatxon

Thỏ trên 2 kg, nuôi với mức dinh dưỡng tốt, được tiêm vacxin Niucatxon 4 lần:

Lần 1: Lượng vacxin bằng 5 liều tiêm cho gà

4 tuần sau tiêm lần 2 bằng 10 liều tiêm cho gà

10 ngày sau tiêm lần 3 và sau đó 7 ngày tiêm lần 4, cả 2 lần tiêm 10 liều cho gà như lần 2.

Sau 10 ngày thỏ được lấy máu, để đông tự nhiên trong 2 - 3 giờ, huyết thanh được chất vào các ống Eppendorf, bảo quản tủ lạnh -20 °C mỗi ống 0,5 ml để tránh giải đông các mẫu huyết thanh nhiều lần mỗi khi lấy xét nghiệm. Hiệu giá kháng thể chống virus Niucatxon được xác định bằng phản ứng HI (Cottral, 1978) và IHA (Phạm Hồng Sơn, 2004) với hồng cầu gắn virus Niucatxon Lasota. Đồng thời kiểm tra tính đặc hiệu của kháng huyết thanh thỏ bằng phản ứng chống kháng nguyên virus cúm nhờ phản ứng IHA với hồng cầu gắn kháng nguyên virus cúm A/H5N1 (Phạm Hồng Sơn, 2009). Kháng huyết thanh thỏ đặc hiệu Niucatxon phải không tạo phản ứng IHA dương tính với kháng nguyên hồng cầu gắn virus cúm.

#### **2.4 Phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA) định lượng virus chuẩn**

Phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA) định lượng virus chuẩn (vacxin Lasota) cần thiết cho việc pha dịch virus nguyên liệu (dịch virus làm việc) để thực hiện phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu nhằm xác định hiệu giá kháng thể trong huyết thanh gà. Phản ứng HA được thực hiện theo thường quy. Từ kết quả hiệu giá virus (độ pha loãng lớn nhất của virus còn gây ngưng kết) suy ra số đơn vị ngưng kết (đơn vị HA) có trong dịch virus gốc (giá trị nghịch đảo hiệu giá) ta pha dịch virus gốc thành dịch virus làm việc có nồng độ 4 đơn vị ngưng kết (4HA) để làm nguyên liệu thực hiện phản ứng HI (Cottral, 1978, mô tả lại bởi Phạm Hồng Sơn & Bùi Quang Anh, 2006) trắc định kháng thể trong kháng huyết thanh thỏ và sau đó làm nguyên liệu cho phản ứng trắc định suy giảm HI đặc hiệu hay xê lệch ngăn trở ngưng kết hồng cầu trực tiếp (SSDHI).

#### **2.5 Phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA) định lượng virus mẫu kiểm**

Dịch li tâm trong suốt của mỗi mẫu phân hoặc mỗi mẫu hòng gà được sử dụng thay thế vị trí của nước sinh lí và virus vacxin Lasota nêu trên. Các phản ứng dương tính (có ngưng kết) sẽ được coi là có virus gây ngưng kết trong mẫu nhưng không nhất thiết là virus Niucatxon.

Trên khay 96 lỗ (giếng) mỗi dãy 12 lỗ được sử dụng cho một phản ứng thực hiện như mô tả trước đây (Cottral, 1978) ngoại trừ dịch chiết bệnh phẩm cần kiểm thay thế nước sinh lí và dịch niệu nang chứa virus Niucatxon. Cho vào các lỗ (giếng) từ lỗ thứ 2 đến lỗ 12 mỗi lỗ 50 µl nước sinh lí (NaCl 0,85% trong nước), sau đó cho 100 µl dịch chiết bệnh phẩm vào lỗ thứ nhất (lỗ không có nước sinh lí). Dùng pipet tự động hút nhả 4 - 5 lần để trộn và sau đó chuyển 50 µl từ lỗ thứ nhất sang lỗ thứ hai, lại trộn chuyển như vậy cho đến lỗ thứ 10 thì hút bỏ 50 µl. Cho vào tất cả các lỗ mỗi lỗ 50 µl huyền dịch hồng cầu 1% (khối lượng ướt/thể tích). Theo dõi thường xuyên từ 15 đến 60 phút để đọc kết quả HA kịp thời, vì virus có thuộc tính phân rã ngưng kết, khi ở các lỗ 11 và 12 hồng cầu chìm tự nhiên xuống tâm đáy lỗ.

#### **2.6. Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) trắc định kháng thể**

Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) được thực hiện trên cơ sở phản ứng HA vừa được thiết lập với huyền dịch hồng cầu (1%) và dịch virus làm việc 4HA đã pha (Cottral, 1978, Surin & CS, 1986). Cho vào tất cả 12 lỗ khay mỗi lỗ 50 µl nước sinh lí. Cho 50 µl kháng huyết thanh (hoặc huyết thanh cần kiểm) vào lỗ thứ nhất. Pha loãng huyết thanh trong dãy 12 lỗ khay từ lỗ đầu đến lỗ 10 thì hút bỏ 50 µl. Để lỗ thứ 11 và 12 làm đối chứng âm tính kháng thể. Nhỏ vào các lỗ thứ nhất đến thứ 11 mỗi lỗ 50 µl dịch virus 4HA, sau đó nhỏ vào tất cả các lỗ 50 µl huyền dịch hồng cầu 1% nêu trên (lắc hay khuấy đều). Đọc kết quả khi lỗ thứ 12 (chỉ có hồng cầu trong nước sinh lí) chìm gọn xuống đáy lỗ trong khi ở lỗ 11 (gồm dịch virus 4HA và hồng cầu trong nước sinh lí) ngưng kết hoàn toàn. Phản ứng ngăn trở ngưng kết biểu hiện ở việc hồng cầu không ngưng kết mà chìm xuống tâm đáy lỗ tương tự lỗ thứ 12. Hiệu giá kháng thể là độ pha loãng lớn nhất của huyết thanh cho phản ứng ngăn trở ngưng kết. Dựa vào kết quả phản ứng này, các mẫu kháng huyết thanh thỏ đặc hiệu virus Niucatxon được pha loãng để có nồng độ kháng thể là 4 đơn vị ngăn trở ngưng kết (4HI) chuẩn bị cho phản ứng trắc định suy giảm hiệu giá HI đặc hiệu.

## 2.7 Phản ứng trắc định suy giảm hiệu giá HI đặc hiệu (SSDHI)

Được thực hiện trên một khay vi chuẩn độ xoay ngang sao cho mỗi khay có thể sử dụng để xét nghiệm 11 mẫu kiểm hoặc song song với một mẫu chuẩn trong đó nước sinh lí thể chỗ cho dịch chiết mẫu kiểm. Nguyên tắc là nếu có kháng nguyên trong mẫu kiểm thì kháng nguyên đó do tiếp xúc trước với kháng huyết thanh và làm giảm hiệu giá của kháng thể chuẩn  $4\log_2$  trong phản ứng với hồng cầu sau đó. Các mẫu có kháng nguyên NDV sẽ làm hiệu giá HI giảm xuống 1, 2, 3 hoặc 4 mức ứng với hiệu giá kháng nguyên  $1\log_2$ ,  $2\log_2$ ,  $3\log_2$  và  $4\log_2$ . Trình tự thực hiện các bước được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1. Các bước phản ứng trắc định suy giảm hiệu giá HI (SSDHI) đặc hiệu virus Niucatxon**

Nguyên liệu ở các bước	Lỗ khay của mỗi dãy số							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Nước sinh lí ( $\mu\text{l}$ )	50/-*	50	50	50	50	50	50	50
Dịch phân / hòng ( $\mu\text{l}$ )	-/50**	-	-	-	-	-	-	-
Kháng huyết thanh thô đặc hiệu virus bệnh Niucatxon hiệu giá $4\log_2$ ( $\mu\text{l}$ )	50	Trộn và chuyển 50 $\mu\text{l}$ từ một lỗ sang lỗ kế tiếp bên phải. Hút bỏ 50 $\mu\text{l}$ khỏi lỗ 8 sau khi trộn xong.						
Kháng nguyên 4HA (vaccine Lasota) ( $\mu\text{l}$ )	50	50	50	50	50	50	50	-
Đề yên ở nhiệt độ phòng 10 phút								
Hồng cầu ngan 1% ( $\mu\text{l}$ )	50	50	50	50	50	50	50	50
Đọc kết quả sau 15 - 60 phút khi ở dãy chuẩn thể hiện rõ $4\log_2$								

*Ghi chú: \* 50  $\mu\text{l}$  nước sinh lí ở lỗ đầu của chỉ dãy chuẩn; \*\* 50  $\mu\text{l}$  dịch chiết bệnh phẩm chỉ có ở các dãy kiểm. Mỗi khay 96 lỗ có 1 dãy làm đối chứng và 11 dãy (đều 8 lỗ) làm phản ứng kiểm tra mẫu.*

Đọc kết quả: Bắt đầu đọc kết quả khi dãy chuẩn thể hiện rõ: 4 lỗ đầu và lỗ thứ 8 không có ngưng kết, hồng cầu chìm xuống giữa tâm lỗ khay (không ngưng kết). Có thể gặp trường hợp 3 lỗ đầu hoặc 5 lỗ đầu của dãy chuẩn không ngưng kết (do nồng độ kháng nguyên gần hồng cầu thay đổi ngẫu nhiên). Khi đó đường chuẩn sẽ là sau 3 hoặc 5 lỗ khay đầu tương ứng. Dịch lọc bệnh phẩm tiếp xúc trước với kháng huyết thanh, nếu chứa kháng nguyên virus Niucatxon thì sẽ làm giảm kháng thể đặc hiệu trong kháng huyết thanh, phản ứng sẽ biểu hiện lệch trái so với dãy chuẩn.

## 2.8 Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu gián tiếp (IHA) trắc định kháng thể

Được thực hiện như phương pháp đã mô tả trước đây (Boyden, 1951) với hồng cầu gắn kháng nguyên cải tiến (Phạm Hồng Sơn, 2009). Kháng nguyên hồng cầu gắn virus được chế trước qua các bước Lasota hóa, formalin hóa, tannin hóa và virus hóa, pha thành huyền dịch 1% (khối lượng ướt/thể tích, pha đúng nhờ so màu với một huyền dịch hồng cầu chuẩn) ta có kháng nguyên IHA. Phản ứng IHA được thực hiện trên mỗi dãy 12 lỗ khay để trắc định kháng thể trong huyết thanh. Sau khi xác định nồng độ kháng thể, các kháng huyết thanh được pha với dung dịch sinh lí để có nồng độ kháng thể có hiệu giá IHA  $4\log_2$  (kháng huyết thanh 16IHA) để làm nguyên liệu cho phản ứng SSIA.

## 2.9 Phản ứng xô lệch ngưng kết chuẩn gián tiếp (SSIA)

Được thực hiện với kháng huyết thanh IHA nêu trên và hồng cầu gắn virus Niucatxon tương tự qui trình đã mô tả trước đây với bệnh cúm gia cầm (Phạm Hồng Sơn, 2006) nhưng với một cải tiến

cho phù hợp với dịch chiết bệnh phẩm trong suốt 1:10 đã chuẩn bị sẵn. Trong đó, thay cho virut cúm A, kháng nguyên virut Niucatxon được gắn lên hồng cầu ngan đã Lasota hóa, formalin hóa và tannin hóa được sử dụng. Mỗi khay 96 lỗ cũng được xoay ngang để thực hiện được 11 mẫu kiểm (dịch phân hoặc dịch họng trong suốt) và một mẫu chuẩn với kháng huyết thanh 16IHA (IHA chuẩn với nước sinh lí thay cho dịch chiết mẫu làm căn cứ để đọc kết quả của mẫu). Trình tự thực hiện các bước được thể hiện ở bảng 2.

**Bảng 2. Các bước phản ứng trắc định suy giảm hiệu giá HI đặc hiệu virut Niucatxon (SSDHI)**

Nguyên liệu ở các bước	Lỗ khay của mỗi dãy số							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Nước sinh lí (µl)	50/-*	50	50	50	50	50	50	50
Dịch phân / họng (µl)	-/50**	-	-	-	-	-	-	-
Kháng huyết thanh thỏ đặc hiệu virut bệnh Niucatxon hiệu giá 16IHA (µl)	50	Trộn và chuyển 50 µl từ một lỗ sang lỗ kế tiếp bên phải. Hút bỏ 50 µl khỏi lỗ 8 sau khi trộn xong..						
Huyền dịch 1% hồng cầu gắn virut NDV Lasota (µl)	50	50	50	50	50	50	50	50
Đọc kết quả sau 15 - 120 phút khi ở dãy chuẩn thể hiện rõ 4log <sub>2</sub>								

*Ghi chú: \* 50 µl nước sinh lí ở lỗ đầu của chỉ dãy chuẩn; \*\* 50 µl dịch bệnh phẩm chỉ có ở các dãy kiểm. Mỗi khay 96 lỗ có 1 dãy làm đối chứng, 11 dãy (đều 8 lỗ) làm phản ứng kiểm tra mẫu.*

Đọc kết quả: Dãy chuẩn có ngưng kết ở các lỗ thứ nhất đến thứ tư, không ngưng kết ở các lỗ còn lại, và làm chuẩn để đọc các dãy mẫu kiểm. Có thể có trường hợp 3 lỗ đầu hoặc 5 lỗ đầu của dãy chuẩn có ngưng kết. Khi đó đường chuẩn sẽ là sau 3 hoặc 5 lỗ khay đầu tương ứng. Trong dãy kiểm, dịch chiết bệnh phẩm tiếp xúc trước với kháng huyết thanh, nếu có kháng nguyên Niucatxon sẽ làm giảm hiệu giá kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh nên biểu hiện lệch trái so với dãy chuẩn.

**Xử lí số liệu:** Tính tỉ lệ theo phần trăm dương tính của các chỉ tiêu có kháng nguyên, còn các tỉ số được xử lí so sánh sai khác bằng phân tích hàm phân bố  $\chi^2$  (Snedecor & Cochran, 1980).

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. So sánh kết quả của tổ hợp phản ứng ngưng kết hồng cầu trực tiếp với trắc định suy giảm kháng thể ngưng kết hồng cầu đặc hiệu với hai loại mẫu xét nghiệm phân và họng

Thí nghiệm của chúng tôi với những cặp mẫu phân và họng thu thập từ cùng một cá thể gà giúp đánh giá hai loại bệnh phẩm này đối với tổ hợp phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA) và suy giảm hiệu giá đặc hiệu ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) trong chẩn đoán bệnh. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

**Bảng 3. So sánh cặp kết quả trong phản ứng tổ hợp HA và trắc định suy giảm HI đặc hiệu (phản ứng HA-SSDHI) từ mẫu phân và họng**

Mẫu phân	Mẫu họng	Số cặp
Dương tính	Dương tính	28
Dương tính	Âm tính	9
Âm tính	Dương tính	0
Âm tính	Âm tính	129

Thực nghiệm:  $\chi^2 = 1,55$

Lý thuyết:  $\chi^2_{\alpha=0,05}=3,84$

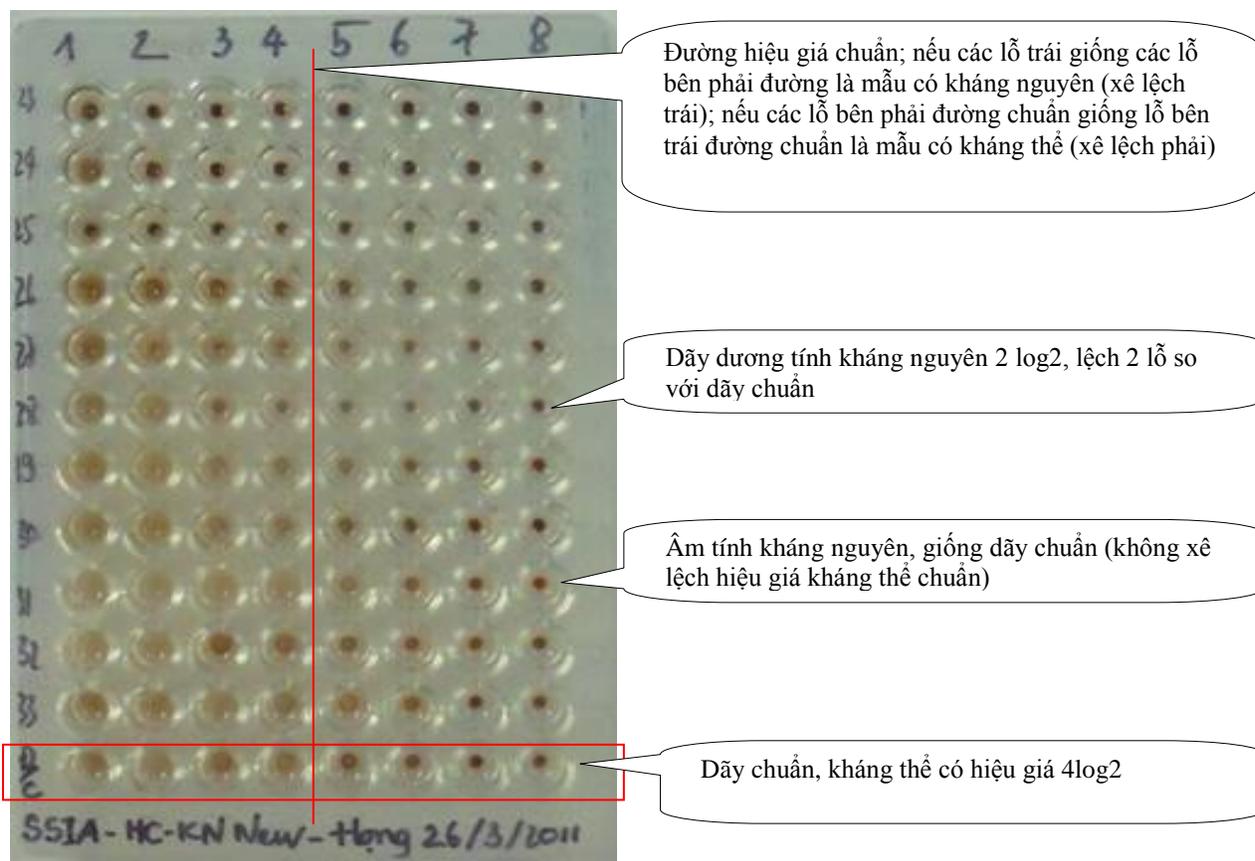
Kết luận: sai khác không có ý nghĩa giữa hai loại mẫu phân và họng

Việc sử dụng các loại bệnh phẩm khác nhau trong chẩn đoán có thể đưa lại kết quả khác nhau. Điều đó có thể do tính hướng (tropism) của virus đối với các tổ chức khác nhau. Tỷ lệ phát hiện kháng nguyên ở các loại bệnh phẩm được chúng tôi đánh giá so sánh giữa mẫu phân và mẫu họng theo hàm phân bố chuẩn như đã trình bày ở phương pháp xử lý số liệu. Từ kết quả xét nghiệm, tính được  $\chi^2=0,439$  trong khi với xác suất 95% ( $\alpha=0,05$ ) thì hàm chuẩn có giới hạn  $\chi^2_{\alpha=0,05}=3,84$ . Như vậy  $\chi^2 < \chi^2_{\alpha}$ , chứng tỏ sự sai khác của tỷ lệ nhiễm giữa mẫu phân và mẫu dịch họng không có ý nghĩa thống kê.

Qua kết quả trên chúng ta có thể thấy rằng, hai loại mẫu bệnh phẩm phân và họng đều có thể sử dụng làm mẫu để tiến hành phản ứng tổ hợp HA với trắc định suy giảm hiệu giá HI đặc hiệu nhằm đánh giá được sự lưu hành của virus Niucatxon trên đàn gà. Tuy không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê nhưng nhìn chung các mẫu phân cho kết quả dương tính cao hơn. Điều này cho thấy việc xét nghiệm chẩn đoán bệnh Niucatxon có thể thực hiện với các mẫu phân. Hơn nữa, nhờ sẵn có và dễ thu thập các mẫu phân gà là bệnh phẩm thích hợp cho xét nghiệm này.

### **3.2. So sánh hai loại mẫu xét nghiệm phân và họng trong phản ứng SSIA**

Với nguyên lý của phản ứng là nếu có sẵn kháng thể chuẩn kháng Niucatxon thì có thể thiết lập phản ứng ngưng kết gián tiếp ổn định với kháng nguyên IHA hồng cầu gắn virus Niucatxon (kháng nguyên IHA Niucatxon). Khi đó nếu cho kháng thể đặc hiệu có hiệu giá đã biết (làm chuẩn) tiếp xúc trước với bệnh phẩm chứa virus Niucatxon rồi sau đó cho tiếp xúc với kháng nguyên IHA thì hiệu giá ngưng kết của kháng thể chuẩn đó sẽ giảm do một lượng kháng thể đã tham gia phản ứng với kháng nguyên bệnh phẩm và trở nên không tự do để tham gia phản ứng với kháng nguyên IHA. Ngược lại, nếu trong bệnh phẩm có kháng thể với lượng đủ lớn thì kháng thể này sẽ cộng hợp với kháng thể chuẩn và làm tăng hiệu giá kháng thể khi tham gia phản ứng với kháng nguyên IHA. Do virus Niucatxon bài xuất ở đường hô hấp nhưng ở đó cũng có thể có kháng thể niêm mạc tham gia đáp ứng miễn dịch chống Niucatxon, nếu cho tiếp xúc với kháng thể chuẩn trước khi tiếp xúc với kháng nguyên IHA thì phản ứng IHA có thể bị ngăn trở hoặc được tăng cường nếu trong dịch bệnh phẩm chứa kháng nguyên hoặc kháng thể, tương ứng, tức là có sự xê lệch ngưng kết gián tiếp chuẩn.



**Hình 1. Hình ảnh kết quả xét nghiệm phát hiện kháng nguyên Newcastle bằng SSIA**  
 Trên mỗi khay 96 lỗ thực hiện được 11 phản ứng kiểm song song với 1 dãy chuẩn; các mẫu ở dãy 1, 2, 3 và 5 (tức #23, 24, 25 và 28) chứa kháng nguyên virus Niucatxon

Với những cặp mẫu phân và họng thu thập từ cùng mỗi gà nhằm so sánh hai loại bệnh phẩm này trong phản ứng, kết quả được trình bày ở bảng 4.

**Bảng 4. So sánh cặp kết quả của phản ứng SSIA từ mẫu phân và họng**

Mẫu phân	Mẫu họng	Số cặp
Dương tính	Dương tính	34
Dương tính	Âm tính	5
Âm tính	Dương tính	0
Âm tính	Âm tính	127

Thực nghiệm:  $\chi^2 = 0,439$   
 Lý thuyết:  $\chi^2_{\alpha=0,05} = 3,84$   
 Kết luận: sai khác không có ý nghĩa giữa hai loại mẫu phân và họng

Việc sử dụng các loại mẫu khác nhau trong chẩn đoán có thể đưa ra những kết quả khác nhau. Nhiều loại tổ chức có thể không chứa virus mục tiêu hoặc chứa ít hơn so với tổ chức khác. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thấy sự sai khác về tỉ lệ nhiễm của các mẫu phân và mẫu họng là không có ý nghĩa thống kê với xác suất 95% ( $\alpha=0,05$ ) do  $\chi^2=1,55 < \chi^2_{\alpha=0,05}=3,84$ , tuy các mẫu phân cho tỉ lệ dương tính cao hơn mẫu họng. Do đó, có thể sử dụng cả hai loại mẫu này để thực hiện phản ứng SSIA xác định khả năng lưu hành virus Niucatxon.

Với kết quả xét nghiệm trên đây, chúng tôi thấy SSIA là phản ứng hữu ích trong việc chẩn đoán bệnh Niucatxon ở gia cầm. Hơn nữa, mặc dù không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê trong

việc sử dụng hai mẫu bệnh phẩm là phân và dịch họng nhưng nhìn chung tỷ lệ phát hiện được kháng nguyên virus Niucaxon ở các mẫu phân cao hơn. Điều này có thể do niêm mạc họng chứa kháng thể đặc hiệu virus Niucaxon và kháng thể này đã làm giảm hiệu giá kháng nguyên virus. Vì vậy, phân là bệnh phẩm thích hợp cho xét nghiệm SSIA chẩn đoán phát hiện kháng nguyên virus Niucaxon.

### 3.3. So sánh hai phương pháp HA-SSDHI và SSIA

Cả hai phương pháp HA-SSDHI và SSIA đều có thể xác định được tỷ lệ nhiễm virus trên các mẫu bệnh phẩm. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

**Bảng 5. Tỷ lệ nhiễm virus đối với các mẫu phân và dịch họng gà ở các vùng thuộc tỉnh Thừa Thiên- Huế của hai phản ứng HA-SSDHI và SSIA**

Loại mẫu	Phương pháp	Tổng mẫu	Kết quả		Tỷ lệ % dương tính	Phân tích so sánh tỉ lệ dương tính
			KN+	KN -		
Phân	HA-SSDHI	166	37	129	22,29	$\chi^2=0,068;$ $\chi^2_{\alpha=0,05}=3,84$
	SSIA	166	39	127	23,49	
Họng	HA-SSDHI	166	28	138	16,87	$\chi^2=0,714;$ $\chi^2_{\alpha=0,05}=3,84$
	SSIA	166	34	132	20,48	

Phản ứng SSIA sử dụng phát hiện kháng nguyên virus Niucaxon có thể xác nhận lại tình hình lưu hành virus Niucaxon thông qua việc thực hiện tổ hợp phản ứng HA với trắc định suy giảm hiệu giá HI đặc hiệu.

Kết quả ở bảng 5 cho chúng ta thấy rằng tỷ lệ nhiễm virus qua hai phản ứng có sự khác nhau. Với phản ứng SSIA khi xét nghiệm trên 166 mẫu phân và 166 mẫu họng thì ta có số mẫu nhiễm tương ứng là 39 mẫu và 34 mẫu, tỉ lệ dương tính ở mẫu phân là 23,49%, còn ở mẫu họng là 20,48%, đều cao hơn so với phản ứng tổ hợp HA-SSDHI. So sánh hai tỉ lệ nhiễm giữa mẫu phân thực hiện bằng phản ứng HA-SSDHI và mẫu phân thực hiện bằng phản ứng SSIA, với giả thiết hàm phân phối chuẩn, ta tính được  $\chi^2=0,068 < \chi^2_{\alpha=0,05}=3,84$ ; tương tự tỷ lệ nhiễm trên mẫu họng với các phản ứng HA-SSDHI và SSIA cũng tính được  $\chi^2=0,714$ . Như vậy, với cả hai trường hợp đều không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa hai phương pháp HA-SSDHI và SSIA khi xét nghiệm virus Niucaxon trong các mẫu phân cũng như mẫu họng. Do đó trong quá trình nghiên cứu, có thể tùy theo điều kiện thực tế mà chọn thực hiện phương pháp thuận lợi.

### 4. Khả năng sử dụng các phản ứng HA trực tiếp, trắc định suy giảm HI đặc hiệu và phản ứng SSIA trong phát hiện kháng nguyên virus Niucaxon với phân là mẫu kiểm

Những kết quả xét nghiệm thu được trên đây cho thấy phân là bệnh phẩm thích hợp trong các xét nghiệm phát hiện kháng nguyên virus Niucaxon nhờ phương pháp SSIA cũng như tổ hợp phương pháp HA trực tiếp với trắc định suy giảm hiệu giá HI đặc hiệu (hay HA-SSDHI). Để có cơ sở cho việc áp dụng phương pháp này với mẫu phân, chúng tôi lập bảng 6 dưới đây để so sánh kiểm chứng các phương pháp.

**Bảng 6. So sánh các phương pháp HA trực tiếp, SSDHI và SSIA trong phát hiện kháng nguyên Niucaxon với phản ứng HA trực tiếp với các mẫu phân gà**

	SSDHI+	SSDHI-	Σ hàng	SSIA+	SSIA-	Σ hàng
HA+	37	11	48	39	9	48
HA-	1	117	118	0	118	118
Σ cột	38	128	166	39	127	166

Bảng 6 cho thấy có 1 trường hợp dương tính với SSDHI từ mẫu phân không cho phản ứng ngưng kết trực tiếp (HA-) trong số 38 mẫu SSDHI dương tính, điều này chứng tỏ độ nhạy của SSDHI cao hơn HA, tức là nếu sử dụng riêng SSDHI thì kết quả xét nghiệm dương tính cao hơn tổ hợp HA-SSDHI. Ngược lại việc 11 mẫu dương tính với HA lại cho phản ứng âm tính với phản ứng SSDHI chứng tỏ một số gia cầm cảm nhiễm virus hay nhân tố nào khác cũng gây ngưng kết hồng cầu trực tiếp. Bên cạnh đó, nhờ có SSIA có thể phát hiện được một số trường hợp không phát hiện được bởi SSDHI.

Như vậy, SSIA có ưu điểm độ nhạy cao hơn tổ hợp HA-SSDHI cũng như phương pháp SSDHI riêng biệt (không sàng lọc trước bằng HA). Nhờ gắn kháng nguyên virus nhất định trên hồng cầu nên SSIA có tính đặc hiệu mà không cần phải sử dụng kháng thể hay kháng huyết thanh đặc hiệu. Đây là ưu điểm lớn của SSIA do có thể sử dụng huyết thanh đa giá thu được từ gia cầm giết mổ. Hơn nữa, việc đọc kết quả SSIA hầu như không phụ thuộc vào thời gian, khác với HA cũng như SSDHI là những phản ứng trong đó mất tính ngưng kết hồng cầu do tác dụng neuraminidase của virus Niucatxon (Cottral, 1978). Tuy nhiên, việc xử lý hồng cầu trong SSIA phức tạp hơn.

#### IV. KẾT LUẬN

Các phương pháp tổ hợp ngưng kết hồng cầu trực tiếp với trắc định suy giảm hiệu giá ngăn trở ngưng kết hồng cầu đặc hiệu hay trắc định xê lệch ngăn trở ngưng kết hồng cầu trực tiếp chuẩn (HA-SSDHI) và phản ứng trắc định xê lệch ngưng kết gián tiếp chuẩn (SSIA) áp dụng với mẫu kiểm là dịch họng và dịch phân chiết xuất bằng quay li tâm cao tốc có thể giúp phát hiện kháng nguyên virus Niucatxon trong các mẫu đó. Hơn nữa các kết quả xét nghiệm với các phương pháp đó không sai khác có ý nghĩa thống kê. Vì vậy, tùy điều kiện có thể vận dụng một trong các phương pháp đó. Mẫu phân thích hợp đối với những phương pháp trắc định này.

Nếu có đủ kháng thể (kháng huyết thanh) đặc hiệu virus Niucatxon thì việc áp dụng phương pháp trắc định suy giảm hiệu giá kháng thể chuẩn không qua bước sàng lọc sẽ cho kết quả với độ nhạy cao hơn.

SSIA có ưu điểm có thể đọc kết quả sau thời gian kéo dài, khác với phương pháp HA-SSDHI là phương pháp phải theo dõi thường xuyên kết quả xét nghiệm để tránh tác động của phản ứng phân rã ngưng kết hồng cầu đến việc nhận định kết quả. Tuy nhiên xử lý kháng nguyên hồng cầu trong SSIA phức tạp hơn.

Một tỷ lệ khá lớn (khoảng 20%) gà ở Thừa Thiên-Huế mang kháng nguyên virus Niucatxon. Ngoài ra, còn có một số khác mang nhân tố khác gây ngưng kết hồng cầu.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Hồng Sơn, 2004. 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.
2. 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.
3. Boyden S. V., 1951. The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent haemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Med.* 93: 107.
4. Cottral G. E., 1978. *Manual of standardized methods for veterinary immunology*. Cornell University Press, London, 69-74.
5. Hirst G. K., 1941. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science* 94: 22-23.
6. Snedecor G. W. & Cochran W. G. (eds.), 1980. *Statistical methods, 7th ed.* Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 121-124, 470.