

Bộ giáo dục và đào tạo
Tr- ờng đại học nông nghiệp i

D- ình quân

khảo sát đáp ứng miễn dịch
Của ngan, vịt Với vacxin cúm gia cầm
trên thực địa

luận văn thạc sĩ nông nghiệp

Chuyên ngành: Thú y

Mã số : 60.62.50

Ng- ười h- ớng dẫn khoa học : TS. Nguyễn Tiến Dũng

Hà nội - 2006

1. Mở đầu

Bệnh cúm gia cầm do virus có độc lực cao (High Pathogenicity Avian Influenza - HPAI) là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, có tốc độ lây lan rất nhanh với tỉ lệ gây chết cao trong đàn gia cầm nhiễm bệnh.

Virus gây bệnh thuộc họ Orthomyxoviridae (trích dẫn theo B. C. Easterday - 71) là loại virus có cấu trúc sợi đơn ARN có vỏ bọc. Virus đ-ợc chia thành các typ A, B, C dựa trên các kháng nguyên nucleocapsit hoặc matrix protein. Virus cúm typ A lại đ-ợc chia thành các subtype tùy theo các loại kháng nguyên bề mặt của chúng là Haemagglutinin (HA) và Neuraminidase (NA). Cho đến nay ng-ời ta đã xác định đ-ợc 16 kháng nguyên HA (ký hiệu từ H1 đến H16) và 9 kháng nguyên NA (ký hiệu từ N1 đến N9) [7] .

Các virus cúm typ A có thể gây bệnh cho các loài động vật nh- chim, lợn, ngựa, chôn[85], hải cẩu, cá voi[76] và có thể gây bệnh cho cả con ng-ời [1], [6], [7], [74], [75]. Virus gây bệnh ở đ-ờng hô hấp, đ-ờng tiêu hoá và hệ thống thần kinh ở nhiều loài chim[75]. Tùy theo độc lực của chủng virus gây bệnh, ký chủ và điều kiện ngoại cảnh mà biểu hiện bệnh lý ở gia cầm mắc bệnh có sự thay đổi khác nhau[19]. Các chủng virus có độc lực cao th-ờng gây bệnh trầm trọng với tỷ lệ chết cao[15], [75], [102]. Do tính chất nguy hiểm của bệnh, Tổ chức Dịch tễ thế giới (Office International des Epizooties OIE) đã xếp bệnh cúm gia cầm vào bảng A - Bảng danh mục các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm nhất[65].

ở n-ớc ta, ca bệnh đ-ợc thông báo đầu tiên xảy ra tại một trại gà giống của công ty CP (xã Thuỷ Xuân Tiên - Ch-ơng Mỹ - Hà Tây) cuối tháng 12/2003[6]. Chỉ trong một thời gian ngắn sau đó, bệnh đã bùng phát ở hầu khắp các vùng miền trên cả n-ớc [6].

Thực tế cho thấy dù đã áp dụng nhiều biện pháp tích cực nh- : Tiêu huỷ

đàn gia cầm bị bệnh và các đàn xung quanh, vệ sinh tiêu độc, hạn chế di chuyển, kiểm soát giết mổ... nh- ng chúng ta vẫn ch- a hoàn toàn khống chế đ- ọc dịch bệnh. Theo kinh nghiệm của một số n- ớc nh- Italy, Mehico, Trung Quốc[17], [90] thì việc tiêm phòng là biện pháp hỗ trợ tích cực để ngăn chặn, khống chế đi đến thanh toán dịch cúm gia cầm, đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm, bảo vệ tính mạng và sức khoẻ con ng- ời.

Theo các tài liệu đã xuất bản ([5], [8], [17], [90], [96], [97]) hầu hết các nghiên cứu về vaccin cúm gia cầm và việc sử dụng chúng ngoài thực địa đều tập trung vào gà và gà tây bởi vì tỷ lệ chết của những đàn gia cầm này cao hơn và chúng bài thải virus cúm gia cầm HPAI với số l- ợng lớn vào môi tr- ờng. Các dữ liệu về kết quả tiêm phòng cho ngan, vịt hầu nh- ch- a đ- ọc đề cập đến.

Năm 2005 chúng ta đã nhập khẩu vaccin cúm gia cầm vô hoạt nhũ dầu chủng H5N1 và H5N2 của Trung Quốc và Hà Lan để tiêm phòng cho đàn gia cầm, trong đó vaccin H5N2 đ- ọc sử dụng cho gà, vaccin H5N1 đ- ọc sử dụng cho vịt[4]. Kết quả thử nghiệm vaccin H5N2 trên gà đ- ể rất khả quan: 100% số gà đ- ọc tiêm vaccin sản sinh kháng thể kháng virus H5 với hàm l- ợng đủ bảo hộ chống bệnh ngay từ tuần thứ 3 sau tiêm mũi vaccin đầu tiên. Đến 16 tuần sau tiêm, hiệu giá kháng thể vẫn ở trên mức bảo hộ[12].

Gà đ- ọc tiêm vaccin H5N2 thu đ- ọc kết quả tốt nh- vậy, còn ngan, vịt thì sao. Chúng có khả năng đáp ứng miễn dịch với vaccin H5N1 hay không. Nếu có thì mức độ đáp ứng ra sao, diễn biến nh- thế nào. Còn rất ít các thông báo khoa học về vấn đề này. Để giải đáp vấn đề đó chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: “*Khảo sát đáp ứng miễn dịch của ngan, vịt với vaccin cúm gia cầm trên thực địa*”.

2. Tổng quan tài liệu

2.1. Giới thiệu chung về bệnh cúm gia cầm

2.1.1. Lịch sử bệnh cúm gia cầm

Bệnh cúm gia cầm (Avian Influenza - AI) đ-ợc Porroncino (trích dẫn theo B. C. Easterday - 71) mô tả lần đầu tiên ở Italy vào năm 1878 với tên gọi là bệnh “Dịch tả gia cầm” (Fowl plague). Đến năm 1901 Centanni và Savunozzi (trích dẫn theo Stubbs - 94) đã xác định đ-ợc yếu tố gây bệnh dịch tả gà là căn nguyên siêu nhỏ có khả năng qua lọc. Tuy nhiên, phải đến năm 1955 Schafer [91] mới xác định đ-ợc chính xác nguyên nhân gây bệnh dịch tả gà là virus cúm typ A thông qua kháng nguyên bề mặt H7N1 và H7N7 [1], [6], [7], [102].

Bệnh cũng đ-ợc Beard C.W [67] mô tả kỹ qua đợt dịch cúm khá lớn trên gà tây ở Mỹ vào năm 1971. Các năm tiếp theo, bệnh đ-ợc phát hiện ở Nam Mỹ, Bắc Mỹ rồi Nam Phi, Trung Cận Đông, Châu Âu, Liên hiệp Anh và Liên Xô cũ[6], [7]. Theo thống kê của Alexander[64], [65], [66], có thể kể đến các ổ dịch cúm gia cầm lớn: ở Australia (1975 - 1985), Anh (1979), Mỹ (1983 -1984), Ireland (1983 - 1984), Mexico (1994). Đặc biệt ở Hong Kong (1997) virus không chỉ gây bệnh cho gia cầm mà còn lây nhiễm và gây tử vong cho ng-ời[15], [16].

Dịch cúm gia cầm liên tục bùng nổ khắp các châu lục trên thế giới, đã thúc đẩy các nhà khoa học nghiên cứu và bàn luận về bệnh cúm gia cầm. Hội thảo chuyên đề về bệnh cúm gia cầm lần đầu tiên đ-ợc tổ chức tại Beltsville MD vào năm 1981, lần thứ 2 tại Athen năm 1986, lần 3 tại Madison WI vào 1992, lần thứ 4 tại Athen năm 1997 và lần thứ 5 cũng tại Athen năm 2003 [99]. Từ đó đến nay, trong các hội thảo về bệnh cúm gia cầm dịch tễ của bệnh luôn là một trong những nội dung đ-ợc coi trọng[99].

Virus gây bệnh đ-ợc phát hiện trên khắp các châu lục, trong đó Mỹ và Đài Loan phân lập đ-ợc nhiều chủng nhất (Mỹ phân lập đ-ợc 12 kháng nguyên H bao gồm H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11 và H13 cùng với 8 kháng nguyên N: N1, N2, N3, N4, N6, N7, N8, N9; trong khi ở Đài Loan là H3N1, H3N2, H3N6, H3N8, H4N1, H4N2, H4N6, H6N1)[99]. Virus có mặt ở hầu hết các loài lông vũ từ gia cầm đến các loài hoang dã, động vật có vú nh- cá voi[76], hải cẩu, hổ, chồn[85], cây h-ơng [62] và cả con ng-ời[1], [6], [7], [74], [75].

2.1.2. Bệnh cúm gia cầm trên thế giới

Bệnh cúm gia cầm đã xảy ra ở nhiều nơi trên thế giới[16]. Vụ dịch xảy ra và đ-ợc ghi nhận lần đầu ở gia cầm năm 1878 với tỷ lệ chết cao đ-ợc gọi là bệnh “Dịch tả gia cầm”, đến năm 1901 Centanni và Savunozzi (trích dẫn theo Stubbs - 94) đã xác định đ-ợc nguyên nhân gây ra bệnh là virus. Tuy nhiên, phải đến năm 1955 ng-ời ta mới chứng minh đ-ợc virus gây bệnh dịch tả gà là virus cúm type A (H7N1 và H7N7)[6], [71], [99].

Trong những năm 20 của thế kỷ tr-ớc, bệnh đã xuất hiện tại Mỹ, Châu Phi và vùng Viễn Đông. Năm 1959 bệnh xảy ra trên đàn gà ở Scotland do virus cúm A H5[6], [99]. Các nhà khoa học đã phát hiện virus gây bệnh cúm ký sinh ở nhiều loài chim hoang dã và gia cầm nuôi ở những vùng khác nhau trên thế giới[99]. Các tác giả cho biết bệnh dịch nghiêm trọng nhất xảy ra đối với gia cầm là những chủng gây bệnh có độc lực cao thuộc subtyp H5 và H7, nh- ở Scotland năm 1959 là H5N1, ở Mỹ năm 1983-1984 là H5N2[99].

Năm 1963, virus cúm type A đ-ợc phân lập từ gà tây ở Bắc Mỹ do loài thúy cầm di trú dẫn nhập virus vào đàn gà. Cuối thập kỷ 60, subtyp H1N1 thấy ở lợn và có liên quan tới sự tái tổ hợp gen của virus cúm gia cầm [99].

Từ cuối năm 2003 bệnh cúm gia cầm đã xảy ra với quy mô lớn và tốc

độ bùng phát rất nhanh ở các n-ớc châu á. Đến cuối tháng 2/2004 đã có 11 n-ớc và vùng lãnh thổ công bố dịch cúm gia cầm do virus H5N1 gây ra, bao gồm: Hàn Quốc, Nhật Bản, Thái Lan, Campuchia, Lào, Indonesia, Malaysia, Trung Quốc, Hong Kong và Việt Nam[2], [6], [9], [13], [15].

Ngoài các ổ dịch do virus cúm H5N1 nêu trên, còn có 7 n-ớc và vùng lãnh thổ khác có các ổ dịch cúm gia cầm do các chủng khác là Pakistan (H7N3 và H9N2), Canada (H7N3), Mỹ (H7N2), Nam Phi (H6 và H5N2), Ai Cập (H10N7) và Triều Tiên (H7) [18].

Giữa năm 2005 dịch cúm gia cầm do H5N1 bắt đầu xuất hiện tại Kazakhstan [55], Nga [57] rồi nhanh chóng lan rộng sang các n-ớc khác ở khu vực châu Âu nh- Rumania [21], Hy Lạp [30], Thổ Nhĩ Kỳ [34], Azerbaijan [38], rồi tràn sang Châu Phi [40], các n-ớc khác thuộc châu á nh- ở vùng Vịnh [35], Trung Quốc [36] và Iraq [39]. Tính đến ngày 02 tháng 08 năm 2006 chủng virus độc lực cao H5N1 đã có mặt tại 51 quốc gia và vùng lãnh thổ trên hầu khắp các châu lục, tập trung chủ yếu ở châu á và châu Âu[89].

Ngoài gây thiệt hại về kinh tế, đến 17/08/2006 đã có 140 nạn nhân tại các quốc gia và vùng lãnh thổ là Azerbaijan, Campuchia, Trung Quốc, Djibouti, Ai Cập, Indonesia, Iraq, Thái Lan, Thổ Nhĩ Kỳ và Việt Nam đã đ-ợc xác nhận chính thức tử vong do virus cúm A H5N1 [104] trong đó Indonesia có số ng-ời chết nhiều nhất (45 ng-ời), tiếp đó là Việt Nam (42 nạn nhân).

2.1.3. Tóm tắt tình hình bệnh cúm gia cầm ở Việt Nam

Dịch cúm gia cầm ở n-ớc ta đ-ợc thông báo lần đầu tiên vào cuối tháng 12/2003[6] và đến nay đã đ-ợc ghi nhận xảy ra thành 4 đợt chính nh- sau:

* *Đợt dịch thứ nhất* từ tháng 12/2003 đến 30/3/2004. Cuối tháng 12 năm 2003, dịch cúm gia cầm thể độc lực cao với tác nhân gây bệnh là virus cúm gia cầm

H5N1 xảy ra ở Việt Nam. Đây là lần đầu tiên bệnh đ-ợc ghi nhận tại Việt Nam. Đặc điểm của đợt dịch thứ nhất này là dịch lây lan một cách nhanh chóng với nhiều ổ bệnh xuất hiện cùng một lúc ở nhiều địa ph- ơng khác nhau đã gây thiệt hại lớn cho ng- ời chăn nuôi gia cầm. Ngay cả các trại gia cầm nằm ở những vùng không có dịch cũng gặp phải những khó khăn trong việc duy trì đàn gia cầm dẫn đến việc phải tiêu hủy. Đợt dịch này đã làm cho gia cầm của 2574 xã/ph- ờng thuộc 381 huyện/thị trấn của 57/61 tỉnh/thành phố của Việt Nam bị mắc bệnh [6]. Tổng số gia cầm bị chết do bệnh và bị tiêu hủy là hơn 43,9 triệu con chiếm 16,8% tổng số gia cầm của cả n- ớc. Trong đó, gà là 30,4 triệu con và thủy cầm là 13,5 triệu con. Ngoài ra còn có 14,76 triệu con chim cú và các loại chim khác bị chết và bị tiêu hủy. Theo thống kê cho đến cuối đợt dịch, đồng bằng sông Hồng và đồng bằng sông Cửu Long là những khu vực có tỷ lệ số xã có gia cầm bị mắc bệnh cao nhất[6].

* Đợt dịch thứ hai từ tháng 4 đến tháng 11 năm 2004. Các ổ dịch cúm gia cầm thể độc lực cao đã tái xuất hiện vào giữa tháng 4 năm 2004 ở một số tỉnh thuộc đồng bằng sông Cửu Long. Trong đợt dịch này các ổ bệnh chủ yếu xuất hiện ở các hộ chăn nuôi nhỏ lẻ và hầu nh- không có trại chăn nuôi qui mô lớn bị nhiễm bệnh. Dịch có khuynh h- ớng xuất hiện ở những vùng có chăn nuôi nhiều thủy cầm. Bệnh xuất hiện ở 46 xã ph- ờng tại 32 quận, huyện, thị xã thuộc 17 tỉnh. Thời gian cao điểm nhất là tháng 7 sau đó giảm dần, đến tháng 11 cả n- ớc chỉ có 1 điểm phát dịch. Tổng số gia cầm bị tiêu hủy trong thời gian này là 84.000 con, trong đó có 56.000 gà, hơn 8000 vịt[2]

* Đợt dịch thứ 3 từ tháng 12/2004 đến 6/2005. Bệnh cúm gia cầm thể độc lực cao đã xuất hiện ở 670 xã tại 182 huyện thuộc 36 tỉnh thành phố (15 tỉnh phía Bắc, 21 tỉnh phía Nam). Thời điểm xuất hiện các ổ dịch nhiều nhất là vào tháng 1/2005 với 143 ổ dịch xảy ra trên 31 tỉnh thành. Trong đợt dịch này 460320 con gà, hơn 825.000 vịt ngan và 551.000 chim cú đã chết hoặc bị tiêu hủy[18].

* Đợt dịch thứ 4 từ tháng 10/2005 đến 1/2006. Dịch tái phát ở một số tỉnh thành trong cả nước [49], [48]. Để ngăn ngừa đại dịch do H5N1 gây ra, nhiều địa phương phải áp dụng các biện pháp quyết liệt như đề nghị phải tiêu diệt toàn bộ thủy cầm thả rông [24], đóng cửa rừng [56], đóng cửa các vườn chim [22], không nuôi gia cầm, chim cảnh trong nội thành [26], [41]. Trong nỗ lực khống chế dịch cúm gia cầm [50] Bộ NN&PTNT đã ban hành lệnh cấm áp mới thủy cầm đến hết tháng 2 năm 2007 [52].

Thiệt hại do bệnh cúm gây ra là rất lớn, chỉ tính riêng nhu cầu chi cho y tế trong việc chuẩn bị đối phó với trường hợp đại dịch xảy ra do lây từ người sang người đã cần khoảng 17000 tỷ đồng [29]. Nếu dịch xảy ra thì nước ta tính có tới 150 triệu người có thể tử vong [33]. Theo báo cáo của Ban chỉ đạo Quốc gia phòng chống dịch cúm gia cầm, thiệt hại trực tiếp của các đợt dịch ở Việt Nam lên tới 3500 tỷ đồng. Trong đó thiệt hại do gia cầm chết và tiêu hủy là hơn 1300 tỷ đồng. Dịch cúm gia cầm đã làm giảm tỷ lệ tăng trưởng GDP quốc gia đến hơn 5%, ngoài ra còn gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến các hoạt động kinh tế, xã hội đặc biệt là sức khỏe cộng đồng.

Khi phân tích trình tự nucleotide 8 đoạn RNA của 9 chủng virus cúm H5N1 được phân lập từ người, chim cút, gà và vịt trong đợt dịch cuối 2003 đầu 2004 và lập cây phả hệ của chúng, tác giả Nguyễn Tiến Dũng cùng các cộng sự [9] đã kết luận rằng:

- Các chủng virus cúm H5N1 lưu hành ở Việt Nam đều giống nhau và có cùng nguồn gốc.
- Mặc dù chưa biết nguồn gốc của 2 đoạn M và NP, các đoạn gen của virus đều đã được phát hiện và công bố ở Trung Quốc trước khi xảy ra dịch ở nước ta.

Như vậy, có thể kết luận rằng virus cúm H5N1 ở Việt Nam có nguồn

gốc từ Trung Quốc và virus l- u hành ở n- ớc ta chỉ có một loại xuất phát từ một ổ dịch ban đầu[9]. Việc virus này đ- ợc đ- a vào Việt Nam theo con đ- ờng nào ch- a đ- ợc xác định chính xác nh- ng có giả thuyết cho rằng việc nhập lậu gia cầm bị nhiễm từ n- ớc ngoài vào n- ớc ta là một trong các nguyên nhân gây ra dịch. Ngoài ra, với đặc điểm khí hậu ẩm áp và có nhiều sông ngòi, các loài chim và thủy cầm di c- th- ờng xuyên ra vào Việt Nam và chúng cũng có thể là tác nhân truyền bệnh cơ giới[9].

2.2. Virus học bệnh cúm gia cầm

2.2.1. Cấu trúc chung của virus

Căn bệnh do virus cúm gia cầm thuộc họ Orthomyxoviridae (trích dẫn theo B. C. Easterday - 71) là virus ARN phân mảnh có khả năng đột biến rất mạnh.

2.2.1.1. Hình thái và cấu trúc

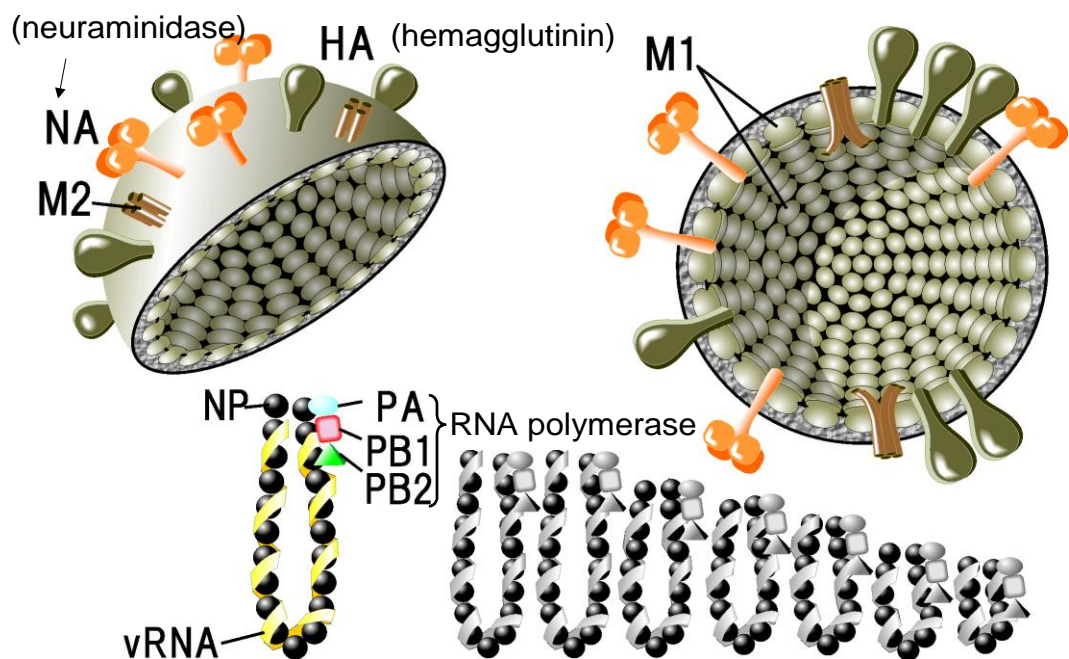
Hạt virus (virion) có cấu trúc hình khối hoặc đôi khi có dạng hình khối kéo dài, đ- ờng kính 80 - 100 nm (trích dẫn theo B. C. Easterday - 71).

Cấu trúc di truyền của virus thuộc loại ARN sợi âm ở dạng đơn bao gồm 8 đoạn khác nhau (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS) mã hoá cho 10 loại protein khác nhau: PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1 và NS2 (trích dẫn theo B. C. Easterday - 71). Đoạn ARN có trọng l- ợng nhỏ nhất mã hoá cho 2 loại protein không cấu trúc là NS1 và NS2, chúng dễ dàng tách đ- ợc ở các tế bào bị nhiễm. Các đầu 5' và 3' của hệ gen chứa những chuỗi nucleotit bảo tồn về thành phần có chức năng là promotor khởi động sao chép của hệ gen virus. Tất cả 8 đoạn của sợi ARN có thể tách và phân biệt dễ dàng qua ph- ơng pháp điện di.

- Phân đoạn 1 - 3 mã hóa cho protein PB1, PB2 và PA. Đây là các protein có chức năng là enzym polymerase.



Hình 2.1. Virus cúm nhìn d-ới kính hiển vi điện tử [32]



Hình 2.2. Mô hình cấu trúc của virus cúm A H5N1 [105]

- Phân đoạn 4 mã hóa cho protein Hemagglutinin (HA). Phân tử l-ợng của đoạn này thay đổi từ 67×10^3 (không đ-ợc glycosyl hóa) đến 77×10^3 (khi đ-ợc glycosyl hóa).

- Phân đoạn 5 mã hóa cho protein nucleoprotein (NP).
- Phân đoạn 6 chịu trách nhiệm tổng hợp enzym Neuraminidase (NA).
- Phân đoạn 7 mã hóa cho 2 tiểu phần protein Matrix (M1 và M2).
- Phân đoạn 8 mã hóa cho 2 tiểu phần protein không cấu trúc NS1 và NS2.

Đây là đoạn có độ dài ổn định nhất trong các subtyp của virus cúm A.

Các phân đoạn này đ-ợc nối với nhau nhờ nucleocapsit có cấu trúc đối xứng xoắn, tạo vòm ở giới hạn cuối của mỗi phân đoạn, và liên kết với nhau qua các cầu nối peptit. Bề mặt ngoài màng phủ bằng 2 hệ thống Protein (HA và NA) có các phản ứng ng- ng kết hồng cầu và phản ứng trung hoà đ-ợc kết hợp với nhau một cách riêng biệt [32].

Dựa trên cơ sở xác định đặc tính glycoprotein bề mặt, yếu tố ng- ng kết hồng cầu (Haemagglutinin viết tắt là HA) và men Neuraminidase (viết tắt là NA) là những kháng nguyên có vai trò quan trọng trong miễn dịch bảo hộ và có tính đa dạng cao mà virus cúm type A đ-ợc định subtyp. Đến nay, virus cúm type A chia thành 16 subtyp trên cơ sở kháng nguyên ng- ng kết HA (H_1 - H_{16}) và 9 kháng nguyên NA (N_1 - N_9). Trong mỗi một subtyp, lại có nhiều chủng virus khác nhau trong đó các virus cúm l- u hành ở ng- ời đã đ-ợc biết gồm 3 subtyp HA (H1, H2 và H3) và 2 subtyp NA (N1 và N2). Đối với gia cầm, ng- ời ta cho rằng các subtyp H5 và H7 của virus cúm là có độc lực cao mặc dầu có rất nhiều chủng cũng thuộc hai subtyp này phân lập từ chim có độc lực thấp. Các chủng virus gây bệnh trầm trọng trên gà đ-ợc gọi là các chủng gây bệnh cúm gia cầm thể độc lực cao (HPAI) với tỷ lệ chết có thể lên tới 100%.

2.2.1.2. Thành phần hoá học của virus

RNA của virus chiếm 0,8 - 1,1%; protein: 70 - 75%; lipit: 20 - 24% và 5 - 8% hidrocarbon[69]. Lipit tập trung ở màng virus và chủ yếu là lipit có gốc phospho, số còn lại là Cholesterol, glucolipit và một ít hidrocarbon gồm các loại men galactose, manose, ribose, fructose, glucosamin[84].

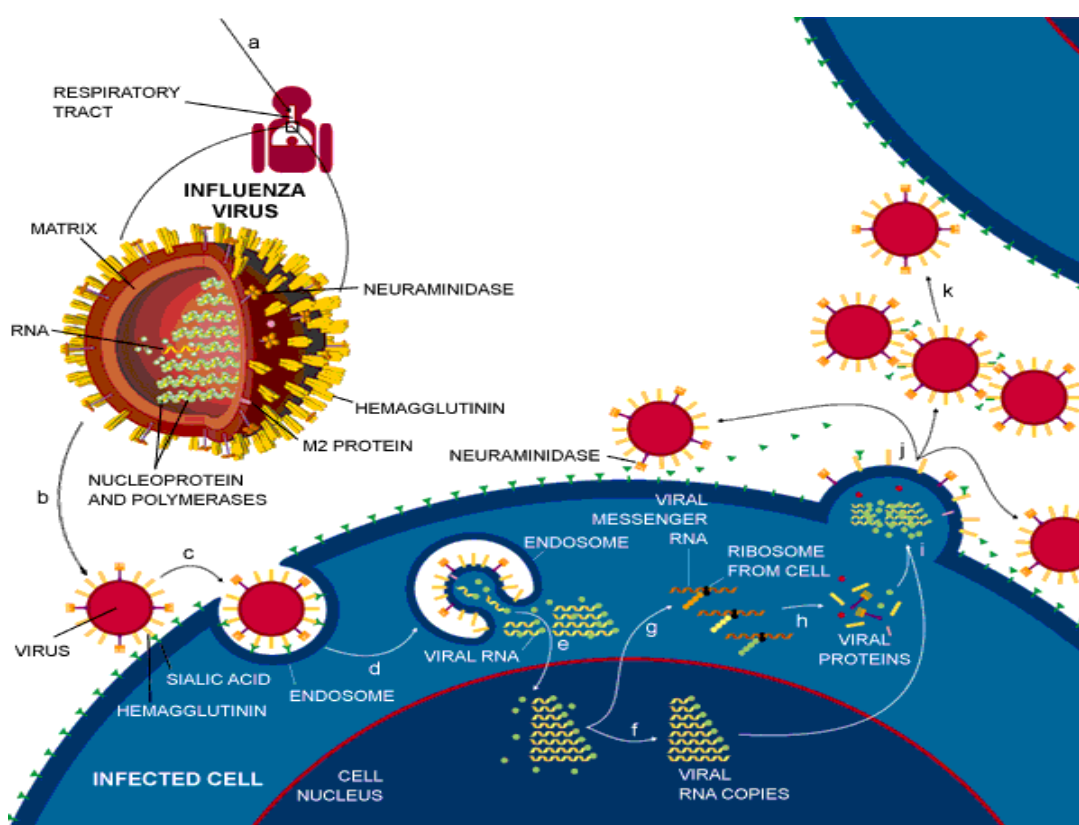
2.2.2. Quá trình nhân lên

Kingsbury [82], Fener và cộng sự [72] mô tả quá trình sinh sản của virus đ-ợc tóm tắt nh- sau: Virus đ-ợc hấp thụ vào bề mặt tế bào nhờ các thụ thể có bản chất là glycoprotein chứa axit sialic. Virus xâm nhập vào tế bào nhờ chức năng của protein HA thông qua hiện t-ợng ẩm bào (endocytosis) qua cơ chế trung gian tiếp hợp thụ thể. Thụ thể liên kết tế bào của virus cúm có bản chất là axit sialic cắm sâu vào glycoprotein hay glycolipit của vỏ virus. Trong khoang ẩm bào, khi nồng độ PH đ-ợc điều hòa để giảm xuống mức thấp sẽ xảy ra quá trình hợp nhất màng tế bào và virus, sự hợp nhất này phụ thuộc vào sự cắt rời protein HA nhờ enzym peptidase và enzym protease của tế bào. Lúc này nucleocapsit của virus đi vào trong nguyên sinh chất rồi vào trong nhân tế bào, chuẩn bị thực hiện quá trình tổng hợp ARN nguyên liệu hệ gen cho các virion mới.

Hệ thống enzym sao chép của virus ngay lập tức tạo nên các ARN thông tin. Các phân đoạn ARN hệ gen đ-ợc mũ hóa ở 10- 13 nucleotit đầu 5' với nguyên liệu mũ hóa lấy từ ARN tế bào, nhờ vào hoạt tính enzym PB2 của virus. ARN thông tin của virus sao chép trong nhân đ-ợc chuyển vận ra nguyên sinh chất, đ-ợc riboxom trợ giúp tổng hợp nên protein cấu trúc và protein không cấu trúc. Protein H, N, M2, ở lại trong nguyên sinh chất, đ-ợc vận chuyển xuyên qua hệ thống võng mạc nội mô (RE) và hệ golgi sau đó đ-ợc cắm lên màng tế bào nhiễm. Protein NS1, NP, M1 đ-ợc chuyển vận vào nhân để bao bọc đệm lấy nguyên liệu ARN hệ gen mới đ-ợc tổng hợp [82].

Song song với quá trình sao chép ARN thông tin và tổng hợp protein cấu trúc, protein không cấu trúc, virus tiến hành tổng hợp nguyên liệu di truyền là các sợi ARN mới. Từ sợi ARN âm đơn của virus ban đầu, một sợi d-ợng ARN toàn vẹn đ-ợc tạo ra theo cơ chế bổ sung, sợi d-ợng mới này lại làm khuôn để tổng hợp nên sợi âm (là nguyên liệu di truyền của virus). Các sợi âm ARN mới, một số vừa làm nguyên liệu để lắp ráp virion mới, số khác

lại làm khuôn để tổng hợp ARN theo cơ chế nh- với sợi ARN của virus đầu tiên. Các sợi ARN của hệ gen đ- ợc tạo ra là những sợi hoàn chỉnh về độ dài và đ- ợc các protein đệm (NS1, M1, NP) bao gói tạo nên ribonucleocapsit (nucleoriboprotein) ngay trong nhân tế bào nhiễm, sau đó đ- ợc chuyển vận ra nguyên sinh chất rồi đ- ợc chuyển vận đến vị trí màng tế bào có sự biến đổi đặc hiệu với virus.



Hình 2.3. Sơ đồ mô tả sự nhân lên của virus cúm [100]

Sự kết hợp cuối cùng của tổ hợp nucleoriboprotein với các protein cấu trúc (HA, NA, M2) tạo nên các hạt virus hoàn chỉnh mới và đ- ợc giải phóng ra khỏi tế bào nhiễm theo hình thức nảy chồi[82].

Thực sự chúng ta vẫn ch- a hiểu biết rõ ràng virus cúm giết chết tế bào vật chủ nh- thế nào. Theo Hinshaw[77] thì các tế bào trong môi tr- ờng nuôi cấy bị phá huỷ theo ph- ơng thức apoptosis.

2.2.3. Tính đa dạng kháng nguyên

Virus cúm type A có đặc điểm đặc trưng là chúng thường có đột biến gen dẫn đến sự biến đổi liên tục về tính kháng nguyên. Vậy chúng thay đổi như thế nào?

- Trong quá trình nhân lên của virus đôi khi xảy ra sai lệch trong sao chép tạo ra những thay đổi nhỏ của RNA. Hiện tượng này được gọi là đột biến điểm (hay đột biến ngẫu nhiên hoặc hiện tượng trôi dạt hoặc lệch lạc về kháng nguyên - *antigenic drift* [81])

Sự đột biến đã tạo ra một loại virus mới vì vậy hệ thống miễn dịch của cơ thể phải cần một thời gian nhất định để tạo ra kháng thể chống lại những virus đó. Virus lợi dụng thời gian này để lây nhiễm [81]. Khi cơ thể tạo ra được kháng thể chống lại các kháng nguyên mới này thì virus đã nhân lên hàng triệu lần và lan truyền sang các vật chủ mới. Chúng thay đổi thường xuyên tạo ra các chủng virus mới gây ra các ổ dịch cúm. Chu kỳ của bệnh cúm hàng năm phụ thuộc sự kết hợp của tốc độ biến đổi, thời gian ủ bệnh và sự biến đổi theo mùa của khí hậu [81].

Cho đến nay, một số chủng virus được ghi nhận chỉ gây bệnh cho gia cầm mà không gây bệnh cho người. Ngược lại, một số chủng khác lại chỉ gây bệnh cho người mà không gây bệnh cho gia cầm [73], [74], [79], [80]. Trong một số trường hợp, cả virus cúm người và virus cúm gia cầm có thể cùng nhiễm vào động vật thứ 3, như lợn chẳng hạn. Nếu 2 loại virus này nhiễm vào lợn trong cùng một thời gian, chúng có thể trao đổi các đoạn gen, tạo ra một dạng virus lai [75]. Hiện tượng này được gọi là chuyển đổi kháng nguyên (hay đột biến do sự tổ hợp di truyền - *antigenic shift* [75]): Đột biến này là sự tổ hợp các đoạn ARN xảy ra trong đó có sự sắp xếp lại các phân đoạn RNA do sự trộn lẫn bộ gen của 2 virus cúm khác nhau. Điều đó đã tạo nên những sai khác cơ bản về bộ gen của virus đời con so với virus bố mẹ. Khi nhiều virus

khác nhau cùng xâm nhiễm vào một tế bào chủ, các thế hệ virus đ- ợc sinh ra sau đó có thể đ- ợc sinh ra từ sự tổ hợp của các gen bố mẹ xuất phát từ nhiều virus khác nhau. Do kiểu gen của virus cúm type A gồm 8 đoạn gen nên từ 2 virus bố mẹ khi trộn lẫn và tổ hợp với nhau sẽ tạo ra 256 loại virus thế hệ sau.

Khi nghiên cứu di truyền học của virus H5N1 các nhà khoa học của Việt Nam đã nhận thấy chúng có nhiều thay đổi [28], [47], [51], [53], [37], [42]. Trong các đàn vịt nuôi của Việt Nam không chỉ có H5N1 mà còn có nhiều loại virus cúm gia cầm khác nh- H3, H4, H8, H9 và H11 [10], [11], [23].

Kết quả trên cho thấy chúng ta cần giám sát các chủng virus cúm đang l- u hành một cách hệ thống và th- ờng xuyên bởi những đột biến quan trọng có thể xảy ra đột ngột, bất kỳ thời điểm nào. Việc l- u hành nhiều loại virus cùng lúc sẽ tạo điều kiện cho sự trao đổi gen của các loại virus tạo ra virus mới. Gia cầm và các động vật khác (kể cả ng- ời) có thể mắc các virus cúm biến dị này với hậu quả khó l- ờng.

2.2.4. Sức đề kháng của virus

Virus cúm gia cầm có sức đề kháng yếu và bị bất hoạt dễ dàng trong môi tr- ờng bên ngoài. Virus bị bất hoạt nhanh chóng khi xử lý bằng nhiệt độ (ở nhiệt độ 56 - 60°C chỉ trong vài phút là virus mất độc tính), tia phóng xạ, tia cực tím, axit, các dung môi hữu cơ, các chất có hoạt tính bề mặt và một số chất sát trùng thông th- ờng [73].

Theo WHO[46] , virus cúm gia cầm thể độc lực cao có thể tồn tại trong phân gia cầm ít nhất là 35 ngày ở 4°C , 6 ngày ở 37°C và khoảng 23 ngày trong thân thịt đông lạnh. Ng- ời ta đã phân lập đ- ợc virus từ n- ớc ao, hồ là nơi các loài thủy cầm sinh sống. Nếu nguồn n- ớc không đ- ợc xử lý, nó sẽ là nguyên nhân lây nhiễm cho gia cầm khi gia cầm uống phải n- ớc từ nguồn n- ớc đó.

Kết quả nghiên cứu tại Việt Nam cho thấy ở điều kiện bình th- ờng virus

tồn tại trong môi trường nước 6 ngày. Nếu trong nước có chứa các chất hữu cơ thì virus tồn tại đến 10 ngày. Trong các hồ chôn gia cầm virus tồn tại đến ngày thứ 5 sau khi chôn (Nguyễn Tiến Dũng - số liệu cá nhân).

Trong số những loại thuốc kháng cúm hiện có thì virus đã đề kháng với Amantadine, Rimantadine, Oseltamivir [25], [45], [59], [61] nhưng vẫn cảm với Zanamavir (chất này có thể được sử dụng cả trong điều trị và phòng bệnh).

2.2.5. Độc lực của virus

Để đánh giá độc lực của virus cúm, người ta sử dụng phương pháp gây bệnh cho gà 6 tuần tuổi bằng cách tiêm tĩnh mạch 0,2 ml dung dịch nước tiểu nang từ trứng gà có phôi đã nhiễm virus với tỷ lệ pha loãng 1/10, sau đó đánh giá mức độ bệnh của gà để cho điểm (chỉ số IVPI). Điểm tối đa là 3 điểm và đó là virus có độ độc lực cao nhất. Theo qui định của ủy ban Châu Âu [70] thì những virus có chỉ số IVPI từ 1,2 trở lên thuộc nhóm virus có độc lực cao.

Trong thực tế người ta chia virus cúm gia cầm làm 2 loại: Loại virus có độc lực thấp - LPAI và loại virus có độc lực cao - HPAI. Các vụ dịch lớn đều do virus HPAI gây ra thường là virus có kháng nguyên H5, H7 và H9. Riêng H5 và H7 thông thường bắt nguồn từ virus độc lực thấp, sau quá trình lây truyền trên gà và chim cút độc lực tăng lên rất nhanh và gây ra các vụ dịch lớn [66].

Nghiên cứu ở mức độ phân tử cho thấy, khả năng lây nhiễm virus phụ thuộc vào tác động của men proteaza vật chủ đến sự phá vỡ các liên kết hoá học, thực chất là sự cắt rời protein HA thành 2 tiểu phân HA1 và HA2. Virus HPAI có một số amino axit có tính bazơ tại vị trí cắt (cleavage site) rời protein HA1 và HA2, trong khi các virus LPAI lại chỉ có một amino axit có tính bazơ tại vị trí đó (dẫn theo B. C. Easterday- 71). Vì thế, một số nước đánh giá độc lực của virus trên cơ sở gây nhiễm cho gia cầm và sau đó phân tích sự sắp xếp các amino axit của các virus.

2.2.6. Nuôi cấy và l- u giữ virus cúm gia cầm

Virus cúm gia cầm phát triển tốt trong phôi gà 9 - 11 ngày tuổi. Chúng tồn tại đ- ợc trong dịch niệu vài tuần ở điều kiện 4⁰C. Khả năng tồn tại của virus rất cao nếu chúng ta bảo quản dịch niệu đó ở - 70⁰C hoặc cho đông khô[71].

Virus cúm gia cầm cũng phát triển tốt trong môi tr- ờng tế bào xơ phôi gà (CEF), tế bào dòng có nguồn gốc thận chó (Madin-Darby-Canine -Kidney cells - MDCK) hoặc thận khỉ với điều kiện môi tr- ờng nuôi cấy tế bào có bổ sung Trypsin (nồng độ TPCCK- trypsin trong môi tr- ờng D-MEM là 2 □g/ml)[103].

2.3. Miễn dịch chống bệnh cúm gia cầm

Cũng nh- miễn dịch chống lại các bệnh khác, miễn dịch chống bệnh cúm bao gồm miễn dịch tự nhiên và miễn dịch đặc hiệu.

2.3.1. Miễn dịch tự nhiên

Miễn dịch là trạng thái đặc biệt của cơ thể không mắc phải tác động có hại của yếu tố gây bệnh, trong khi đó các cơ thể cùng loài hoặc khác loài lại bị tác động trong điều kiện sống nh- nhau.

Gia cầm cũng nh- các vật chất sống khác có cơ chế phòng chống tự nhiên [78]. Những hàng rào vật lý nh- da hoặc hệ lông nhầy bình th- ờng ngăn cản tác nhân gây bệnh vào cơ thể. Đối với mầm bệnh lần đầu xâm nhập vào cơ thể, sự phòng thủ đầu tiên của ký chủ sẽ do cơ chế miễn dịch tự nhiên nh- các tế bào thực bào, bổ thể và các tế bào diệt tự nhiên (NK) quyết định.

Các tế bào tham gia quá trình thực bào bao gồm:

+ Tiểu thực bào, quan trọng nhất là bạch cầu đa nhân trung tính chiếm 60-70% tổng số bạch cầu ở máu ngoại vi, nó thực bào những phân tử nhỏ và vi khuẩn ngoài tế bào.

+ Đại thực bào là các tế bào lớn có khả năng thực bào, khi đ- ợc hoạt hóa nó sẽ nhận biết và loại bỏ các vật lạ, ngoài ra nó còn giữ vai trò quan

trọng trong sự trình diện kháng nguyên tới tế bào T và kích thích tế bào T sản sinh ra IL-1. Đại thực bào còn tiết ra interferon có hoạt tính kháng virus, lysozyme và các yếu tố khác có tác dụng kích thích phản ứng viêm.

Các bổ thể là phân quan trọng và nhạy cảm của hệ phòng thủ chống lại mầm bệnh hiện diện trong huyết tương của gia cầm. Bổ thể có tác dụng làm tan màng vi khuẩn, làm tăng khả năng thực bào của đại thực bào, opsonin hóa. Bổ thể còn có vai trò nhất định trong cơ chế đáp ứng miễn dịch đặc hiệu[78], [95].

Interferon (IFN): Do nhiều loại tế bào tiết ra nhưng nhiều nhất là tế bào diệt tự nhiên (NK). Khi Interferon được sản sinh ra, nó gắn vào tế bào bên cạnh và cảm ứng tế bào đó sản sinh ra protein kháng virus (antivirus protein-AVP), làm cho virus có xâm nhập vào trong tế bào nhưng cũng không nhân lên được[95].

Những tế bào diệt tự nhiên của gia cầm là tế bào lympho hạt lớn và gây nên sự phá hủy của tế bào đích gắn kháng thể. Ở gia cầm, tế bào diệt tự nhiên có thể tái tạo ở nhiều nơi như lách, máu và ruột... là một phần của hệ thống phòng vệ[78].

2.3.2. Miễn dịch đặc hiệu

Những mầm bệnh vượt qua hàng rào vật lý hoặc cơ chế phòng vệ miễn dịch tự nhiên sẽ kích thích một đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Miễn dịch đặc hiệu có tính đặc hiệu cao đối với tác nhân kích thích đặc hiệu. Đáp ứng của kháng thể khi gặp kháng nguyên lần đầu tiên được gọi là đáp ứng tiên phát (sơ cấp). Một số tế bào limpho sau khi nhận biết kháng nguyên sẽ thành thực thành tế bào limpho nhớ[78]. Những tế bào nhớ có đáp ứng đối với lần phơi nhiễm sau đối với cùng mầm bệnh bằng cách kích thích một đáp ứng miễn dịch có tính đặc hiệu cao và rất nhanh chóng[78].

Tính hiệu quả chống bệnh của một vaccin phụ thuộc vào các phản ứng của hệ miễn dịch với vaccin.

Tế bào T, các tế bào chính của miễn dịch trung gian tế bào, nhận biết

kháng nguyên lạ sau khi kháng nguyên đã đ- ợc xử lý bởi các tế bào trình diện kháng nguyên. Đáp ứng tế bào lympho T gây độc có thể làm giảm sự bài thải các virus cúm có độc lực thấp (LPAI) nh- ng liệu chúng có khả năng bảo vệ chống lại các virus có độc lực cao (HPAI). Tác giả Terrence M. Tumpey[100] nhận thấy có sự giảm đáp ứng tế bào lympho T ở những vịt đ- ợc gây nhiễm thực nghiệm chủng virus A/Mallard/Ohio/184/86. Nghiên cứu của Seo cùng các cộng sự[92] cho thấy virus H9N2 có khả năng bảo hộ chéo chống lại virus H5N1 thông qua miễn dịch tế bào.

Hầu hết các loại kháng nguyên kích thích miễn dịch dịch thể và miễn dịch trung gian tế bào, mặc dù kiểu miễn dịch tối - u nhất cho phòng vệ có thể khác nhau đối với từng loại[92]. Các chủng virus cúm có thể bị tác động trực tiếp của đáp ứng miễn dịch ở những gia cầm bị nhiễm. Miễn dịch chống lại NA đóng vai trò bảo vệ cơ thể chống lại sự xâm nhiễm của virus do kháng thể chống NA ngăn cản virus chui ra khỏi các tế bào đã bị nhiễm[103].

Miễn dịch dịch thể

Do các tế bào limpho B đảm nhiệm. Các limpho bào bắt nguồn từ tế bào nguồn ở tủy x- ong đi tới túi Fabricius, ở đây chúng đ- ợc biệt hoá để trở thành các limpho B, sau đó di tản đến các cơ quan limpho ngoại biên. Các tế bào limpho B khu trú ở các tâm điểm mầm và vùng tủy của lách, hạch lâm ba. Trong hạch lâm ba, các tế bào limpho B có thể gặp một kháng nguyên và nhận biết kháng nguyên đó bởi các kháng thể có trên bề mặt của chúng. Tế bào B có thể nhận dạng kháng nguyên khi nó t- ơng tác với globulin miễn dịch nhô ra trên bề mặt tế bào[78].

Sau khi đã nhận biết kháng nguyên và đ- ợc kích thích bởi các cytokines do tế bào T tiết ra, các tế bào limpho B đ- ợc biệt hóa thành t- ơng bào (plasma) để sản sinh kháng thể[78]. Chúng tiết ra các loại globulin miễn dịch (Ig) gồm có 3 lớp chính là IgM, IgG, IgA. IgG của gia cầm lớn hơn của động vật có vú nên th- ờng đ- ợc gọi là IgY.

Đáp ứng của kháng thể khi gặp kháng nguyên lần đầu tiên đ- ợc gọi là đáp ứng tiên phát (sơ cấp). Sau khi xuất hiện vài ngày, hàm l- ợng kháng thể trong máu mới tăng và các kháng thể đầu tiên chủ yếu là IgM. Đáp ứng tiên phát cũng có thể có IgG nh- ng với hàm l- ợng thấp.

Kháng thể dịch thể chỉ có tác dụng với virus khi nó còn ở ngoài tế bào, lớp IgM và IgG kết hợp với virus với sự tham gia của bổ thể làm tiêu diệt virus, 2 lớp kháng thể này còn ngăn virus không cho kết hợp với thụ thể trên bề mặt tế bào vật chủ, ngăn cản sự hòa màng giữa vỏ virus và màng tế bào.

Kháng thể dịch thể có thể hiện diện trong các loại dịch trong cơ thể nh- ng th- ờng đ- ợc xác định (định l- ợng) trong huyết thanh. Gia cầm có 3 lớp Ig chính: IgA, IgG, IgM.

IgA là Ig quan trọng nhất trong miễn dịch thuộc màng nhày và tập trung nhiều nhất ở các bề mặt nhày. IgA bảo vệ màng nhày chống lại các mầm bệnh đặc biệt là virus bằng cách trung hoà và ngăn cản sự liên kết của chúng với các điểm tiếp nhận trên bề mặt tế bào đích, không cho virus xâm nhập vào trong.

IgG của gia cầm lớn hơn của động vật có vú, th- ờng đ- ợc gọi là IgY. IgY có thể là tiền chất tổ tiên của IgE và IgG của động vật có vú.

IgM đ- ợc tìm thấy trên bề mặt của hầu hết các tế bào B và là kháng thể đ- ợc sản xuất ra đầu tiên trong phản ứng miễn dịch sơ cấp. Sau đó các tế bào chuyển sang sản xuất IgG hoặc IgA (sự chuyển lớp). Khả năng gắn kết kháng nguyên của các kháng thể không thay đổi trong hoặc sau khi chuyển lớp. Các cytokin IL-4, TGF- β và IFN- γ kích thích tế bào B trải qua sự chuyển lớp[78].

Một đáp ứng miễn dịch điển hình của gia cầm bắt đầu bằng sự sản xuất ra IgM. Sau vài lần đáp ứng miễn dịch chuyển sang sản xuất IgY. IgG là kháng thể chính sinh ra trong miễn dịch thứ phát và chiếm - u thể trong máu gia cầm. Kháng thể IgM có thể phát hiện ở gia cầm chỉ sau khi bị nhiễm 5 ngày trong khi kháng thể IgG chỉ đ- ợc phát hiện ở 7 đến 9 ngày sau khi bị

nhiễm. Kháng thể IgA d- ồng nh- rất yếu[100]. Vịt th- ồng có đáp ứng miễn dịch yếu và thiếu kháng thể kháng kháng nguyên HA cả trong tr- ồng hợp nhiễm tự nhiên và gây bệnh thực nghiệm. Nếu chúng ta so sánh mức độ đáp ứng miễn dịch đối với virus cúm gia cầm ở các loài gia cầm thì chúng đ- ợc sắp xếp nh- sau: Gà >> Gà lôi >> Gà tây > Chim cút > Vịt [100].

Kết quả nghiên cứu của Tian cùng các cộng sự [101] cho thấy vaccin cúm gia cầm H5N1 nhũ dầu vô hoạt có thể bảo hộ cho vịt chống lại virus.

Có một số ý kiến cho rằng tế bào B sử dụng Ig bề mặt để gắn với kháng nguyên[95]. Mỗi tế bào B chỉ sản xuất ra chỉ một kiểu chuỗi nặng hay chuỗi nhẹ và t- ơng hợp với một loại kháng nguyên xác định. Nh- thế, đối với kháng nguyên để bắt đầu sản xuất kháng thể và mở rộng việc nhân lên, kháng nguyên phải phản ứng với tế bào B có thể hiện điểm tiếp nhận Ig t- ơng đồng[95].

Cơ chế phòng vệ của kháng thể chống lại mầm bệnh

- Trung hoà: Kháng thể trung hoà các kháng nguyên Haemagglutinin (HA) và Neuraminidase (NA) cung cấp sự bảo vệ ban đầu chống lại bệnh. Những virus bị trung hoà không thể bám vào điểm tiếp nhận bề mặt của tế bào đích và bởi vậy bị ngăn cản sự xâm nhập của virus vào trong tế bào[95]. Việc phòng hộ chống lại bệnh cúm gia cầm là kết quả của đáp ứng miễn dịch chống lại protein Haemagglutinin và ở một mức độ nào đó chống lại protein Neuraminidase. Các đáp ứng miễn dịch chống lại các protein bên trong nh- Nucleoprotein (kháng nguyên NP) và Matrixprotein (kháng nguyên M) của virus đã đ- ợc chứng minh là không có tác dụng phòng hộ[95]. Cũng chính vì thế không có một loại vaccin nào dùng chung cho tất cả các virus cúm gia cầm. Trên thực tế, sự phòng hộ đ- ợc tạo ra nhờ các subtyp Haemagglutinin có trong vaccin[95].

- Hoạt động của bổ thể: Bổ thể có tác dụng làm tăng khả năng thực bào của đại thực bào, opsonin hóa. Bổ thể gắn với receptor của thể thực bào, kích

thích cho sự thực bào và phân huỷ mầm bệnh. Ngoài ra, bổ thể cũng có vai trò nhất định trong cơ chế đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Trong nhiều trường hợp, sự tương tác giữa kháng nguyên và kháng thể cần sự có mặt của bổ thể [78].

Các kháng thể dịch thể tồn tại trong cơ thể trong một thời gian nhất định. Tuy vậy phải một thời gian sau khi kháng nguyên kích thích, thường là 5-7 ngày thì kháng thể mới xuất hiện. Hàm lượng kháng thể sẽ đạt tới đỉnh cao nhất và sẽ duy trì trong một thời gian rồi sau đó giảm dần [78].

Miễn dịch vô trùng là trạng thái miễn dịch tại đó cơ thể được bảo hộ hoàn toàn chống lại sự lây nhiễm của mầm bệnh [95]. Khả năng miễn dịch vô trùng đối với virus cúm không thể có trong thực tế sản xuất. Một số tác giả đã thông báo thí nghiệm của họ đã đạt miễn dịch vô trùng. Tuy nhiên, kết quả kiểm tra cho thấy những nghiên cứu đó sử dụng quá ít động vật thí nghiệm, không đủ độ tin cậy để đánh giá kết quả, sử dụng liều lượng virus thử thách quá thấp hoặc sử dụng các phương pháp phân lập/ phát hiện virus có độ nhạy thấp [95]. Trong thực tế, vaccin làm giảm sự nhân lên của virus gây bệnh trong đường hô hấp và đường tiêu hoá, gián tiếp làm giảm sự bài thải virus ra môi trường và sự lan truyền virus [95]. Sự bảo hộ của vaccin đối với các đàn gia cầm trong sản xuất luôn thấp hơn những đàn gia cầm sạch được nuôi trong điều kiện thí nghiệm [95].

Những yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành kháng thể:

Sự hình thành kháng thể và quá trình đáp ứng miễn dịch phụ thuộc rất nhiều yếu tố như trạng thái sức khoẻ của cơ thể, điều kiện ngoại cảnh, sự chăm sóc nuôi dưỡng... Như quan trọng hơn cả là phụ thuộc bản chất kháng nguyên.

+ Liều lượng kháng nguyên: Lượng kháng nguyên đưa vào vừa đủ sẽ kích thích cơ thể sản sinh miễn dịch ở mức tối đa mà không gây ức chế và tiêu diệt miễn dịch.

+ Số lần đưa kháng nguyên vào cơ thể: tiêm nhắc lại vaccin có tác dụng

tốt, kháng thể sinh ra nhiều hơn và đ- ọc duy trì trong thời gian lâu hơn.

+ Chất bổ trợ: Chất bổ trợ cho vào khi chế vacxin với mục đích giữ và duy trì l- ượng kháng nguyên lâu trong cơ thể nhờ đó tạo kích thích liên tục, đều đặn các cơ quan có thẩm quyền miễn dịch tạo ra kháng thể ở mức cao và duy trì đ- ọc lâu hơn. Những chất bổ trợ th- ờng dùng là keo phèn, nhũ t- ơng.

2.4. Dịch tễ học bệnh cúm gia cầm.

Vật chủ tự nhiên của virus cúm gia cầm là các loài gia cầm nh- gà, vịt, ngỗng, gà tây, gà Nhật, chim cú và chim trĩ [71]. Hiện nay vẫn ch- a rõ nguồn bệnh tàng trữ chính xác ở đâu và ng- ời ta giả thiết do gia cầm tiếp xúc trực tiếp hay gián tiếp với thủy cầm di c- . Sự phân bố và l- u hành của virus cúm gia cầm rất khó xác định chính xác. Sự phân bố bị ảnh h- ưởng của cả loài vật nuôi và hoang dã, tập quán chăn nuôi gia cầm, đ- ường di trú của dã cầm, mùa vụ và hệ thống cảnh báo dịch bệnh[1]. Virus lây lan rất nhanh từ đàn gia cầm này sang gia cầm khác qua tiếp xúc trực tiếp. Virus đ- ọc bài thải theo phân và các dịch tiết từ mũi và mắt. Hiện nay, vai trò của vịt nh- một vật tàng trữ mầm bệnh tự nhiên ở một số vùng châu á đã đ- ọc xác nhận và đây là trở ngại rất lớn trong công cuộc phòng chống và tiêu diệt bệnh cúm gia cầm[16].

2.4.1. Động vật cảm nhiễm

Tất cả các loài chim thuần d- ồng (gia cầm) hoặc hoang dã (đặc biệt các loài thủy cầm di c-) đều mẫn cảm virus. Bệnh th- ờng phát hiện khi lây nhiễm cho gia cầm (gà, vịt, gà tây, chim cú). Phần lớn các loài gia cầm non đều mẫn cảm với virus cúm type A[71].

Virus cúm của loài chim có thể gây bệnh cho các loài động vật có vú (lợn, ngựa...) và cả con ng- ời.

Virus cúm type A phân bố trong hầu nh- tất cả các loài chim và động vật có vú từ loài sống trên cạn đến loài sống d- ưới n- ớc (cá voi, hải cẩu...). Lợn mắc bệnh cúm th- ờng do subtyp H1N1, H3N3. Vịt nuôi cũng bị nhiễm virus

cúm nh- ng ít phát hiện do vịt có sức đề kháng với virus gây bệnh kể cả chủng có độc cao gây bệnh nặng cho gà, gà tây[99].

2.4.2. Động vật mang virus

Virus cúm đã phân lập đ- ợc hầu hết từ các loài chim hoang dã nh- vịt, thiên nga, hải cẩu, vẹt, mòng biển, diều hâu, chim sẻ... Tuy nhiên, tần suất và số l- ợng virus phân lập ở loài thủy cầm đều cao hơn ở các loài khác. Kết quả điều tra thủy cầm di trú ở Bắc Mỹ cho thấy trên 60% chim non mang virus do tập hợp đàn tr- ớc khi di trú[78], [99].

Trong các loài thủy cầm di trú thì vịt trời có tỷ lệ bị nhiễm virus cao hơn các nhóm khác.

Những kết quả điều tra về sự phân bố rộng của virus cúm typ A ở chim hoang dã và đặc biệt là vịt trời đã cho thấy: sự kết hợp các khoáng nguyên bề mặt H và N của các subtyp virus cúm typ A diễn ra ở chim hoang dã. Những virus này không gây độc đối với vật chủ, chúng đ- ợc nhân lên ở đ- ờng ruột khiến cho các loài này mang virus và là nguồn reo rắc virus cho các loài khác đặc biệt là gia cầm[99].

Cuối tháng 10/2005 FAO, OIE và WHO đã l- u ý các n- ớc đã trải qua dịch cúm gia cầm H5N1 rằng vịt nuôi có thể đóng một vai trò quan trọng trong việc làm lây lan chủng virus cúm gia cầm H5N1 thể độc lực cao cho các gia cầm khỏe và rất có thể lây truyền virus trực tiếp cho ng- ời vì vật nuôi nhiễm virus, gà bệnh và gà có biểu hiện ốm bài thải một l- ợng virus bài xấp xỉ nhau nh- ng vịt nuôi không thể hiện các triệu chứng lâm sàng bệnh lý. Vịt có thể là con vật tàng trữ “thâm lặng” đối với virus cúm H5N1 gây bệnh thể độc lực cao cho gà. Vịt có thể bị nhiễm virus và bài thải virus trong một thời gian dài nh- ng nó lại không thể hiện ra các triệu chứng lâm sàng có thể nhận biết đ- ợc[83]. Điều này đặc biệt có ý nghĩa ở vùng nông thôn nơi có tập quán chăn nuôi vịt thả rông, các loại gia cầm th- ờng đ- ợc nhốt chung và đặc biệt là

chúng dùng chung một nguồn nước. Trên thực tế cùng trong một khu vực có một số đàn gia cầm bị nhiễm virus và phát bệnh, một số đàn lại không phát bệnh mà chỉ có huyết thanh dương tính[83]. Hiện tượng này xảy ra do virus bài thải ra từ vịt rất dễ bị thay đổi tính kháng nguyên. Những đàn có huyết thanh dương tính đã nhiễm virus H5N1 không còn độc thải ra từ vịt bệnh hoặc vịt nhiễm loại virus H5N1 không độc. Hiện tại, FAO và OIE đang phối hợp với nhau đánh giá vai trò của vịt nuôi nhằm đưa ra các chiến lược lâu dài với mục đích khống chế các ổ dịch cúm gia cầm ở châu Á[16].

Khi nghiên cứu sự lưu hành của virus cúm gia cầm ở khu vực đồng bằng sông Hồng và sông Cửu Long, tác giả Nguyễn Tiến Dũng cùng các cộng sự [10], [11] phát hiện thấy vịt nuôi là con vật mang trùng và gây bệnh trong khu vực châu thổ đồng bằng sông Hồng và sông Cửu Long; chính đàn vịt thuần hoá là nơi lưu giữ virus cúm gia cầm và gây ra dịch địa phương sau khi đợt dịch lần thứ nhất kết thúc.

2.4.3. Sự truyền lây

Khi gia cầm bị nhiễm virus cúm, virus được nhân lên trong đường hô hấp và đường tiêu hoá. Sự truyền lây bệnh được thực hiện theo hai phương thức là trực tiếp và gián tiếp.

Lây trực tiếp do con vật mắc cảm tiếp xúc với con vật mắc bệnh thông qua các hạt khí dung được bài tiết từ đường hô hấp hoặc qua phân, thức ăn và nước uống bị nhiễm. Theo các tổ chức WHO và FAO [27] thì con người có nguy cơ lây nhiễm virus cúm gia cầm cao nhất là do tiếp xúc trực tiếp với gia cầm bị bệnh trong quá trình bắt và giết mổ.

Lây gián tiếp qua các hạt khí dung trong không khí với khoảng cách gần hoặc những dụng cụ chứa virus do gia cầm mắc bệnh bài thải qua phân hoặc lây qua chim, thú, thức ăn, nước uống, lông nhốt, quần áo, xe vận chuyển... Đây là phương thức lây truyền chủ yếu[71].

Nh- vậy virus cúm dễ dàng lây truyền tới những vùng khác do con ng- ời, ph- ong tiện vận chuyển, dụng cụ chăn nuôi...Đối với các virus gây bệnh cúm truyền nhiễm cao ở gia cầm thì sự truyền lây chủ yếu qua phân, đ- ờng miệng.

2.5. Triệu chứng

Các biểu hiện lâm sàng của bệnh cúm rất khác nhau phụ thuộc các yếu tố nh- : chủng virus bị nhiễm, loài cảm nhiễm, tuổi, giới tính, liều gây nhiễm, điều kiện môi tr- ờng, chế độ nuôi d- ỡng, tình trạng miễn dịch của vật chủ tr- ớc khi nhiễm virus [63] . Bệnh gây ra do các chủng virus cúm khác nhau tạo sự đa dạng trong các thể bệnh, từ không có hoặc rất ít dấu hiệu lâm sàng nh- ng gây chết đột ngột, tỷ lệ tử vong cao đến bệnh nhẹ hoặc ẩn tính.

Triệu chứng điển hình của bệnh cúm ở gia cầm là:

- Chết đột ngột, tỷ lệ tử vong cao có khi đến 100% trong vài ngày.
- Có các biểu hiện của đ- ờng hô hấp nh- ho, hắt hơi, thở khò khè, viêm xoang, chảy nhiều n- ớc mắt.
- S- ng, phù đầu và mắt.
- Xuất huyết d- ới da, tím tái đặc biệt ở mào, xuất huyết ở chân.
- Gà đứng tụm với nhau, lông xù. Gà mái giảm đẻ, tăng số lần ấp.
- Tiêu chảy.
- Rối loạn thần kinh.

Trong một số tr- ờng hợp, bệnh bùng phát nhanh, tr- ớc khi gia cầm bị chết không có biểu hiện lâm sàng.

Vịt và các loài thủy cầm khác bị nhiễm virus cúm ít khi biểu hiện triệu chứng ngay cả với các chủng gây bệnh HPAI ở gà nh- ng phát bệnh thì viêm xoang, viêm đ- ờng hô hấp, viêm mắt, tỷ lệ tử vong cao[83].

Gia cầm bị nhiễm các chủng virus có độc lực yếu hơn cũng có những triệu chứng t- ơng tự nh- ng mức độ nhẹ hơn và tỷ lệ chết thấp hơn, nh- ng khi có các vi khuẩn cộng nhiễm với virus cúm hoặc gia cầm bị tác động bởi yếu tố

bất lợi của môi trường thì các biểu hiện trầm trọng hơn và tỷ lệ tử vong cũng cao hơn.

Các loài chim hoang dã bị nhiễm virus cúm thường không có triệu chứng rõ ràng[63].

2.6. Bệnh tích

Bệnh tích đại thể biến đổi theo lâm sàng của bệnh[14], từ viêm nhẹ đường hô hấp, viêm xoang cata, viêm xoang bụng, viêm ruột cata đến tụ huyết, xuất huyết da, gan, thận, tim, lách, phổi, ruột, yếm, mào, chân.

Bệnh tích vi thể do HPAI gây ra khác nhau tùy theo độc lực của virus và loài mắc bệnh.

Bệnh ở thể nặng thấy sưng, phù, tụ huyết, xuất huyết, có các nốt hoại tử ở các cơ quan nội tạng.

- Hoại tử cơ tim thường thấy trong các gia cầm mắc bệnh do chủng virus có độc lực cao H5N1.

- Một số chủng virus gây ra các triệu chứng thần kinh thì thấy vành mạch sưng và hoại tử các tế bào thần kinh.

- Bệnh tích vi thể ở gà giò nặng hơn ở gà đẻ.

- Nhìn chung ở các loài có vú bệnh tích không biến đổi nhiều ở các cơ quan nội tạng[71].

2.7. Chẩn đoán

Chẩn đoán xác định bệnh do nhiễm virus cúm A chủ yếu là phải phân lập và định danh virus kết hợp với triệu chứng lâm sàng, mổ khám bệnh tích và dịch tễ học của bệnh.

Chúng ta có thể sử dụng nhiều phương pháp để chẩn đoán xác định bệnh do nhiễm virus cúm A.

- Để xác định virus và các serotype chúng ta có thể dùng phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA) hoặc phương pháp RT-PCR [68].

- Phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HI) để phát hiện kháng thể

chống HA của virus có trong huyết thanh của gia cầm hoặc định serotyp của kháng nguyên HA.

- Phản ứng NA và NI để xác định các subtyp của kháng nguyên NA.

- Phản ứng miễn dịch khuếch tán trong thạch (AGP) [103] phát hiện kháng thể chống lại virus cúm sử dụng kháng nguyên đặc hiệu Ribonucleoprotein.

- Phản ứng ELISA [93], [103] dùng phát hiện kháng thể kháng virus cúm gia cầm trong huyết thanh của gà (bộ kit ELISA của hãng Idexx).

- Phản ứng miễn dịch huỳnh quang [86].

- Phản ứng Real-Time RT-PCR phát hiện virus và các serotyp của chúng [103].

Với mục đích nhanh chóng phát hiện virus H5N1 trong mẫu bệnh phẩm, các nhà khoa học đã sản xuất bộ dụng cụ chẩn đoán nhanh virus H5N1 cho kết quả trong vòng một giờ đồng hồ[44], thậm chí chỉ cần 2 phút[54] đồng thời phát hiện được các biến chủng, biến dị của loại virus này, hoặc phát hiện virus H5N1 thông qua xét nghiệm n- ọc bọt[58]. Tuy nhiên có ý kiến cho rằng test nhanh không chẩn đoán được virus H5N1[31]

- Phân lập virus.

Phân lập virus là phương pháp có tính đặc hiệu cao và rất hữu ích khi chẩn đoán các mẫu lâm sàng có chất lượng tốt.

Lấy và bảo quản mẫu bệnh phẩm:

+ Mẫu bệnh phẩm được lấy từ gia cầm chết để phân lập virus gồm phân và các chất chứa trong đường tiêu hóa và khí quản. Ngoài ra còn có thể lấy các tổ chức phổi, khí quản, các bộ phận của đường tiêu hóa, gan, lách, não, tim.

+ Đối với gia cầm sống, lấy mẫu dịch phế quản và ổ nhóp. Với gia cầm quá nhỏ có thể thay thế bằng mẫu phân tươi

Mẫu được giữ ở 4°C và phải tiến hành phân lập virus trong vòng 48 giờ kể từ khi lấy mẫu. Nếu cần bảo quản trong thời gian dài hơn thì phải giữ ở

nhiệt độ - 70°C.

Phương pháp thích hợp để phân lập virus cúm là tiêm truyền qua phôi trứng gà hoặc tế bào nuôi cấy.

Để giám định virus phân lập được, ta dùng phản ứng HI với kháng huyết thanh chuẩn của các subtyp hoặc dùng phản ứng RT-PCR với các cặp mồi chuẩn cho các kháng nguyên H và N.

Các kỹ thuật huyết thanh học như HI, kết tủa khuếch tán trong thạch, miễn dịch điện di là phản ứng đặc hiệu có thể phát hiện tất cả các chủng virus cúm gia cầm và là những phản ứng phù hợp cho công trình giám sát bệnh.

2.8. Kiểm soát bệnh

Ở nước ta, bệnh được phát hiện tại một trại gà giống của công ty CP (Xã Thủy Xuân Tiên - Công Mỹ - Hà Tây) cuối tháng 12/2003 [6]. Chỉ trong một thời gian ngắn sau đó, bệnh đã bùng phát ở hầu khắp các vùng miền trên cả nước. Chỉ trong vòng 2 tháng, dịch cúm gia cầm đã gây thiệt hại nặng về kinh tế và ảnh hưởng trầm trọng tới an sinh xã hội. Chỉ riêng chi phí cho việc tiêu hủy gia cầm, hóa chất khử trùng tiêu độc đã lên tới con số hàng trăm tỷ đồng [6]. Tuy nhiên, những thiệt hại khác do dịch bệnh gây ra còn lớn hơn nhiều: ở các tỉnh đã công bố dịch đều áp dụng các biện pháp cấm vận chuyển, buôn bán gia cầm. Do đó, những gia cầm giống hoặc nuôi thịt đến thời gian xuất chuồng đều không tiêu thụ được; nhiều gia đình vay vốn ngân hàng để phát triển chăn nuôi đã lâm vào tình trạng phá sản sau đại dịch.

Không những gây hại trên gia cầm, bệnh còn truyền lây sang người và gây tử vong. Nạn nhân đầu tiên là một bé gái 8 tuổi (tháng 1/2004) và sau đó chỉ 8 ngày cậu em trai 4 tuổi của nạn nhân cũng đã thiệt mạng do nhiễm virus cúm A H5N1. Cho đến nay đã có hơn 100 người bị nhiễm và 42 người đã tử vong [103].

Trước những diễn biến phức tạp của bệnh cúm gia cầm, Bộ chính trị BCHTWĐCSVN, Chính phủ cùng các bộ ngành có liên quan đã liên tục ban

hành các văn bản về triển khai các biện pháp cấp bách ngăn chặn dịch cúm gia cầm và viêm phổi ở người do virus.

Biện pháp kỹ thuật chủ yếu để phòng chống dịch cúm gia cầm trong giai đoạn đầu là:

- Khoanh vùng có dịch để tiêu hủy toàn bộ số gia cầm trong phạm vi 3 km, tính từ chu vi ổ dịch bao gồm các loại gà, gà tây, vịt, ngan, ngỗng, chim cú, đà điểu, bồ câu, các loại chim cảnh và sản phẩm của chúng.

Trên cơ sở tình hình thực tế, biện pháp này đã được điều chỉnh như sau:

- Phải chủ động phòng dịch và tăng cường giám sát, kiểm tra nghiêm ngặt việc vận chuyển gia cầm và các sản phẩm của gia cầm.
- Tổ chức chặt chẽ việc vệ sinh tiêu độc ở những nơi có dịch và nơi có nguy cơ bị nhiễm bệnh.
- Phải đảm bảo an toàn cho những người tiếp xúc với những đàn gia cầm mắc bệnh bằng việc trang bị đầy đủ các phương tiện bảo hộ an toàn sinh học.
- Đối với các ổ dịch đang phát sinh phải tổ chức tiêu hủy triệt để, kịp thời, không để lây lan phát sinh ra vùng tiếp cận.
- Đối với vùng tiếp cận ổ dịch (trong vòng bán kính 3 km) không phải tiêu hủy đàn gia cầm mắc bệnh, nhưng phải áp dụng các biện pháp bảo vệ an toàn ở cấp độ cao và giám sát kiểm tra nghiêm ngặt việc vận chuyển gia cầm, các sản phẩm gia cầm, đồng thời áp dụng các biện pháp vệ sinh tiêu độc. (Công điện số 05 BNN/CĐ [6])

Thực tế cho thấy dù đã áp dụng nhiều biện pháp tích cực như: Tiêu hủy đàn gia cầm bị bệnh và các đàn xung quanh, vệ sinh tiêu độc, hạn chế di chuyển, kiểm soát giết mổ... nhưng chúng ta vẫn chưa hoàn toàn khống chế được dịch bệnh.

Theo kinh nghiệm của một số nước như Italy; Mexico; đặc biệt là Hồng Kông (Trung Quốc) [5], [17] thì việc tiêm phòng là biện pháp hỗ trợ tích cực để ngăn chặn, khống chế, đi đến thanh toán dịch cúm gia cầm, đảm bảo an

toàn vệ sinh thực phẩm, bảo vệ tính mạng và sức khỏe của con người.

Biện pháp tiêm phòng bằng vaccin có 2 loại thể cơ bản là:

- Vaccin làm giảm sự cảm nhiễm của bệnh đối với gia cầm đã được tiêm phòng.

- Giảm đáng kể lượng virus bài thải ra môi trường bên ngoài ở gia cầm đã được tiêm phòng. Như vậy, virus ô nhiễm môi trường ít đi, giảm nguy cơ lây lan sang các đàn gia cầm khác và giảm nguy cơ gây ô nhiễm cho con người và giảm cơ hội cho virus biến chủng tạo thành chủng virus cúm mới ở người.

Hiện nay trên thế giới có các loại vaccin phòng bệnh cúm gia cầm như :

*Vaccin vô hoạt đông chủng: Ví dụ như vaccin H5N1 của Weike (Trung Quốc). Loại vaccin này đạt hiệu quả cao trong việc ngăn ngừa bệnh và giảm lượng virus thải ra môi trường. Nhược điểm của loại vaccin này là không thể phân biệt gia cầm được tiêm chủng với gia cầm tiếp xúc với mầm bệnh trên thực địa.

* Vaccin vô hoạt di chủng: Ví dụ như vaccin vô hoạt H5N2 của Intervet (Hà Lan) và của Weike (Trung Quốc). Mức độ bảo hộ của loại vaccin này không tỷ lệ chặt chẽ với mức độ đồng chủng giữa kháng nguyên N trong vaccin và chủng trên thực địa như chúng lại có thể sử dụng như chất đánh dấu sự lây nhiễm virus trên thực địa[68].

* Vaccin tái tổ hợp: Ví dụ như vaccin sống vi rút đậu tái tổ hợp H5 Trovac của Merial và H5N1 của Weike (Trung Quốc).

Vaccin tái tổ hợp cho phép phân biệt giữa động vật nhiễm bệnh và động vật tiêm chủng vaccin bởi vì chúng không sản sinh kháng thể chống lại kháng nguyên Nucleoprotein phổ biến ở tất cả các virus cúm gà. Chỉ những động vật nhiễm bệnh trên thực địa mới tạo ra kháng thể nhóm A (nucleoprotein) và phát hiện ra kháng thể này qua phản ứng kết tủa ngưng kết trên thạch hoặc phản ứng ELISA.

Đối với tình hình bệnh cúm gia cầm trên người, do số lượng người bị

nhiễm virus ngày càng gia tăng, đã xuất hiện cơn sốt mua tích trữ thuốc Tamiflu hoặc tiêm phòng vaccin cúm. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc không theo chỉ dẫn có thể gây ra nhiều nguy cơ không thể lường trước. Theo báo VietnamNet, ngày 14/10/2005 các nhà khoa học Mỹ đã thông báo mẫu virus cúm gia cầm phân lập được từ một cô gái Việt Nam đã kháng thuốc Tamiflu[45]. Cô gái 14 tuổi này đã sử dụng thuốc Tamiflu vào tháng 2/2005 để phòng ngừa. Vấn đề đáng báo động hơn là cô gái này không trực tiếp tiếp xúc với gia cầm mà chỉ chăm sóc người anh trai 21 tuổi bị nghi nhiễm cúm gia cầm. Virus phân lập được từ cô gái giống hệt virus ở người anh trai.

Để chủ động phòng bệnh cúm trên người, các nhà khoa học Việt Nam đã tiến hành nghiên cứu sản xuất vaccin phòng bệnh cúm gia cầm H5N1. Ngày 17/01/2005 Viện vệ sinh dịch tễ trung ương [27] thông báo đã tiến hành thử nghiệm vaccin cúm gia cầm H5N1 trên chuột, sau đó sẽ tiếp tục với gà và khỉ. Đây là loại vaccin được nuôi cấy virus trên môi trường tế bào thận khỉ. Việc chọn khỉ, gà và chuột để nghiên cứu do chuột là động vật thông thường vẫn sử dụng để thử nghiệm; khỉ là loài động vật linh trưởng có những đặc điểm sinh lý gần giống với người; còn gà thì đang diễn ra dịch cúm gia cầm nên cần thử nghiệm trực tiếp mới có kết quả. Viện vắc-xin Nha Trang [60] cũng thông báo đã sản xuất thành công vaccin phòng bệnh cúm gia cầm H5N1 bằng cách nuôi cấy virus trên trứng gà có phôi 11 ngày tuổi.

3. Nội dung, nguyên liệu và ph- ơng pháp nghiên cứu

3.1. Nội dung nghiên cứu

- Xác định hiệu giá kháng thể kháng virus cúm gia cầm H5N1 trong huyết thanh của ngan và vịt tr- ớc khi tiêm vaccin.
- Xác định sự có mặt của virus H5N1 trong dịch ổ nhóp (swab) của ngan và vịt tr- ớc khi tiêm vaccin.
- Xác định hiệu giá kháng thể kháng virus cúm gia cầm H5N1 của ngan và vịt đã đ- ợc tiêm vaccin ở các thời điểm khác nhau.
- Xác định sự có mặt của virus H5N1 trong dịch ổ nhóp (swab) của ngan và vịt sau khi tiêm vaccin.

3.2. Nguyên liệu dùng trong nghiên cứu

- Vịt các lứa tuổi 1 ngày, 15 ngày và vịt đẻ.
- Ngan 15 ngày tuổi.
- Vaccin cúm gia cầm vô hoạt nhũ dầu chủng H5N1 của Trung Quốc do Bộ NN&PTNN cung cấp.
- Các loại môi tr- ờng, hoá chất, dụng cụ, trang thiết bị dùng trong phòng thí nghiệm.
- Seringe, bông cotton, tăm bông, môi tr- ờng vận chuyển dùng cho lấy mẫu.

3.3. Ph- ơng pháp nghiên cứu

3.3.1. Gây miễn dịch chủ động chống virus cúm gia cầm H5N1 cho ngan, vịt bằng cách tiêm vaccin cúm gia cầm H5N1 của Trung Quốc.

3.3.2. Xác định hiệu giá kháng thể kháng virus H5N1 tr- ớc và sau khi tiêm vaccin bằng phản ứng HI.

Thực hiện phản ứng HI theo quy trình đang áp dụng tại bộ môn virus Viện Thú y.

Tr- ớc khi thực hiện phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HI), tiến

hành phản ứng phản ứng ng- ng kết hồng cầu (HA) để chuẩn độ kháng nguyên chuẩn H5. Dùng đĩa làm phản ứng ng- ng kết đáy chữ U gồm 12 cột và 8 hàng. Pha kháng nguyên H5 cho phản ứng HI là 8 đơn vị HA.

Tiến hành phản ứng HA:

- Cho 50 µl PBS (pH 7,2) vào tất cả các giếng.
- Cho 50µl kháng nguyên chuẩn vào các giếng từ A1 → H1.
- Pha loãng bậc 2 kháng nguyên kiểm tra. Chuyển 50 µl từ giếng 1 đến giếng 11 rồi bỏ đi 50µl.
- Cột 12 dùng làm đối chứng chỉ chứa: 50µl PBS và 50 µl hồng cầu gà 0,5%.
- Cho 50µl hồng cầu gà 0,5% vào các giếng phản ứng.
- Lắc nhẹ bằng tay hoặc bằng máy. Để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút.

Đọc kết quả.

Đọc kết quả:

- Phản ứng (-) : Hồng cầu lắng thành cục ở d- ới đáy giếng.
- Phản ứng (+): Xảy ra hiện tượng ng- ng kết: Hồng cầu ng- ng kết thành cụm lấm tấm đều ở đáy giếng.
- Đọc hiệu giá ng- ng kết: Hiệu giá ng- ng kết kháng nguyên đ- ọc đánh giá ở độ pha loãng cao nhất còn có phản ứng ng- ng kết xảy ra.

Từ kết quả thu đ- ọc, tiến hành chuẩn bị kháng nguyên 8 đơn vị HA để thực hiện phản ứng HI.

Phản ứng ức chế ng- ng kết hồng cầu (HI)

Nguyên liệu

+ ***Kháng nguyên H5*** là loại virus H5N1 phân lập tại Việt Nam đã đ- ọc vô hoạt (có so sánh với 2 loại kháng nguyên H5 khác do trung tâm kiểm soát dịch bệnh CDC - Hoa Kỳ) và một loại chế từ virus H5N2 do Viện thú y Đài Loan cung cấp .

+ ***Hồng cầu:*** Hỗn dịch hồng cầu gà 0,5%.

Gà trống khoẻ mạnh đã tr- ồng thành kiểm tra huyết thanh không có

kháng thể cúm và Newcastle, đ- ọc lấy máu ở tĩnh mạch cánh bằng seringer 5ml có chứa 1ml Natri citrat 5%.

Rửa hồng cầu: Cho PBS (pH 7,2) vào ống ly tâm chứa hồng cầu lắc nhẹ. Ly tâm 1000 - 1500 vòng/phút trong 10 phút. Đổ bỏ huyết t- ơng ở trên, cho PBS rửa hồng cầu tiếp 2 -3 lần đến khi dung dịch ở phía trên trong là đ- ọc.

Pha hồng cầu 0,5%: Đổ bỏ n- ớc trong ở trên, lấy 0,5ml hồng cầu cho vào 99,5ml PBS lắc đều. Bảo quản ở 40C có thể sử dụng trong khoảng 4 - 5 ngày.

+ **Huyết thanh:** huyết thanh làm phản ứng đ- ọc chất từ mẫu máu, vô hoạt 56°C/30 phút, bảo quản ở 4-8°C.

Tiến hành phản ứng HI:

- Cho 25µl PBS vào các giếng từ cột 1 đến cột 11 (Riêng cột 12 cho 50µl).
- Cho 25µl huyết thanh cần kiểm tra (theo thứ tự) vào các giếng từ A1 → H1
- Pha loãng huyết thanh: Lấy 25µl huyết thanh từ cột 1 chuyển sang cột 2 trộn đều với PBS của giếng, sau đó lại chuyển 25µl từ cột 2 sang cột 3 cứ nh- vậy huyết thanh đ- ọc pha loãng đến cột 11 thì dừng lại và giữ nguyên (dùng để đối chứng huyết thanh). Cột 12 dùng để đối chứng hồng cầu.

- Cho kháng nguyên 8 đơn vị HA đã chuẩn bị ở trên vào các giếng từ cột 1 đến cột 10 với l- ợng 25µl/giếng.

- Lắc đều, để ở nhiệt độ phòng 30 phút.

- Cho 50µl hỗn dịch hồng cầu gà 0,5% vào toàn bộ các giếng của đĩa.

Để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút.

Đọc kết quả khi cột đối chứng hồng cầu lắng hoàn toàn.

Đọc kết quả:

- Có kháng thể (+): Hồng cầu sẽ tụ ở đáy giếng giống đối chứng hồng cầu.

Hiệu giá kháng thể đ- ọc đánh giá ở độ pha loãng huyết thanh cao nhất còn có hiện t- ợng hồng cầu tụ lại ở đáy giếng.

- Không có kháng thể (-): Có hiện t- ợng ng- ng kết xảy ra ở giếng phản ứng, hồng cầu ng- ng kết thành cụm lấm tấm đều ở đáy giếng.

3.3.3. Xác định sự có mặt của virus cúm H5N1 bằng phản ứng RT - PCR.

Phản ứng RT - PCR: Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) là một kỹ thuật tiên tiến để giám định hệ gen của virus cúm thậm chí khi chúng chỉ có mặt với một l- ợng rất thấp. Do hệ gen của virus cúm là RNA đơn sợi âm, nên cần phải tổng hợp một bản sao DNA (cDNA) bổ sung với RNA của virus tr- ớc khi tiến hành nhân PCR. Men Reverse Transcriptase là một polymerase đ- ợc dùng để tổng hợp nên cDNA nh- vậy. Do đó quá trình nhân hệ gen RNA của virus cúm đ- ợc gọi là RT- PCR. Phản ứng RT-PCR cần có một cặp oligonucleotides, hoặc còn gọi là primer (cặp môi); 4 deoxyribonucleoside triphosphate (dNTPs); RNA khuôn mẫu, men Rt và Taq DNA polymerase. Hỗn hợp phản ứng tr- ớc tiên đ- ợc làm nóng tới 60⁰C, sau đó làm mát tới nhiệt độ 42⁰C để primer forward (tiến về tr- ớc) gắn vào chuỗi RNA đích. Primer đã gắn sau đó đ- ợc kéo dài ra với RT để tổng hợp cDNA có độ dài đầy đủ ở nhiệt độ 50⁰C. Hỗn hợp DNA/RNA sẽ trải qua 25 - 30 vòng gồm các giai đoạn tách sợi, gắn vào và kéo dài. Men Taq DNA là một loại men polymerase bền nhiệt không bị phá huỷ bởi nhiệt độ nóng và không cần phải thay thế ở mỗi vòng của chu trình nhân lên. Do sản phẩm của mỗi 1 vòng nhân lên sẽ làm khuôn mẫu cho vòng tiếp theo, nên mỗi vòng sẽ nhân đôi số sản phẩm DNA mong muốn.

Cặp primer đ- ợc sử dụng trong phản ứng PCR đ- ợc thiết kế dựa trên cơ sở của chuỗi gen đã biết. Do các chuỗi HA của các type/ subtyp của các virus cúm khác nhau cũng khác nhau nên có thể thiết kế các primer PCR để nhân lên một cách đặc hiệu của RNA của một type hoặc subtyp.

Mẫu bệnh phẩm đ- ợc sử dụng trong thí nghiệm là dịch ngoáy ở nhóp hoặc phân (đối với vịt 1 ngày tuổi).

Chiết tách ARN từ mẫu ngoáy dịch ở nhóp bằng TRIZOL, sử dụng bộ kit *SuperScript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq* của hãng *Invitrogen* để phát hiện ARN của virus.

Cặp môi đ- ợc sử dụng trong nghiên cứu này là cặp môi H5 Japan gồm:

H5-515F: CATACCCAACAATAAAGAGG

H5-1220R: GTGTTCATTTTGTTAATGAT

- Chạy điện di sản phẩm PCR

- Đọc kết quả của marker và vạch của sản phẩm PCR với đèn cực tím cầm tay có bước sóng 302nm.

- Ghi lại hình bằng máy ảnh

Quy trình thực hiện như sau:

Chiết tách RNA từ mẫu bệnh phẩm bằng TRIZOL

- Cho 100µl bệnh phẩm vào tuýp 1,5 ml

- Thêm 1ml TRIZOL, đảo đều.

- Giữ 5 phút ở nhiệt độ phòng.

- Thêm 0,2ml chloroform. Lắc ống trên máy lắc (Vortex) trong 15 giây.

Để ở nhiệt độ phòng 3 phút.

- Ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút.

- Hút 400 µl nước nổi sang tuýp 1,5 ml mới.

- Cho thêm 500 µl Isopropanol vào tuýp. Đảo đều, để ở nhiệt độ phòng 10 phút.

- Ly tâm 12000 vòng/phút trong 10 phút.

- Đổ bỏ phần nước nổi.

- Cho thêm 1 ml dung dịch Ethanol 75% vào, vortex thật kỹ để rửa sạch RNA.

- Ly tâm 7500 vòng/phút trong 5 phút. Đổ bỏ phần nước nổi.

- Để tuýp ở nhiệt độ phòng để Ethanol bay hơi hết.

- Cho 40 µl nước không có men RNase và DNase vào, trộn đều.

Tiến hành RT - PCR

- Đánh dấu các ống PCR theo ký hiệu mẫu nghiên cứu.

- Chuẩn bị hỗn hợp PCR như sau:

N-ước RNase-free 1,6 µl

RT/Plat Taq Mix	0,4 μ l
Primer	1,0 μ l
Dung dịch 2X Reaction Mix	5,0 μ l

- Nhỏ 8 μ l hỗn hợp trên vào mỗi ống PCR.

- Thêm 2 μ l RNA kiểm tra vào các ống kiểm tra.

Thêm 2 μ l RNA H5N1 vào ống đối chứng d- ơng.

2 μ l n- ớc RNase- free vào ống đối chứng âm.

- Ly tâm nhẹ để dịch tập trung xuống đáy ống

- Đặt các ống trong máy nhân gen. Đặt ch- ơng trình để nhân gen

1) 50⁰C trong 30 phút

2) 94⁰C trong 2 phút

3) 94⁰C trong 30 giây

4) 50⁰C trong 40 giây

5) 72⁰C trong 40 giây

6) 72⁰C trong 10 phút, quay lại b- ớc 3 (40 chu kỳ)

7) 4⁰C ∞

Chạy điện di sản phẩm PCR

Nguyên liệu:

- Khay đổ khuôn thạch và buồng điện di

- Nguồn điện và điện cực

- Đèn cực tím cầm tay (302mm) hoặc hộp đèn cực tím

- Máy ảnh và phim

- Pipette và đầu típ 10 μ l

- Thạch agarose 1,5% pha trong dung dịch TBE 1X

- Dung dịch TBE 1X

- Dung dịch Ethidium bromide (10 μ g/ μ l)

- Dung dịch nạp thạch (loading bufer) (GILB, 30%, glycerol, 0,25%)

BPB và 0,25% XC)

- Marker trọng lượng phân tử (thang DNA 100BP)
- ống microtube chứa sản phẩm PCR.
- RNA đối chứng dòng tính

Các bước tiến hành:

- Lấy miếng thạch 1,5% từ khuôn ra và đặt vào buồng điện di, đổ dung dịch TBE 1X che phủ lớp thạch.- Đánh dấu các ống ly tâm nhỏ 0,5ml theo mẫu.

- Lấy 5 µl các sản phẩm PCR từ các ống phản ứng cho vào các ống ly tâm nhỏ tương ứng, trộn với 2µl dung dịch nạp (GLB)

- Cho 5µl marker trọng lượng phân tử vào lỗ thứ nhất của miếng thạch 1,5%

- Cho 7µl sản phẩm PCR/GLB từ các ống ly tâm nhỏ vào các lỗ tiếp theo của miếng thạch theo thứ tự . 2 lỗ cuối cho sản phẩm đối chứng âm và đối chứng dòng.

- Đóng nắp buồng điện di và nối điện cực. Chạy điện di ở điện thế 120V trong 30 - 40 phút

- Đọc kết quả của marker và vạch của sản phẩm PCR với đèn cực tím cầm tay có bước sóng 302nm.

- Ghi lại hình bằng máy ảnh

3.3.4. Xử lý số liệu bằng phương pháp thống kê sinh học.

3.4. Bố trí thí nghiệm

Chúng tôi chọn các trại ngan, vịt nuôi trong hộ gia đình theo hình thức chăn thả. Nơi nuôi ngan, vịt cách xa khu dân cư 2 km.

Thí nghiệm 1: Khảo sát đáp ứng miễn dịch của vịt đẻ

Thời gian lấy mẫu (tuần sau tiêm)	Lô thí nghiệm (180 con)	Lô đối chứng (20 con)
0	Lấy 15 mẫu huyết thanh cùng	Lấy 15 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp
	Tiêm 1 ml vaccin H5N1 của Trung Quốc/vịt.	Không tiêm vaccin. Đánh dấu thả chung với vịt của lô thí nghiệm.
3	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp. Tiêm 1 ml vaccin H5N1 của Trung Quốc/vịt.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp. Không tiêm vaccin.
5	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
7	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
9	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
11	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
13	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.

Thí nghiệm 2: Khảo sát đáp ứng miễn dịch của vịt 15 ngày tuổi.

Thời gian lấy mẫu (tuần sau tiêm)	Lô thí nghiệm (270 con)	Lô đối chứng (30 con)
0	Lấy 15 mẫu huyết thanh cùng 15 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp	Không tiêm vaccin. Đánh dấu thả chung với vịt của lô thí nghiệm.
	Tiêm 0,5 ml vaccin H5N1 của Trung Quốc/vịt.	
3	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp. Tiêm 0,5 ml vaccin H5N1 của Trung Quốc/vịt.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp. Không tiêm vaccin.
5	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
7	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
9	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
11	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
13	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
15	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.

Thí nghiệm 3: Khảo sát đáp ứng miễn dịch của vịt con 1 ngày tuổi.

Thời gian lấy mẫu (tuần sau tiêm)	Lô thí nghiệm (180 con)	Lô đối chứng (20 con)
0	Lấy 15 mẫu huyết thanh cùng 15 mẫu ngoáy dịch ổ nhóp	
	Tiêm 0,5 ml vacxin H5N1 của Trung Quốc/vịt.	Không tiêm vacxin. Đánh dấu thả chung với vịt của lô thí nghiệm.
3	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp. Tiêm 0,5 ml vacxin H5N1 của Trung Quốc/vịt.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp. Không tiêm vacxin.
5	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
7	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
9	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
11	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.

Thí nghiệm 4: Khảo sát đáp ứng miễn dịch của gan 15 ngày tuổi.

Thời gian lấy mẫu (tuần sau tiêm)	Lô thí nghiệm (120 con)	Lô đối chứng (30 con)
0	Lấy 15 mẫu huyết thanh cùng	15 mẫu ngoáy dịch ổ nhóp
	Tiêm 0,5 ml vacxin H5N1 của Trung Quốc/ngan.	Không tiêm vacxin. Đánh dấu thả chung với vịt của lô thí nghiệm.
3	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp. Tiêm 0,5 ml vacxin H5N1 của Trung Quốc/ngan.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp. Không tiêm vacxin.
5	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
7	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
9	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
11	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
13	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.
15	Lấy 30 mẫu huyết thanh, 30 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.	Lấy 10 mẫu huyết thanh, 10 mẫu dịch ngoáy ổ nhóp.

4. Kết quả và thảo luận

4.1. Kết quả khảo sát đáp ứng miễn dịch đối với đàn vịt đẻ

4.1.1 Kết quả kiểm tra sự có mặt của virus H5 trong đàn vịt đẻ tr-ớc và sau khi tiêm vaccin

Mẫu dịch ngoáy ổ nhóp đ-ợc thu thập đồng thời với những lần lấy mẫu huyết thanh, để xác định xem virus H5 có l-u hành trong đàn vịt trong suốt thời gian tiến hành thí nghiệm hay không. Sự có mặt của virus đ-ợc xác định sự bằng phản ứng RT-PCR. Kết quả đ-ợc trình bày tại bảng 4.1.

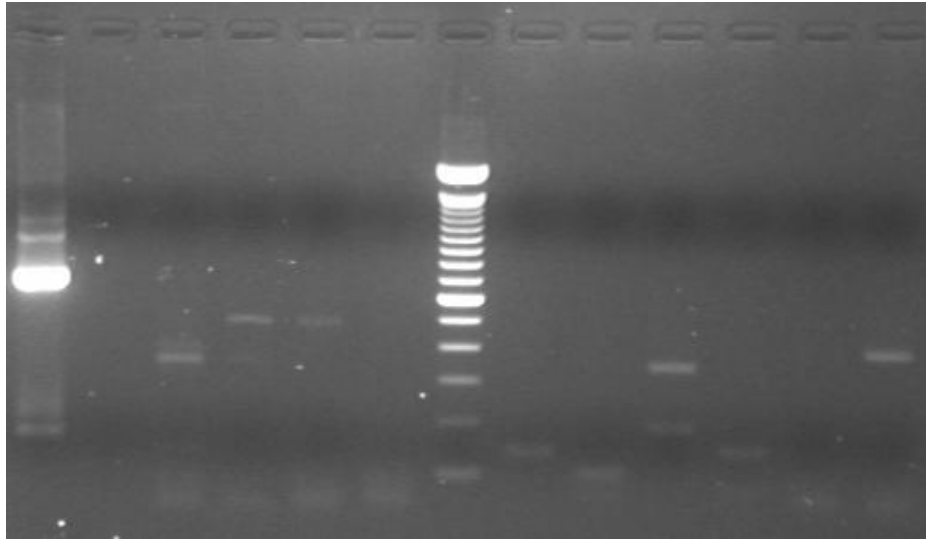
Bảng 4.1. Kết quả xác định sự có mặt của virus trong dịch ngoáy ổ nhóp của vịt đẻ bằng kỹ thuật RT-PCR

Thời điểm lấy mẫu (tuần sau tiêm vaccin)	Lô thí nghiệm		Lô đối chứng	
	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu có virus	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu có virus
0	15	0	15	0
3	30	0	10	0
5	30	0	10	0
7	30	0	10	0
9	30	0	10	0
11	30	0	10	0
13	30	0	10	0

Kết quả ở bảng 4.1 cho thấy, ở thời điểm bắt đầu làm thí nghiệm, qua xét nghiệm không có sự l-u hành của virus cúm H5N1 ở cả lô vịt thí nghiệm và lô vịt đối chứng.

Từ sau khi tiêm vaccin cho tới khi kết thúc thí nghiệm, không phát hiện thấy sự hiện diện của virus cúm gia cầm ở cả vịt tiêm chủng và vịt đối chứng.





Hình 4.1. Kết quả xác định virus H5 trong đàn vịt đẻ bằng phản ứng RT - PCR.

4.1.2. Kết quả kiểm tra kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt đẻ trước khi tiêm vaccin

Để đánh giá tình trạng miễn dịch chống virus H5 của đàn vịt đẻ trước khi tiêm vaccin, 15 mẫu huyết thanh được thu thập và kiểm tra hiệu giá kháng thể bằng phản ứng HI. Kết quả cho thấy không có vịt nào trong số 15 vịt được kiểm tra có kháng thể kháng virus H5.

Trên cơ sở đàn vịt không có kháng thể và cũng không mang virus, tiến hành tiêm vaccin cho 180 con với liều 1 ml/vịt, 20 con dùng làm đối chứng được đánh dấu và thả chung vào đàn.

4.1.3. Kết quả kiểm tra kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt đẻ sau khi tiêm vaccin

Theo hướng dẫn của nhà sản xuất vaccin, cùng với quyết định số 1715 của BNN&PTNT[4], vịt phải được tiêm vaccin mũi thứ 2 sau mũi thứ nhất 3 tuần. Trước khi tiêm mũi vaccin này, đã lấy huyết thanh của 30 vịt trong lô thí nghiệm và 10 vịt ở lô đối chứng để kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5. Tiến hành lấy mẫu huyết thanh tại các thời điểm 5, 7, 9, 11, 13 tuần sau khi tiêm vaccin để khảo sát biến động hiệu giá kháng thể của đàn vịt. Kết quả được trình bày trong bảng 4.2.

Kết quả trong bảng 4.2 cho thấy, vịt đẻ có đáp ứng miễn dịch đối với vaccin cúm gia cầm vô hoạt nhũ dầu H5N1. Tại thời điểm 21 ngày sau tiêm mũi thứ nhất đã có 18/30 vịt có kháng thể trong huyết thanh, tỷ lệ chuyển đổi đạt 60%. Hiệu giá kháng thể dao động từ 1 - 3 log₂, trong đó có 6/30 mẫu đạt hiệu giá 3 log₂ trong khi 100% số vịt đối chứng không có kháng thể. Hiệu giá trung bình toàn bộ số vịt được kiểm tra chỉ đạt $1,23 \pm 0,22 \log_2$ sau khi tiêm phòng lần một.

Cho đến nay vẫn chưa có tài liệu nào đề cập đến vấn đề này, vịt sẽ được bảo hộ với mức hiệu giá kháng thể là bao nhiêu. Theo Caroline Yuen[5], Qiao[90], Seo[92], Swayne[96], [97], Tian G[101] cùng kết quả thí nghiệm của hãng Merial[20] và tiêu chuẩn ngành 10TCN[3] của Bộ NN&PTNT thì gà sau khi tiêm phòng có hiệu giá kháng thể > 3 log₂ có thể được bảo hộ chống lại bệnh cúm gia cầm. So với tiêu chuẩn nói trên, đàn vịt ch- a có lượng kháng thể đủ bảo hộ bệnh nếu có H5N1 tấn công.

Tại thời điểm 2 tuần sau khi tiêm mũi vaccin thứ 2, tình trạng miễn dịch của đàn vịt tăng lên đáng kể. Đã có 25/30 mẫu được kiểm tra có hiệu giá kháng thể dao động từ 1 đến 5 log₂. Hiệu giá kháng thể trong huyết thanh vịt cũng tăng lên, chủ yếu là vịt có hiệu giá HI = 3log₂ (chiếm tỷ lệ 36,67%) và đã có 6,67% số vịt được kiểm tra đạt mức hiệu giá HI = 5 log₂. Vì vậy, dù mức hiệu giá trung bình chỉ đạt $2,40 \pm 0,28 \log_2$ nhưng đã có 23,33% số vịt được bảo hộ.

**Bảng 4.2. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5
trong huyết thanh của vịt đẻ đ- ọc tiêm vaccin H5N1**

Lô vịt	T. gian lấy mẫu (tuần sau tiêm)	Số mẫu kiểm tra	Hiệu giá kháng thể (log2)									Hiệu giá trung bình (log2)	Tỷ lệ vịt có kháng thể (%)	Tỷ lệ bảo hộ (%)
			0	1	2	3	4	5	6	7	8			
Lô thí nghiệm	0	15	15									0		0
	3	30	12	5	7	6						1,23 ± 0,22	60	0
	5	30	5	4	4	10	5	2				2,40 ± 0,28	83,33	23,33
	7	30	1	3	3	3	8	10	2			3,73 ± 0,29	96,67	66,67
	9	30	0	0	0	3	5	7	6	6	3	5,53 ± 0,27	100	90
	11	30	0	1	3	2	5	10	7	2		4,63 ± 0,29	100	80
	13	30	3	2	3	6	5	9	1	1		3,7 ± 0,33	90	53,33
Lô đối chứng	0	10	10									0	0	0
	3	10	10									0	0	0
	5	10	10									0	0	0
	7	10	10									0	0	0
	9	10	10									0	0	0
	11	10	10									0	0	0
	13	10	10									0	0	0

Tình trạng miễn dịch của đàn vịt tiếp tục tăng cao, tại thời điểm 7 tuần sau tiêm vaccin chỉ còn 1/30 mẫu không có kháng thể. Số mẫu có hiệu giá kháng thể cao tăng lên (có 12/30 mẫu đạt hiệu giá $\geq 5 \log_2$, chiếm tỷ lệ 40% số mẫu đ- ợc kiểm tra). Hiệu giá kháng thể trung bình và tỷ lệ bảo hộ cũng tăng lên t- ong úng. Đã có 6,67% số vịt có kháng thể ở mức hiệu giá HI = $6 \log_2$.

Kết quả kiểm tra mẫu huyết thanh tại thời điểm 9 tuần sau khi tiêm vaccin rất khả quan khi tất cả các mẫu huyết thanh đ- ợc xét nghiệm đều có kháng thể với hiệu giá thấp nhất là $3 \log_2$. Có 3/30 mẫu đạt hiệu giá $8 \log_2$, đ- a mức hiệu giá bình quân lên $5,53 \pm 0,27 \log_2$. So với tiêu chuẩn nêu trên thì tại thời điểm này đã có 90% số vịt thí nghiệm đã đ- ợc bảo hộ chống lại bệnh cúm gia cầm do H5 gây ra.

Cũng tại thời điểm 9 tuần sau tiêm vaccin, số cá thể vịt có hiệu giá kháng thể HI = $5 \log_2$ vẫn chiếm tỷ lệ cao nhất trong lô thí nghiệm. Số vịt có hiệu gia kháng thể cao (HI $\geq 6 \log_2$) đã tăng lên, chiếm tỷ lệ 50% số mẫu đ- ợc kiểm tra.

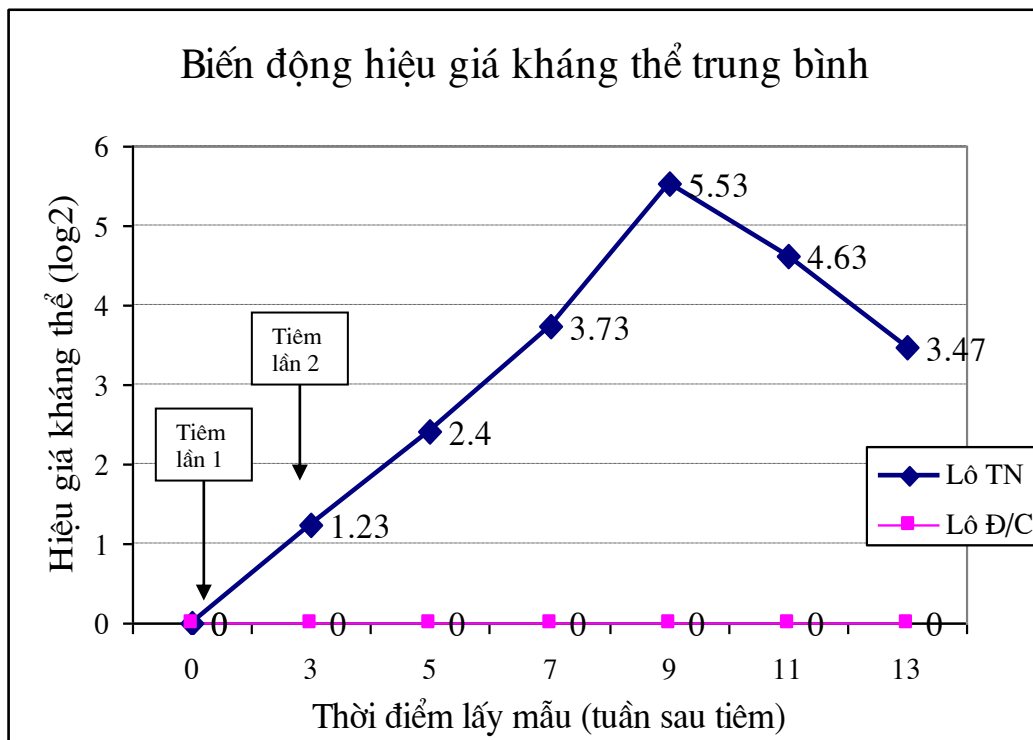
Kết quả kiểm tra ở 11 tuần sau tiêm vaccin cho thấy l- ợng kháng thể trong huyết thanh của vịt đã bắt đầu giảm xuống. Không còn mẫu nào đạt hiệu giá $8 \log_2$. Số mẫu đạt $7 \log_2$ cũng đã giảm từ 20% xuống còn 6,67%. Dù hiệu giá kháng thể trung bình vẫn đạt $4,63 \pm 0,29 \log_2$, nh- ng đã có 6 mẫu tuy còn kháng thể nh- ng không đủ bảo hộ cho vịt chống lại virus H5N1.

L- ợng kháng thể tiếp tục giảm dần, tại thời điểm 13 tuần sau tiêm đã có 3/30 mẫu không còn kháng thể. Số mẫu đạt hiệu giá $\geq 6 \log_2$ chỉ còn 2/30 mẫu. Dù tỷ lệ chuyển d- ợng vẫn đạt 90% nh- ng tỷ lệ bảo hộ chỉ đạt 53,33% số mẫu kiểm tra.

Các số liệu trên cho thấy vịt đ- ể có phản ứng miễn dịch khá tốt với vaccin cúm gia cầm vô hoạt nhũ dầu H5N1. 3 tuần sau khi tiêm mũi vaccin thứ nhất vịt đã sản sinh kháng thể với hiệu giá trung bình $1,23 \pm 0,22 \log_2$.

Sau khi tiêm nhắc lại l- ượng kháng thể tiếp tục tăng lên, đạt giá trị cao nhất ở tuần thứ 6 rồi bắt đầu giảm xuống. Khi kết thúc thí nghiệm ở tuần thứ 13 sau tiêm vaccin hiệu giá trung bình chỉ còn $3,7 \pm 0,33 \log_2$.

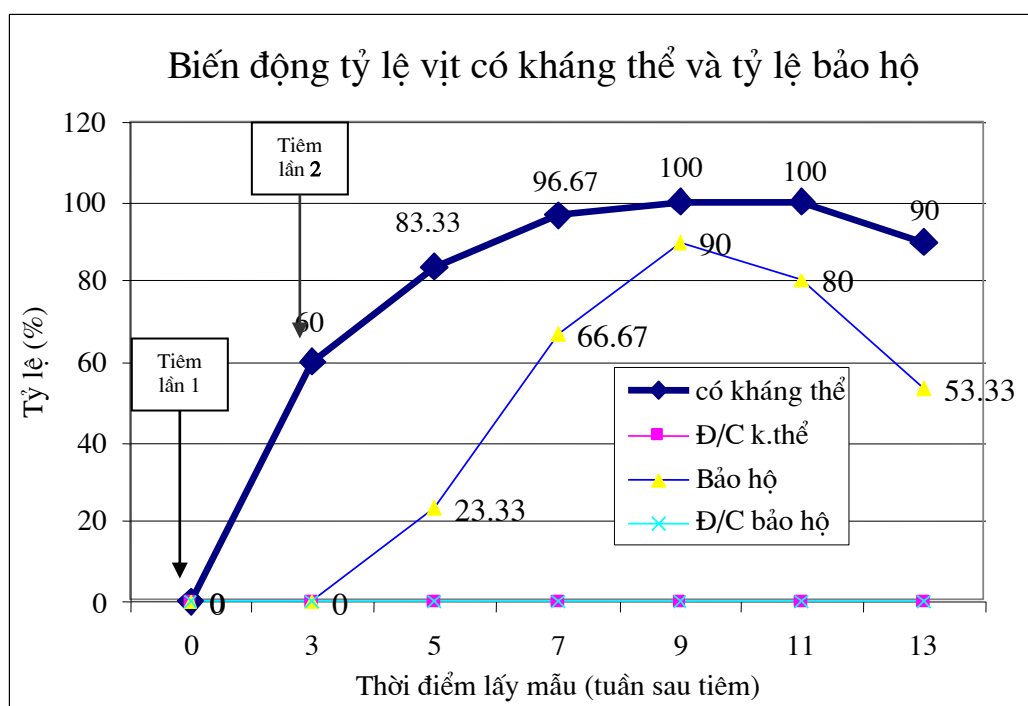
Để thấy rõ hơn biến động hàm l- ượng kháng thể kháng virus H5 ở đàn vịt đẻ sau tiêm phòng, chúng tôi thể hiện kết quả trên hình 4.2.



Hình 4.2. Biến động hiệu giá kháng thể trung bình của đàn vịt đẻ sau khi tiêm vaccin cúm gia cầm H5N1

Hình 4.2 cho thấy vịt đẻ có đáp ứng miễn dịch khi đ- ợc tiêm vaccin cúm gia cầm H5N1. Sau khi tiêm, vịt sản sinh kháng thể. Hiệu giá kháng thể tăng lên từ từ. Tại thời điểm 3 tuần sau khi tiêm, trong huyết thanh vịt đã xuất hiện kháng thể dù với hiệu giá còn thấp. Kiểm tra 30 mẫu đã có 18 mẫu có kháng thể, hiệu giá trung bình chỉ đạt $1,23 \pm 0,22 \log_2$. Sau 2 tuần kể từ khi tiêm vaccin nhắc lại hiệu giá kháng thể đã tăng lên đáng kể với mức bình

quân $2,40 \pm 0,28 \log_2$. Hiệu giá kháng thể tiếp tục tăng lên, đạt mức bình quân $5,53 \pm 0,27 \log_2$ tại thời điểm 9 tuần sau khi tiêm vaccin. Sau 6 tuần kể từ khi tiêm nhắc lại lần 2 hiệu giá kháng thể trong đàn vịt đ-ợc tiêm vaccin cúm gia cầm bắt đầu giảm xuống, hiệu giá bình quân chỉ còn $4,63 \pm 0,29 \log_2$. Hiện tượng này càng rõ hơn ở thời điểm 13 tuần sau tiêm vaccin với hiệu giá trung bình chỉ còn $3,7 \pm 0,33 \log_2$ và có tới 3 mẫu không phát hiện đ-ợc kháng thể/ 30 mẫu kiểm tra.



Hình 4.3: Sự biến động của tỷ lệ vịt có kháng thể và tỷ lệ bảo hộ sau khi tiêm vaccin cúm gia cầm H5N1 cho vịt đ-ợc

Trên hình 4.3, đ-ờng liền màu xanh, nét đậm biểu thị tỷ lệ vịt có kháng thể của lô thí nghiệm, đ-ờng liền màu đỏ biểu thị tỷ lệ vịt có kháng thể của lô đối chứng. Đ-ờng liền màu xanh d-ong, nét nhỏ biểu thị tỷ lệ vịt đ-ợc bảo hộ của lô thí nghiệm, đ-ờng liền màu xanh nhạt biểu thị tỷ lệ vịt đ-ợc bảo hộ của lô đối chứng.

Hình 4.3 thể hiện vịt đ-ợc có đáp ứng miễn dịch khi đ-ợc tiêm vaccin

H5N1. Tại thời điểm 3 tuần sau khi tiêm mũi vaccin đầu tiên đã có tới 60% số vịt đ-ợc kiểm tra sản sinh kháng thể kháng virus H5. Tuy nhiên, l-ợng kháng thể mới ở mức thấp nên ch- a có cá thể vịt nào đ-ợc bảo hộ chống lại bệnh do virus cúm gia cầm H5 gây ra.

Sau 2 tuần kể từ khi tiêm vaccin nhắc lại, đáp ứng miễn dịch của đàn vịt đã tăng lên đáng kể, với 83,33% số vịt có kháng thể trong đó 23,33% số vịt có kháng thể đủ bảo hộ. Sau 9 tuần kể từ khi tiêm mũi vaccin đầu tiên, l-ợng kháng thể trong đàn vịt đ-ợc tiêm vaccin cúm gia cầm bắt đầu giảm xuống. Kiểm tra hiệu giá kháng thể trong huyết thanh tại thời điểm 11 tuần đã thấy 6/30 mẫu không còn đủ kháng thể để bảo hộ. Hiện tượng này càng rõ hơn ở thời điểm 13 tuần sau tiêm vaccin, với tỷ lệ vịt có kháng thể còn tới 90% nh- ng tỷ lệ bảo hộ chỉ đạt 53,33%.

Theo kinh nghiệm của Hong Kong[5] và Trung Quốc[17] khi 70% số gà trong đàn có hiệu giá kháng thể $> 3 \log_2$ thì đàn gà đó đạt mức kháng thể bảo hộ. Nh- vậy, nếu so với những kết quả đ-ợc thể hiện trên đồ thị thì đàn vịt thí nghiệm chỉ đ-ợc bảo hộ chống bệnh cúm gia cầm do virus H5 gây ra trong khoảng 7 đến 11 tuần sau khi tiêm vaccin.

4.2. Kết quả khảo sát đáp ứng miễn dịch đối với đàn vịt đ-ợc tiêm mũi vaccin đầu tiên lúc 15 ngày tuổi

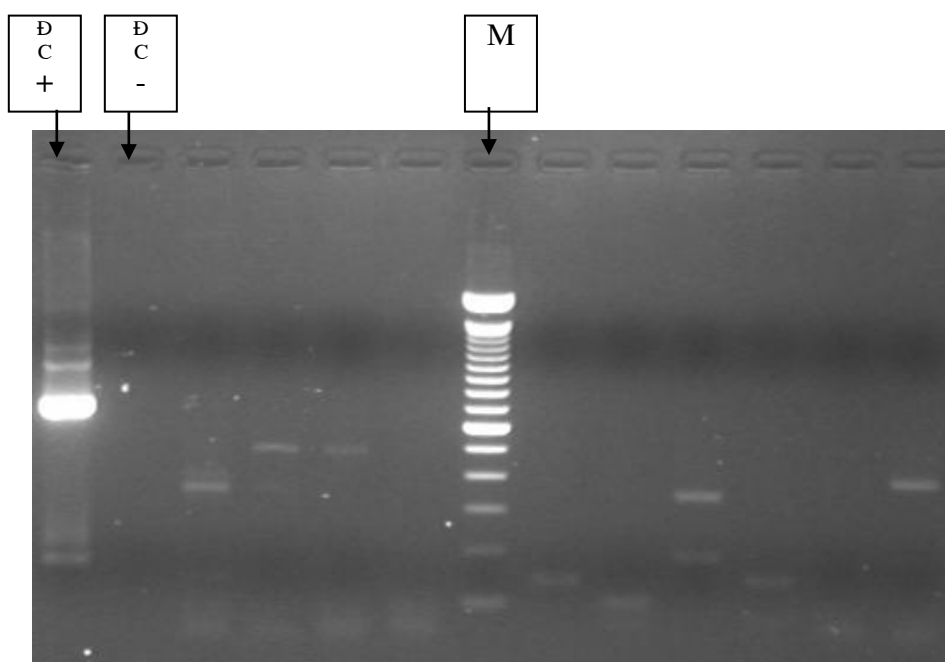
4.2.1 Kết quả kiểm tra sự l- u hành của virus H5 trong đàn vịt 15 ngày tuổi tr- ớc và sau khi tiêm vaccin

Cũng nh- ở thí nghiệm tr- ớc, mẫu dịch ngoáy ở nhóp đ-ợc thu thập đồng thời với những lần lấy mẫu huyết thanh, để xác định xem virus H5 có l- u hành trong đàn vịt trong suốt thời gian tiến hành thí nghiệm hay không. Sự có mặt của virus đ-ợc xác định sự bằng phản ứng RT-PCR. Kết quả đ-ợc trình bày tại bảng 4.3

Kết quả ở bảng 4.3 cho thấy, ở thời điểm bắt đầu làm thí nghiệm, qua xét nghiệm không có sự l- u hành của virus cúm H5N1 ở cả lô vịt thí nghiệm và lô vịt đối chứng.

Bảng 4.3. Kết quả xác định sự có mặt của virus trong dịch ngoáy ở nhóp của vịt 15 ngày tuổi bằng kỹ thuật RT-PCR.

Thời điểm lấy mẫu (tuần sau tiêm vaccin)	Lô thí nghiệm		Lô đối chứng	
	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu có virus	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu có virus
0	15	0	15	0
3	30	0	10	0
5	30	0	10	0
7	30	0	10	0
9	30	0	10	0
11	30	0	10	0
13	30	0	10	0
15	30	0	10	0



Hình 4.4. Kết quả xác định virus H5 trong đàn vịt 15 ngày tuổi bằng phản ứng RT - PCR.

Từ sau khi tiêm vaccin cho tới khi kết thúc thí nghiệm đã không phát hiện thấy sự hiện diện của virus cúm gia cầm ở cả vịt tiêm chủng và vịt đối chứng.

4.2.2. Kết quả kiểm tra kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt 15 ngày tuổi trước khi tiêm vaccin

Để đánh giá tình trạng miễn dịch chống virus H5 của đàn vịt 15 ngày tuổi trước khi tiêm vaccin, 15 mẫu huyết thanh được thu thập và kiểm tra hiệu giá kháng thể bằng phản ứng HI.

Kết quả kiểm tra cho thấy ngay từ khi ch- a tiêm vaccin, trong huyết thanh của vịt đã có kháng thể chống lại kháng nguyên H5 với sự phân bố không đồng đều trong đàn. Có tới 60% số vịt được kiểm tra có kháng thể nhưng tỷ lệ bảo hộ chỉ đạt 6.67 % và không phát hiện thấy virus cúm gia cầm H5N1 trong đàn. Kết quả được trình bày trong bảng 4.4.

Bảng 4.4 Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh vịt 15 ngày tuổi trước khi tiêm vaccin

Lô vịt	Số mẫu kiểm tra	Hiệu giá kháng thể (log2)						Hiệu giá trung bình (log2)	Tỷ lệ vịt có kháng thể (%)	Tỷ lệ bảo hộ (%)
		0	1	2	3	4	5			
Lô TN	15	6	2	3	3	1	1,4 ± 0,36	60	6,67	
Lô ĐC	15	6	2	3	3	1	1,4 ± 0,36	60	6,67	

Vấn đề cần quan tâm là những đàn vịt có kháng thể ở giai đoạn 15 ngày tuổi có đáp ứng miễn dịch với vaccin hay không. Trong thực tế sản xuất có thể có các đàn vịt như vậy thì chúng ta có nên tiêm vaccin hay không. Để giải quyết vấn đề này chúng tôi tiến hành thí nghiệm tiêm vaccin cho 270 con với liều 0,5 ml/vịt, 30 con dùng làm đối chứng được đánh dấu và thả chung vào đàn.

4.2.3. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt 15 ngày tuổi sau khi tiêm vaccin

3 tuần sau khi tiêm mũi vaccin đầu tiên, lấy mẫu xét nghiệm đồng thời tiêm vaccin nhắc lại cho đàn vịt với liều 0,5 ml/ vịt. Tiến hành lấy mẫu huyết thanh tại các thời điểm 5, 7, 9, 11, 13, 15 tuần sau tiêm vaccin để khảo sát khả năng đáp ứng miễn dịch của đàn vịt với vaccin. Kết quả được trình bày trong bảng 4.5.

Kết quả bảng 4.5 cho thấy, tại thời điểm 3 tuần sau khi tiêm mũi vaccin thứ nhất cả lô vịt thí nghiệm và lô đối chứng đều có kháng thể nh-ng mức độ kháng thể của lô thí nghiệm cao hơn, đã có 30% số vịt được kiểm tra có kháng thể đủ bảo hộ trong khi đó lượng kháng thể ở lô đối chứng có dấu hiệu giảm đi, hiệu giá cao nhất cũng chỉ đạt 3 log₂. Với mức hiệu giá này thì dù còn 60% số vịt được kiểm tra có kháng thể nh-ng không vịt nào trong lô đối chứng được bảo hộ chống lại bệnh cúm do virus H5 gây ra.

ở thời điểm 5 tuần sau khi tiêm vaccin, tình trạng miễn dịch của đàn vịt thí nghiệm tăng lên đáng kể. Có tới 29/30 mẫu được kiểm tra có kháng thể (chiếm 96,67%), hiệu giá kháng thể dao động từ 1 đến 5 log₂, tập trung ở mức hiệu giá 4 - 5 log₂. Hiệu giá kháng thể trung bình đạt $3,63 \pm 0,24$ log₂ và 66,67% số vịt được bảo hộ. Ngược lại, ở lô đối chứng chỉ có 40% số vịt được kiểm tra có kháng thể và hiệu giá kháng thể rất thấp (cao nhất cũng chỉ đạt 2 log₂). Các số liệu trên thể hiện sự khác biệt rõ ràng giữa 2 lô vịt. Trong khi kháng thể kháng H5 của lô đối chứng chỉ đạt cao nhất là 2 log₂ thì hiệu giá cao nhất ở lô thí nghiệm là 5 log₂.

7 tuần sau khi tiêm vaccin, đã có 100% vịt trong lô thí nghiệm sản sinh kháng thể kháng virus H5. Số cá thể có hiệu giá kháng thể cao đã tăng lên, trong đó số vịt có hiệu giá kháng thể từ 3 đến 5 log₂ chiếm tỷ lệ nhiều nhất.

Bảng 4.5. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt đ- ợc tiêm vaccin lần 1 lúc 15 ngày tuổi

Lô vịt	T. gian lấy mẫu (tuần sau tiêm)	Số mẫu kiểm tra	Hiệu giá kháng thể (log2)							Hiệu giá trung bình (log2)	Tỷ lệ vịt có kháng thể (%)	Tỷ lệ bảo hộ (%)
			0	1	2	3	4	5	6			
Lô thí nghiệm	0	15	6	2	3	3	1			1,40 ± 0,36	60	6,67
	3	30	3	2	4	12	6	3		2,83 ± 0,25	76,67	30
	5	30	1	2	2	5	12	8		3,63 ± 0,24	96,67	66,67
	7	30	0	1	1	8	9	8	3	4,03 ± 0,22	100	66,67
	9	30	0	0	2	8	6	9	5	4,23 ± 0,22	100	66,67
	11	30	1	2	4	6	10	4	3	3,53 ± 0,27	96,67	56,67
	13	30	3	2	4	10	8	3		2,90 ± 0,26	90	36,37
	15	30	6	3	7	11	3			2,07 ± 0,24	80	10
Lô đối chứng	0	15	6	2	3	3	1			1,40 ± 0,36	60	6,67
	3	10	4	2	2	2				1,20 ± 0,39	60	0
	5	10	6	2	2					0,60 ± 0,27	40	0
	7	10								0	0	0
	9	10								0	0	0
	11	10								0	0	0
	13	10								0	0	0
	15	10								0	0	0

Hiệu giá kháng thể trung bình đạt $4,03 \pm 0,22 \log_2$. Có 66,67% số vịt đ-ợc kiểm tra đạt mức bảo hộ chống lại H5. Trong khi đó toàn bộ số mẫu của lô đối chứng đều không phát hiện đ-ợc kháng thể.

Tại thời điểm 9 tuần sau tiêm vaccin, tất cả các mẫu của lô thí nghiệm đều có kháng thể. Số vịt có hiệu giá kháng thể $HI = 5 \log_2$ chiếm tỷ lệ cao nhất (30%). Bên cạnh đó, số vịt có hiệu giá $HI = 6 \log_2$ cũng tăng cao hơn 2 tuần tr-ớc đó (16,67% so với 10%). Tuy nhiên vẫn còn 10 mẫu l-ợng kháng thể không đủ bảo hộ chống lại H5.

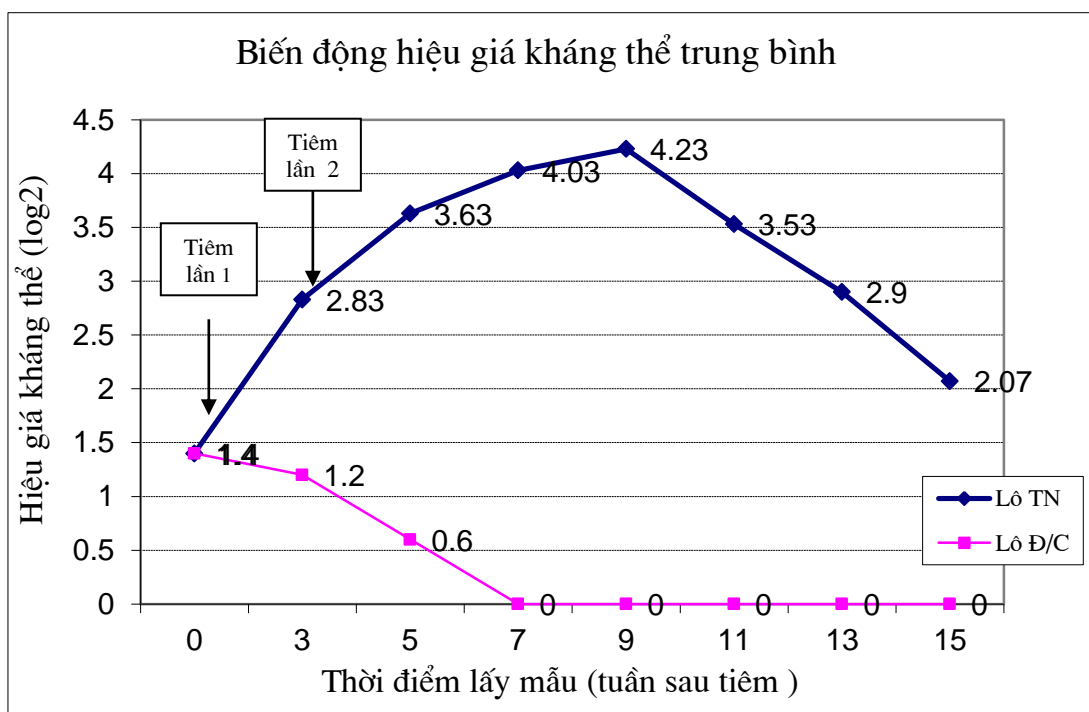
Sau 11 tuần kể từ khi tiêm mũi vaccin đầu tiên, đáp ứng miễn dịch của đàn vịt có khuynh h-ớng giảm xuống. Số vịt có hiệu giá kháng thể $HI \geq 5 \log_2$ chỉ còn bằng 1/2 so với 2 tuần tr-ớc đó (23,33% so với 46,67%). Hiệu giá kháng thể bình quân chỉ còn $3,53 \pm 0,27 \log_2$. Đã có 13/30 vịt không đ-ợc bảo hộ trong đó 1 vịt không phát hiện đ-ợc kháng thể.

Kết quả xét nghiệm huyết thanh tại thời điểm 13 tuần sau tiêm vaccin cho thấy sự đáp ứng miễn dịch đã giảm rõ rệt cả về số vịt có kháng thể và mức hiệu giá kháng thể. Tuy rất nhiều vịt trong đàn vẫn còn kháng thể nh- ng số vịt có kháng thể tập trung ở mức hiệu giá thấp, đã có tới 63,33% số vịt đ-ợc kiểm tra không đ-ợc bảo hộ. Trong trạng thái này đàn vịt dễ bị tác động bởi virus H5 có mặt trong môi tr-ờng.

Hiệu giá kháng thể của đàn vịt giảm còn rất thấp tại thời điểm 15 tuần sau khi tiêm vaccin với chỉ số bình quân chỉ còn $2,07 \pm 0,24 \log_2$. Tuy còn nhiều vịt (80%) có kháng thể nh- ng đa số chúng không đủ bảo hộ. Giai đoạn này đàn vịt đang trong tình trạng rất dễ bị virus H5N1 độc lực cao tấn công.

Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt đ-ợc tiêm vaccin lúc 15 ngày tuổi cho thấy, ngay từ khi ch-a tiêm vaccin, trong huyết thanh vịt đã có kháng thể kháng virus H5 với sự phân bố không đồng đều trong đàn. Hiệu giá kháng thể dao động từ 1 - 4 \log_2 , trong đó có 1 mẫu có hiệu giá kháng thể đạt ng-ỡng bảo hộ, chiếm tỷ lệ 6,67%.

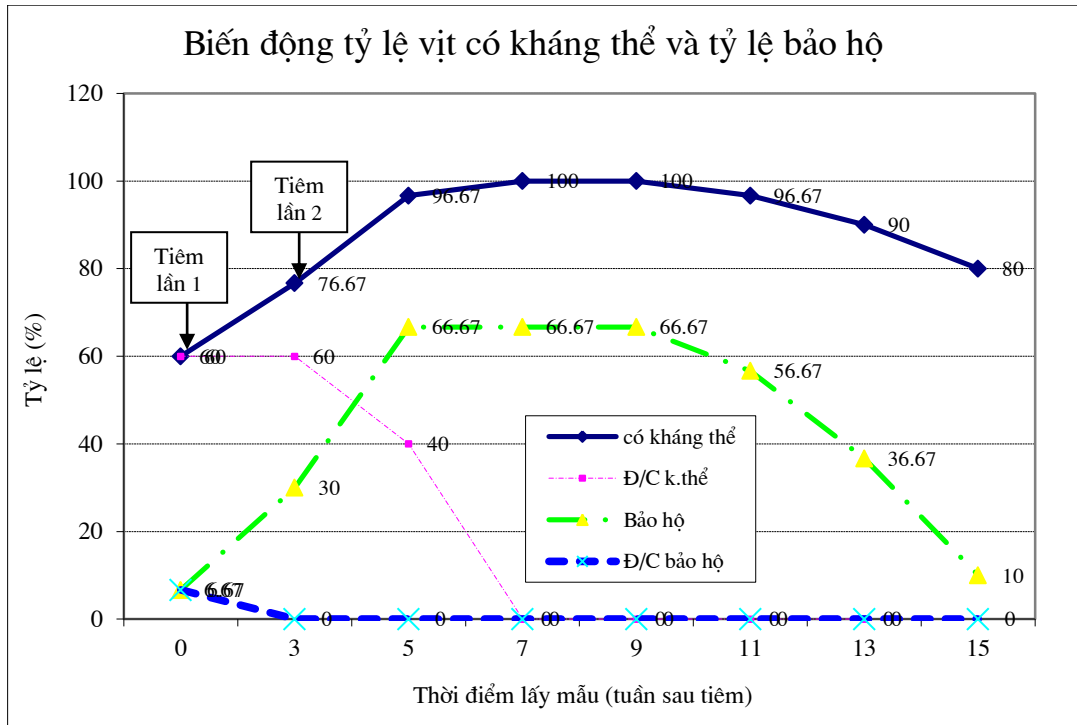
Sau khi tiêm vaccin, hiệu giá kháng thể của lô vịt đ-ợc tiêm tăng lên đạt mức $4,23 \pm 0,22 \log_2$ tại thời điểm 9 tuần sau khi tiêm rồi giảm dần. Đến 15 tuần sau tiêm mũi vaccin đầu tiên hiệu giá kháng thể chỉ còn $2,07 \pm 0,24 \log_2$. Trong khi đó ở lô vịt đối chứng chỉ còn phát hiện đ-ợc 4/10 mẫu có kháng thể tại thời điểm 5 tuần sau khi tiêm với hiệu giá rất thấp ($1-2 \log_2$). Từ đó đến khi kết thúc thí nghiệm tại tuần thứ 15 sau tiêm không phát hiện đ-ợc kháng thể kháng virus H5 trong bất kỳ mẫu huyết thanh nào của lô vịt đối chứng. Để thấy rõ hơn biến động hàm l-ợng kháng thể kháng virus H5 ở đàn vịt đ-ợc tiêm phòng lúc 15 ngày tuổi, chúng tôi thể hiện kết quả trên hình 4.5.



Hình 4.5: Sự biến động hiệu giá kháng thể trung bình của vịt đ-ợc tiêm mũi vaccin H5N1 đầu tiên lúc 15 ngày tuổi

Hình 4.5 cho thấy đàn vịt 15 ngày tuổi có đáp ứng miễn dịch trung bình khi đ-ợc tiêm vaccin vô hoạt nhũ dầu H5N1, tiêm 2 mũi cách nhau 3 tuần. Sau khi tiêm, hiệu giá kháng thể tăng lên từ từ. Mức hiệu giá kháng thể trung bình cao nhất cũng chỉ bằng $4,23 \pm 0,22 \log_2$ đạt đ-ợc ở tuần thứ 9 rồi giảm

dần. Khi kết thúc thí nghiệm ở tuần thứ 15 sau tiêm mũi vaccin đầu tiên hiệu giá kháng thể trung bình chỉ còn $2,07 \pm 0,24 \log_2$. Hàm lượng kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt đối chứng giảm chậm. Đến 7 tuần sau khi tiêm vaccin đã không phát hiện được kháng thể trong huyết thanh của vịt đối chứng.



Hình 4.6: Sự biến động của tỷ lệ vịt có kháng thể và tỷ lệ bảo hộ sau khi tiêm vaccin cúm gia cầm H5N1 cho vịt lúc 15 ngày tuổi

Trên hình 4.6, đường liền màu xanh đậm biểu thị tỷ lệ vịt có kháng thể của lô thí nghiệm; đường đứt nét màu đỏ biểu thị tỷ lệ vịt có kháng thể của lô đối chứng. Đường đứt nét màu xanh lá cây biểu thị tỷ lệ vịt được bảo hộ của lô thí nghiệm; đường đứt nét màu xanh dương biểu thị tỷ lệ vịt được bảo hộ của lô đối chứng.

Hình 4.6 cho thấy tại thời điểm tiêm mũi vaccin đầu tiên dù đàn vịt đã có kháng thể nhưng tỷ lệ bảo hộ thấp. Trong số 60% vịt có kháng thể thì chỉ

có 6,67% đ- ợc bảo hộ. Sau khi tiêm vaccin, tỷ lệ vịt có kháng thể và tỷ lệ bảo hộ đều tăng lên ở lô thí nghiệm. Ng- ợc lại, ở lô đối chứng, tại tuần thứ 3 sau khi tiêm mũi vaccin đầu tiên, dù còn tới 60% số vịt có kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh nh- ng không vịt nào có hiệu giá kháng thể đủ để bảo hộ chống bệnh do H5 gây ra. Trong thí nghiệm này chúng tôi thấy rằng số vịt đ- ợc bảo hộ cao nhất cũng chỉ đạt 66,67%; kéo dài từ tuần thứ 5 đến tuần thứ 9 sau khi tiêm vaccin. Kết quả trên hình 4.6 cũng thể hiện ngay từ khi tiêm mũi vaccin thứ 2 đến khi kết thúc thí nghiệm tại tuần thứ 15 đã có từ 10% đến 66,67% số vịt đ- ợc bảo hộ nh- ng nhìn chung đáp ứng miễn dịch của đàn vịt vẫn ch- a đủ để bảo hộ cho cả đàn chống lại bệnh do virus H5 gây ra.

4.3. Kết quả khảo sát đáp ứng miễn dịch đối với đàn vịt đ- ợc tiêm mũi vaccin đầu tiên lúc 1 ngày tuổi

4.3.1 Kết quả kiểm tra sự có mặt của virus H5 trong đàn vịt 1 ngày tuổi tr- ớc và sau khi tiêm vaccin

Cũng nh- ở thí nghiệm trên vịt đẻ và vịt 15 ngày tuổi, mẫu dịch ngoáy ổ nhóp (ở thời điểm 1 ngày tuổi là mẫu phân) đ- ợc thu thập đồng thời với những lần lấy mẫu huyết thanh để xác định xem virus H5 có l- u hành trong đàn vịt trong suốt thời gian tiến hành thí nghiệm hay không. Sự có mặt của virus đ- ợc xác định sự bằng phản ứng RT-PCR. Kết quả đ- ợc trình bày tại bảng 4.6

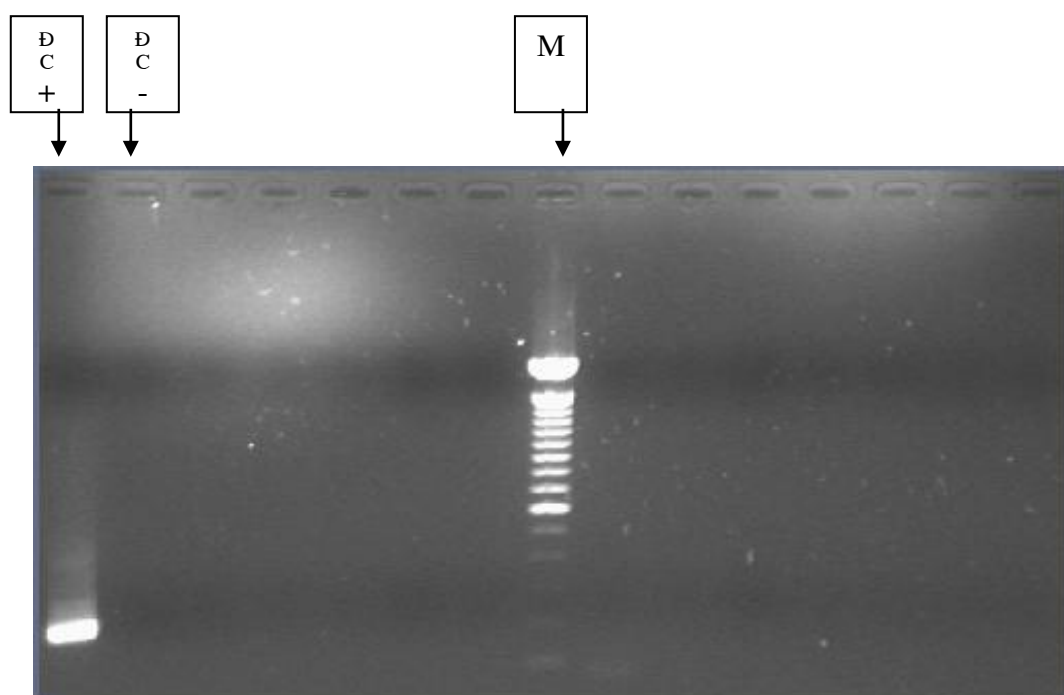
Kết quả ở bảng 4.6 cho thấy, ở thời điểm bắt đầu làm thí nghiệm, qua xét nghiệm không có sự l- u hành của virus cúm H5N1 ở cả lô vịt thí nghiệm và lô vịt đối chứng.

Từ sau khi tiêm vaccin cho tới khi kết thúc thí nghiệm đã không phát hiện thấy sự hiện diện của virus cúm gia cầm ở cả vịt tiêm chủng và vịt đối chứng.

Bảng 4.6. Kết quả xác định sự có mặt của virus trong dịch ngoáy ổ nhóp của vịt 1 ngày tuổi bằng kỹ thuật RT-PCR.

Thời điểm lấy mẫu (tuần sau tiêm vaccin)	Lô thí nghiệm		Lô đối chứng	
	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu có virus	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu có virus
0	15	0	15	0
3	30	0	10	0
5	30	0	10	0
7	30	0	10	0
9	30	0	10	0
11	30	0	10	0

Kết quả xác định sự có mặt của virus H5 đ-ợc minh hoạ trên hình 10.



Hình 4.7. Kết quả xác định virus H5 trong đàn vịt 1 ngày tuổi bằng phản ứng RT - PCR.

4.3.2. Kết quả kiểm tra kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt 1 ngày tuổi trước khi tiêm vaccin.

Để đánh giá tình trạng miễn dịch chống virus H5 của đàn vịt 1 ngày tuổi trước khi tiêm vaccin, 15 mẫu huyết thanh được thu thập và kiểm tra hiệu giá kháng thể bằng phản ứng HI. Kết quả được trình bày trong bảng 4.7.

Bảng 4.7. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh vịt 1 ngày tuổi trước khi tiêm vaccin.

Lô vịt	Số mẫu kiểm tra	Hiệu giá kháng thể (log2)					Hiệu giá trung bình (log2)	Tỷ lệ vịt có kháng thể (%)	Tỷ lệ bảo hộ (%)
		0	1	2	3	4			
Lô TN	15	3	2	4	4	2	$2 \pm 0,35$	80	13,33
Lô ĐC	15	3	2	4	4	2	$2 \pm 0,35$	80	13,33

Số liệu trong bảng 4.7 cho thấy đàn vịt có kháng thể thụ động chống lại virus H5 với sự phân bố không đồng đều trong đàn. Có tới 3/15 mẫu không có kháng thể. Tỷ lệ bảo hộ đạt 13,33 %.

Khi đã có kết quả xét nghiệm, chúng tôi tiến hành tiêm vaccin cho 180 con với liều 0,5 ml/vịt, 20 con dùng làm đối chứng được đánh dấu và thả chung vào đàn.

4.3.3. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt 1 ngày tuổi sau khi tiêm vaccin

3 tuần sau khi tiêm mũi vaccin đầu tiên, vịt được lấy huyết thanh để kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 nhằm đánh giá xem vịt có đáp ứng miễn dịch khi được tiêm vaccin H5N1 ở 1 ngày tuổi hay không, đồng thời tiêm nhắc lại cho đàn vịt với liều 0,5 ml/ vịt. Tiến hành lấy mẫu huyết thanh tại các thời điểm 5, 7, 9, 11 tuần sau tiêm vaccin để khảo sát khả năng đáp ứng miễn dịch của đàn vịt với vaccin. Kết quả được trình bày trong bảng 4.8.

Bảng 4.8. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt đ- ọc tiêm vaccin lần 1 lúc 1 ngày tuổi

Lô vịt	T. gian lấy mẫu (tuần sau tiêm)	Số mẫu kiểm tra	Hiệu giá kháng thể (log2)					Hiệu giá trung bình (log2)	Tỷ lệ vịt có kháng thể (%)	Tỷ lệ bảo hộ (%)
			0	1	2	3	4			
Lô	0	15	3	2	4	4	2	$2 \pm 0,35$	80	13,33
	3	30	7	4	8	7	4	$1,9 \pm 0,25$	76.67	13,33
	5	30	12	6	7	4	1	$1,2 \pm 0,22$	60	3,33
thí nghiệm	7	30	16	6	7	1		$0,77 \pm 0,17$	46.67	0
	9	30	18	8	4			$0,53 \pm 0,13$	40	0
	11	30	30					0	0	0
Lô	0	15	3	2	4	4	2	$2 \pm 0,35$	80	13,33
	3	10	3	1	2	3	1	$1,8 \pm 0,47$	70	10
	5	10	4	2	3	1		$1,1 \pm 0,35$	60	0
đối chứng	7	10	5	2	2	1		$0,9 \pm 0,35$	50	0
	9	10	7	3				$0,3 \pm 0,15$	30	0
	11	10	10					0	0	0

Số liệu trong bảng 4.8 thể hiện tại thời điểm 3 tuần sau khi tiêm mũi vaccin đầu tiên vẫn còn nhiều vịt của cả lô thí nghiệm và lô đối chứng có kháng thể. Tuy nhiên chỉ có từ 10 đến 13,33% số vịt có hiệu giá kháng thể đạt mức bảo hộ. Kết quả cũng cho thấy tại thời điểm 3 tuần sau khi tiêm mũi vaccin thứ nhất hiệu giá kháng thể trung bình của đàn vịt vẫn không có sự sai khác đáng kể so với trước đó 3 tuần ($P < 0,05$).

5 tuần sau khi tiêm vaccin, lượng kháng thể đã giảm đi ở cả 2 lô vịt được kiểm tra, hầu hết vịt đã hết kháng thể thụ động hoặc có kháng thể nhưng không đủ để bảo hộ. Số vịt có kháng thể còn tới 60% nhưng hiệu giá kháng thể hầu hết ở mức thấp, tỷ lệ vịt có hiệu giá kháng thể đạt mức bảo hộ chỉ còn từ 0 đến 3,33%.

Kết quả cũng thể hiện tại thời điểm 5 tuần sau khi tiêm vaccin, đàn vịt 1 ngày tuổi có kháng thể thụ động vẫn chưa sản sinh kháng thể kháng lại virus H5.

Kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh vịt tiếp tục giảm xuống, ở 7 tuần sau khi tiêm nhắc lại, dù còn nhiều vịt của cả 2 lô có kháng thể nhưng không có vịt nào còn đủ kháng thể bảo hộ chống bệnh do virus H5 gây ra.

Tại tuần thứ 9 sau tiêm vaccin vẫn còn 4/40 vịt có kháng thể với hiệu giá cao nhất cũng chỉ đạt chỉ đạt 2 log₂.

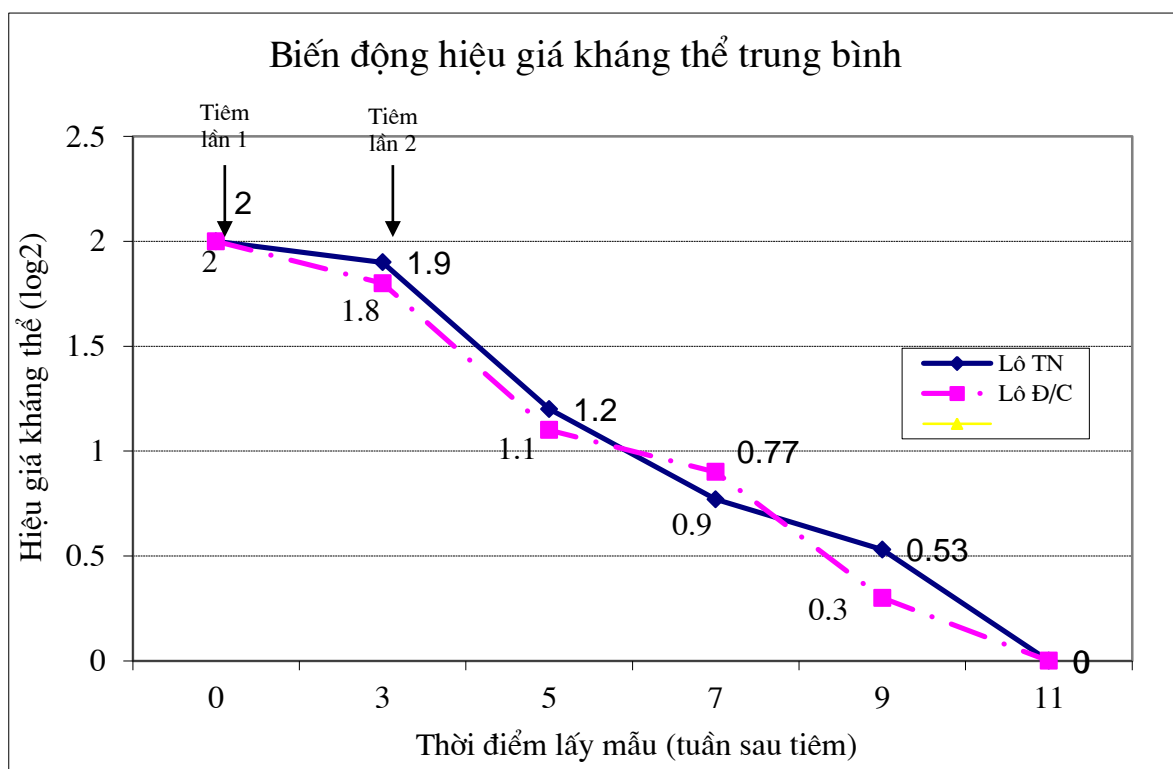
Kết quả xét nghiệm tại thời điểm 11 tuần sau khi tiêm vaccin cho thấy toàn bộ số mẫu của cả 2 lô đều không có kháng thể.

Kết quả theo dõi sự biến động hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trung bình của đàn vịt được tiêm vaccin vào lúc 1 ngày tuổi được trình bày trong bảng 4.9

Bảng 4.9. Biến động hiệu giá kháng thể trung bình và tỷ lệ bảo hộ của đàn vịt đ-ợc tiêm vaccin lúc 1 ngày tuổi

Thời điểm lấy mẫu (tuần sau tiêm vaccin)	Lô thí nghiệm		Lô đối chứng	
	Hiệu giá trung bình (log2)	Tỷ lệ bảo hộ (%)	Hiệu giá trung bình (log2)	Tỷ lệ bảo hộ (%)
0	2 ± 0,35	13,33	2 ± 0,35	13,33
3	1,9 ± 0,25	13,33	1,8 ± 0,47	10
5	1,2 ± 0,22	3,33	1,1 ± 0,35	0
7	0,77 ± 0,17	0	0,9 ± 0,35	0
9	0,53 ± 0,13	0	0,3 ± 0,15	0
11	0	0	0	0

Chúng tôi minh hoạ kết quả trên trên hình 4.8.



Hình 4.8. Sự biến động hiệu giá kháng thể trung bình của đàn vịt sau khi đ-ợc tiêm vaccin cúm gia cầm H5N1 ở 1 ngày tuổi

Bảng 4.9 cho thấy ngay khi nở ra vịt đã có kháng thể thụ động chống lại virus H5 với hiệu giá kháng thể dao động từ 1 đến 4 log₂. Kháng thể thụ động tồn tại tới thời điểm 11 tuần sau khi tiêm vaccin. Tuy trong huyết thanh của đàn vịt đ-ợc tiêm vaccin cúm gia cầm H5N1 lúc 1 ngày tuổi vịt có kháng thể kháng virus H5 với thời gian dài nh- vậy nh- ng hiệu giá huyết thanh rất thấp. Kháng thể chỉ đủ bảo hộ cho 3,33 đến 13,33% số vịt đ-ợc kiểm tra. Từ tuần thứ 7 sau khi tiêm vaccin không còn vịt nào có đủ kháng thể bảo hộ đối với bệnh do virus H5 gây ra.

Hình 4.8 thể hiện đàn vịt 1 ngày tuổi không có đáp ứng miễn dịch với vaccin cúm gia cầm vô hoạt nhũ dầu H5N1. Ngay từ ngày tuổi đầu tiên vịt đã có kháng thể thụ động với mức hiệu giá trung bình $2 \pm 0,35 \log_2$ và 13,33% số vịt đ-ợc kiểm tra có kháng thể đủ bảo hộ chống bệnh. Sau 3 tuần các chỉ số này giảm đi không đáng kể. Kết quả xét nghiệm những lần sau đó cho thấy dù đã đ-ợc tiêm 2 mũi vaccin nh- ng vịt vẫn không tạo ra kháng thể, l-ợng kháng thể thụ động giảm nhanh ở cả lô thí nghiệm và lô đối chứng. Tại thời điểm 11 tuần sau khi tiêm vaccin toàn bộ số vịt của cả lô thí nghiệm và lô đối chứng đã không còn kháng thể.

4.4. Kết quả khảo sát đáp ứng miễn dịch đối với đàn ngan đ-ợc tiêm mũi vaccin đầu tiên lúc 15 ngày tuổi

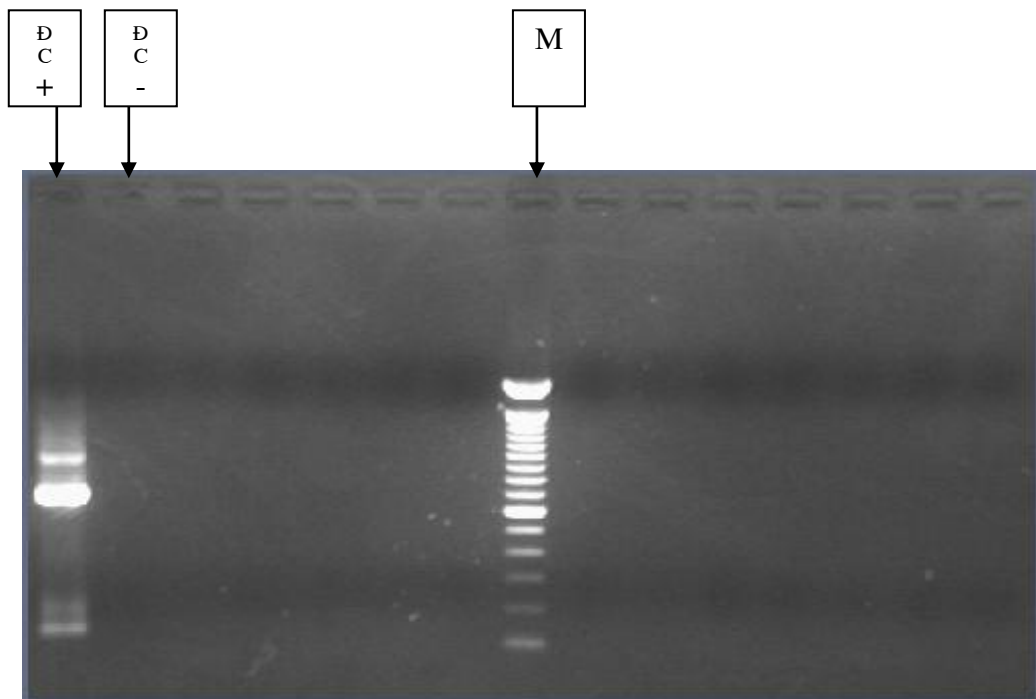
4.4.1. Kết quả kiểm tra sự có mặt của virus H5 trong đàn ngan 1 ngày tuổi tr-ớc và sau khi tiêm vaccin

Cũng nh- ở thí nghiệm trên các đàn vịt, mẫu dịch ngoáy ở nhóp đ-ợc thu thập đồng thời với những lần lấy mẫu huyết thanh để xác định xem virus H5 có l- u hành trong đàn ngan trong suốt thời gian tiến hành thí nghiệm hay không. Sự có mặt của virus đ-ợc xác định sự bằng phản ứng RT-PCR. Kết quả đ-ợc trình bày tại bảng 4.10.

Bảng 4.10. Kết quả xác định sự có mặt của virus trong dịch ngoáy ổ nhóp của ngan đ- ợc tiêm vaccin cúm gia cầm H5N1 lúc 15 ngày tuổi bằng kỹ thuật RT-PCR.

Thời điểm lấy mẫu (tuần sau tiêm vaccin)	Lô thí nghiệm		Lô đối chứng	
	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu có virus	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu có virus
0	15	0	15	0
3	30	0	10	0
5	30	0	10	0
7	30	0	10	0
9	30	0	10	0
11	30	0	10	0
13	30	0	10	0
15	30	0	10	0

Kết quả xác định sự có mặt của virus H5 đ- ợc minh hoạ trên hình 4.9.



Hình 4.9. Kết quả xác định virus H5 trong đàn ngan 15 ngày tuổi bằng kỹ thuật RT-PCR.

Kết quả ở bảng 4.10 cho thấy, ở thời điểm bắt đầu làm thí nghiệm, qua xét nghiệm không có sự l-u hành của virus cúm H5N1 ở cả lô ngan thí nghiệm và lô ngan đối chứng.

Từ sau khi tiêm vaccin cho tới khi kết thúc thí nghiệm đã không phát hiện thấy sự hiện diện của virus cúm gia cầm ở cả ngan đ- ọc tiêm vaccin và ngan đối chứng.

4.4.2. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của ngan 15 ngày tuổi tr- ớc khi tiêm vaccin

Để đánh giá tình trạng miễn dịch chống virus H5 của đàn ngan 15 ngày tuổi tr- ớc khi tiêm vaccin, 15 mẫu huyết thanh đ- ọc thu thập và kiểm tra hiệu giá kháng thể bằng phản ứng HI. Không có ngan nào trong số 15 ngan đ- ọc kiểm tra có kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh.

4.4.3. Kết quả kiểm tra kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của ngan 15 ngày tuổi sau khi tiêm vaccin

Sau khi tiêm mũi vaccin thứ nhất đ- ọc 3 tuần, chúng tôi tiến hành tiêm mũi vaccin thứ 2 cho lô ngan thí nghiệm. Ngay tr- ớc khi tiêm mũi vaccin thứ 2, ngan đ- ọc lấy huyết thanh để kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5. Tiếp tục lấy mẫu huyết thanh của ngan vào các thời điểm 5, 7, 9, 11, 13 và 15 sau tiêm vaccin để tiến hành phản ứng HI. Kết quả đ- ọc trình bày trong bảng 4.11.

Bảng 4.11 cho thấy 3 tuần sau khi tiêm vaccin, ngan của lô thí nghiệm đã sản sinh kháng thể kháng virus H5 với tỷ lệ chuyển d- ơng đạt 23,33%. Tuy nhiên l- ợng kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của ngan còn rất thấp (chỉ đạt 1 log₂).

Tại thời điểm 5 tuần sau khi tiêm vaccin đã có 73,33% số ngan đ- ọc kiểm tra có kháng thể, giá dao động từ 1 đến 5 log₂, hiệu giá trung bình đạt $1,97 \pm 0,28 \log_2$ và đã có 16,67% số ngan đ- ọc kiểm tra đ- ọc bảo hộ. Cùng thời điểm đó lô ngan đối chứng hoàn toàn không có kháng thể.

Bảng 4.11. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của ngan đ- ọc tiêm vaccin lần 1 lúc 15 ngày tuổi

Lô ngan	T. gian lấy mẫu (tuần sau tiêm)	Số mẫu kiểm tra	Hiệu giá kháng thể (log2)							Hiệu giá trung bình (log2)	Tỷ lệ ngan có kháng thể (%)	Tỷ lệ bảo hộ (%)
			0	1	2	3	4	5	6			
Lô thí nghiệm	0	15	15							0	0	0
	3	30	23	7						0,23 ± 0,08	23,33	0
	5	30	8	4	6	7	3	2		1,97 ± 0,28	73,33	16,67
	7	30	5	4	6	8	3	3	1	2,43 ± 0,30	83,33	23,33
	9	30	3	5	7	7	5	2	1	2,53 ± 0,28	90	26,67
	11	30	4	7	6	8	3	1	1	2,2 ± 0,27	86,67	16,67
	13	30	9	3	7	7	3	1		1,83 ± 0,27	70	13,33
Lô đối chứng	0	15	15							0	0	0
	3	10	10							0	0	0
	5	10	10							0	0	0
	7	10	10							0	0	0
	9	10	10							0	0	0
	11	10	10							0	0	0
	13	10	10							0	0	0
	15	10	10						0	0	0	

Sự đáp ứng miễn dịch chống virus H5 của đàn ngan tiếp tục tăng lên. Tại thời điểm 7 tuần sau khi tiêm vaccin đã có 25/30 mẫu có kháng thể với hiệu giá cao nhất là 6 log₂ và 23,33% số ngan đ-ợc bảo hộ.

Giai đoạn từ 7 đến 9 tuần sau tiêm vaccin đáp ứng miễn dịch của đàn ngan hầu nh- ổn định với hiệu giá trung bình ở tuần thứ 9 là $2,53 \pm 0,28 \log_2$.

Kết quả này thể hiện đàn ngan đã sản sinh kháng thể kháng virus cúm H5 ở mức độ yếu. Tuy có tỷ lệ chuyển d-ợng đạt 90% số ngan đ-ợc kiểm tra nh- ng phần lớn số ngan đ-ợc kiểm tra có hiệu giá kháng thể d-ới mức bảo hộ. Số ngan có hiệu giá kháng thể trong huyết thanh ở mức 6 log₂ chỉ chiếm tỷ lệ 3,33% số ngan đ-ợc kiểm tra.

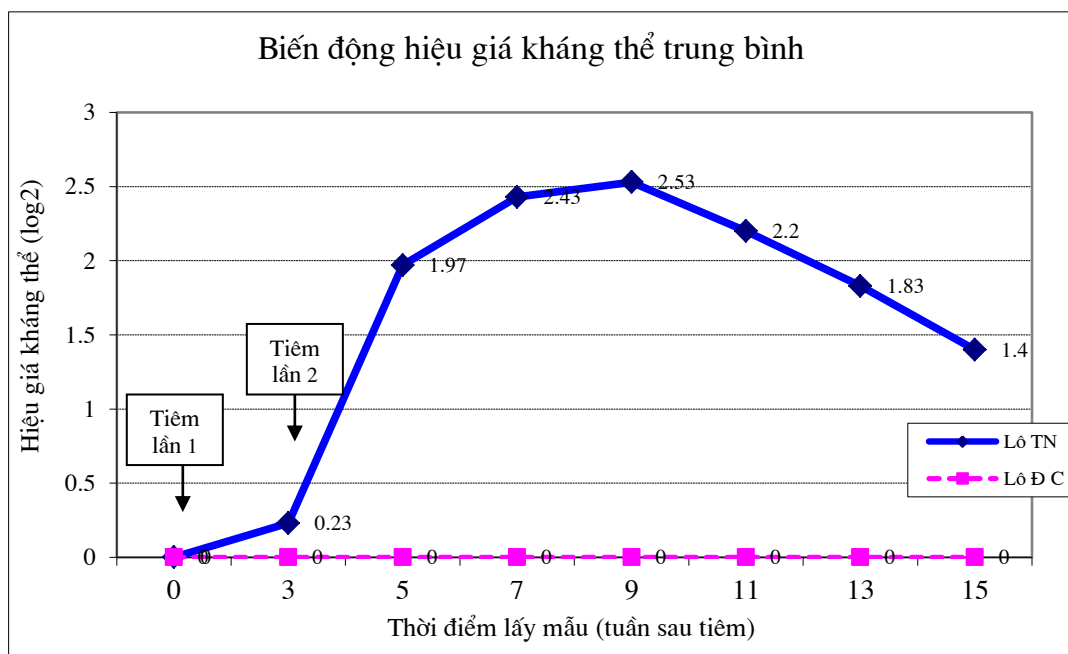
Từ tuần thứ 9 sau khi tiêm vaccin l-ợng kháng thể trong huyết thanh ngan giảm dần. Đến thời điểm 11 tuần số ngan còn kháng thể đủ bảo hộ không nhiều. Chỉ còn 6,66% số ngan đ-ợc kiểm tra còn kháng thể ở mức hiệu giá HI $\geq 5 \log_2$. Hiệu giá kháng thể trung bình chỉ đạt $2,2 \pm 0,27 \log_2$, tỷ lệ bảo hộ 16,67%.

L-ợng kháng thể tiếp tục giảm chậm, tại 13 tuần sau khi tiêm vaccin tuy còn tới 70% số ngan có kháng thể nh- ng hiệu giá kháng thể trung bình còn $1,83 \pm 0,27 \log_2$.

L-ợng kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của đàn ngan thí nghiệm vẫn tiếp tục giảm xuống. Khi kết thúc thí nghiệm ở tuần 15 thì hiệu giá kháng thể trung bình chỉ còn $1,4 \pm 0,27 \log_2$. Tại thời điểm này vẫn còn 56,67% số ngan trong đàn có kháng thể kháng virus H5. Tuy nhiên số ngan có kháng thể đủ bảo hộ còn rất ít (10% số ngan đ-ợc kiểm tra). Hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của ngan phân bố tập trung ở các mức 2 - 3 log₂.

Sự biến động của hàm l-ợng kháng thể trung bình trong huyết thanh của đàn ngan đ-ợc tiêm vaccin lúc 15 ngày tuổi đ-ợc thể hiện trên hình 4.10.

Hình 4.10 cho thấy khi ngan 15 ngày tuổi đ-ợc tiêm vaccin cúm gia cầm H5N1, kháng thể kháng virus H5 đ-ợc sinh ra chậm, hiệu giá kháng thể cũng không cao. Chỉ số hiệu giá kháng thể cao nhất cũng chỉ đạt $2,53 \pm 0,28 \log_2$.

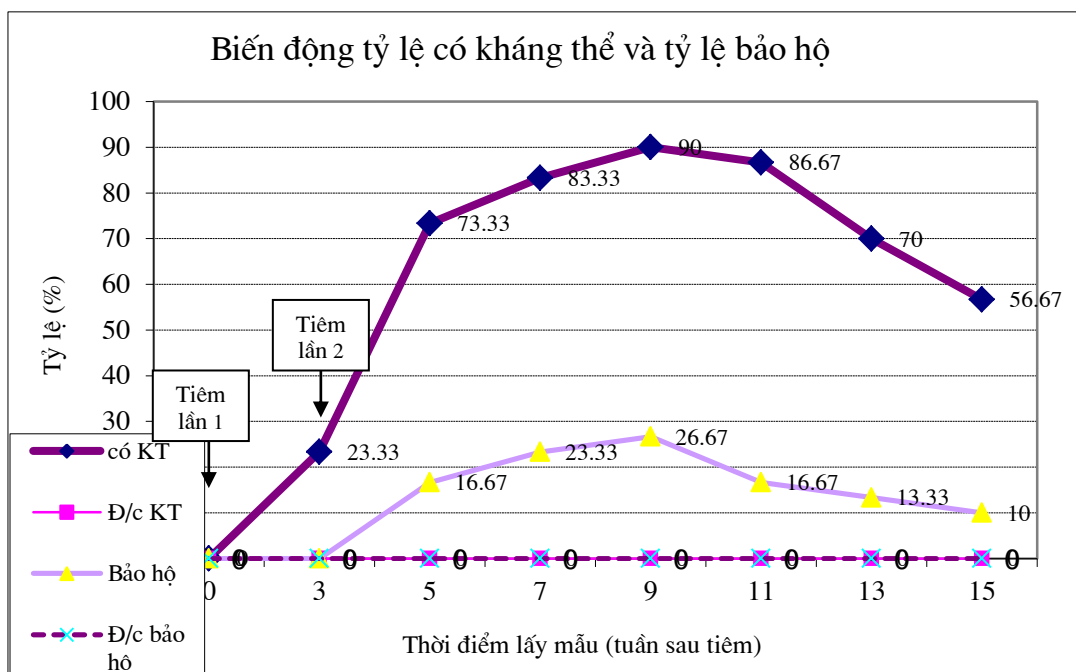


Hình 4.10. Biến động hiệu giá kháng thể trung bình của đàn ngan đ-ợc tiêm mũi vaccin đầu tiên lúc 15 ngày tuổi

Để thuận tiện cho việc đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch của ngan đối với vaccin cúm gia cầm H5N1, chúng tôi minh họa tỷ lệ ngan có kháng thể và tỷ lệ ngan đ-ợc bảo hộ trên hình 4.11.

Trên hình 4.11, đ-ờng liên màu nâu biểu thị cho tỷ lệ ngan có kháng thể của lô thí nghiệm; đ-ờng liên màu đỏ biểu thị cho tỷ lệ ngan có kháng thể của lô đối chứng. Đ-ờng liên màu tím biểu thị cho tỷ lệ ngan đ-ợc bảo hộ của lô thí nghiệm; đ-ờng đứt nét biểu thị cho tỷ lệ ngan đ-ợc bảo hộ của lô đối chứng.

Hình 4.11 cho thấy khi đ-ợc tiêm vaccin cúm gia cầm lúc 15 ngày tuổi ngan cũng có đáp ứng miễn dịch chống lại bệnh do H5 gây ra nh-ng khả năng đáp ứng kém. L-ợng kháng thể tạo ra rất thấp. Tuy tỷ lệ chuyển đ-ợng từ 23,33% đến 90%, thời gian tồn tại của kháng thể kéo dài từ tuần thứ 3 đến tuần thứ 15 sau khi tiêm vaccin nh-ng tỷ lệ bảo hộ cao nhất cũng chỉ đạt 26,67%.



Hình 4.11 Sự biến động tỷ lệ ngân có kháng thể và tỷ lệ bảo hộ của đàn ngân đ- ợc tiêm mũi vaccin đầu tiên lúc 15 ngày tuổi

Theo Nicholas J. Savill [88], việc tiêm phòng cho gia cầm chống lại virus cúm gia cầm có thể làm tăng nguy cơ lan truyền virus trong đàn. Trong khi tỷ lệ bảo hộ của đàn tăng lên thì số gia cầm không có kháng thể có thể bị nhiễm nh- ng rất khó để phát hiện virus. Để khắc phục tình trạng này cần đảm bảo tỷ lệ bảo hộ của đàn gia cầm thấp nhất cũng phải đạt 95%.

Với mức độ bảo hộ chỉ đạt từ 10 đến 26,67% thì khả năng lan truyền virus trong đàn ngân có thể xảy ra.

Sử dụng vaccin vô hoạt đ- ợc chế từ chủng không độc A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3) tiêm bắp cho chuột, tác giả Lu X [87] nhận thấy chỉ 1 liều vaccin không tạo ra đáp ứng ($HI \geq 40$) ở chuột. Liều vaccin thứ 2 gây đáp ứng kháng thể cho 65% số chuột với $GMT = 51$.

Khi sử dụng vaccin chuyển gen H5N1/PR8 tiêm cho gà SPF với liều 0,3 ml/gà tác giả Tian G cùng các cộng sự [101] nhận thấy chỉ 1 tuần sau khi tiêm vaccin gà đã sản sinh kháng thể kháng virus H5. L- ợng kháng thể đạt tới $10 \log_2$

tại thời điểm 6 tuần sau tiêm, sau đó giảm dần còn 4 log₂ ở 43 tuần sau tiêm.

Đối với vịt, các tác giả đã tiêm cho mỗi vịt 2 liều vaccin và thu đ-ợc kết quả vịt sinh kháng thể đủ bảo hộ tại tuần thứ 3 sau tiêm, thời gian miễn dịch bảo hộ kéo dài 52 tuần.

Kết quả thử nghiệm vaccin Bio Flu H5N9 trên gà SPF 3 tuần tuổi của Merial [20] cho thấy 4 tuần sau khi đ-ợc tiêm vaccin 8/10 gà có kháng thể kháng virus cúm với mức 6,5 log₂.

Theo tác giả Caroline Yuen [5], khi tiêm vaccin H5N2 cho gà 8 đến 55 ngày tuổi khoảng 98% gà có đáp ứng với vaccin sau liều tiêm đầu tiên và 80% có hàm l-ợng kháng thể đạt yêu cầu bảo hộ sau khi tiêm mũi 2.

Cũng sử dụng vaccin H5N2 nh-ng tiêm cho gà đẻ, Đào Yến Khanh [12] thu đ-ợc kết quả 100% số gà đ-ợc tiêm vaccin sản sinh kháng thể kháng virus H5 với hiệu giá thấp nhất đạt 4 log₂ ở 3 tuần sau tiêm. Sau khi tiêm nhắc lại, hàm l-ợng kháng thể tăng cao đạt mức 8,76 log₂ và giữ ổn định từ tuần thứ 6 đến tuần đến tuần thứ 8 rồi giảm dần.

Kết quả thử nghiệm vaccin Trovac trên gà 1 ngày tuổi của các tác giả Qiao [90], Seo [92], Swayne [96], [97], [98] cũng cho thấy gà đ-ợc bảo hộ từ tuần thứ 3 tới tuần thứ 20 sau tiêm.

So sánh với các kết quả trên chúng tôi thấy ngan và vịt có kháng thể chậm hơn và yếu hơn so với ở gà.

- Khi vịt đẻ đ-ợc tiêm vaccin vô hoạt nhũ dầu H5N, sau 3 tuần chúng đã sản sinh kháng thể. Hàm l-ợng kháng thể tiếp tục tăng cao đạt chỉ số hiệu giá bình quân $5,53 \pm 0,27 \log_2$ ở thời điểm 9 tuần sau khi tiêm vaccin. Mức kháng thể này duy trì trong đàn vịt đẻ không lâu. Kiểm tra ở 11 tuần sau tiêm đã thấy hiệu giá trung bình giảm xuống còn $4,63 \pm 0,29 \log_2$ và có 1/30 mẫu không phát hiện đ-ợc kháng thể. Đến tuần thứ 13 sau khi tiêm vaccin hiệu giá trung bình chỉ còn $3,7 \pm 0,33 \log_2$ với tỷ lệ bảo hộ 53,33% .

- Sử dụng vaccin trên tiêm cho vịt 15 ngày tuổi (tại thời điểm tiêm mũi vaccin đầu tiên đàn vịt đã có kháng thể nh-ng không có tác dụng bảo hộ) chúng

tôi thu được kết quả hiệu giá kháng thể tăng lên từ từ đạt mức cao nhất ở tuần thứ 9 sau khi tiêm vaccin rồi giảm dần. Trong thí nghiệm này chúng tôi thấy rằng số vịt được bảo hộ cao nhất cũng chỉ đạt 66,67%; kéo dài từ tuần thứ 5 đến tuần thứ 9 sau tiêm nhắc lại. Theo quy định nêu trên thì đáp ứng miễn dịch của đàn vịt vẫn chưa đủ để bảo hộ cho cả đàn chống lại bệnh do virus H5 gây ra.

- Đối với vịt 1 ngày tuổi có kháng thể thụ động, dù đã được tiêm 2 mũi vaccin vô hoạt như dầu H5N1 nhưng vịt vẫn không tạo ra kháng thể. Lượng kháng thể thụ động không đủ bảo hộ cho cả đàn chống lại bệnh cúm gia cầm do H5 gây ra.

Thí nghiệm của chúng tôi thể hiện độ dài miễn dịch có thể kéo dài từ 9 đến 15 tuần sau khi tiêm vaccin nhưng mức kháng thể đủ để bảo hộ cho toàn bộ đàn vịt, ngắn chỉ duy trì trong thời gian rất ngắn. Phần lớn thời gian còn lại dù hiệu giá kháng thể trung bình có thể còn đạt $> 4 \log_2$ nhưng đã có số lượng lớn các thể trong đàn không được bảo hộ. Những đàn như vậy dễ bị nhiễm bệnh nếu có mặt của virus HPAI H5N1 trong môi trường.

Có sự khác nhau nêu trên theo chúng tôi do các thí nghiệm được tiến hành trên các đối tượng khác nhau, sử dụng các loại vaccin khác nhau. Các thí nghiệm của các tác giả thực hiện trên gà SPF, gà con hoặc gà đẻ trong khi chúng tôi tiến hành trên ngan và vịt.

Trong toàn bộ quá trình thí nghiệm, chúng tôi tiến hành kiểm tra sự lưu hành của virus cúm H5N1 bằng kỹ thuật RT-PCR theo định kỳ nhưng không phát hiện thấy virus trong dịch ổ nhớt của ngan, vịt cả ở lô đối chứng và lô thí nghiệm. Có kết quả này theo chúng tôi có thể có 2 khả năng:

- Có thể do không có virus H5N1 trong số mẫu thu thập. Khi giám sát sự lưu hành của virus cúm gia cầm H5N1 trong các đàn thủy cầm, tác giả Nguyễn Tiến Dũng [10], [11] nhận thấy xác suất để bắt gặp được virus trên một con vật cụ thể nào đó là rất thấp. Xét nghiệm 2402 mẫu dịch ngoáy ổ nhớt chỉ phát hiện được 3 mẫu có virus H5N1. Với số lượng 1060 mẫu như chúng tôi đã thu thập, có thể chưa đủ để bắt gặp virus H5N1.

- Virus cúm gia cầm H5N1 không lưu hành trong các đàn ngan, vịt thí nghiệm và virus cũng không tồn tại trong môi trường tại thời điểm các thí nghiệm được tiến hành. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả Nguyễn Tiến Dũng [10], [11]; Alexander [64], [65], [66]: gia cầm bị bệnh cúm do H5N1 gây ra chỉ thải virus ra môi trường khoảng 15 - 17 ngày và trong điều kiện bình thường thì virus chỉ tồn tại trong môi trường nhiều nhất là 10 ngày. Tại các địa điểm thí nghiệm không có các ổ dịch cúm gia cầm xảy ra trong thời gian các thí nghiệm được tiến hành.

5. Kết luận

Trên cơ sở những kết quả thực tế đạt được trong quá trình khảo sát đáp

ứng miễn dịch của ngan, vịt đối với vaccin cúm gia cầm H5H1 do Trung Quốc sản xuất chúng tôi có một số kết luận sau:

1. Vịt đẻ có đáp ứng miễn dịch khá tốt đối với vaccin cúm gia cầm vô hoạt nhũ dầu H5N1. Tình trạng miễn dịch đủ bảo hộ cho 66,67 — 90% số vịt thí nghiệm kéo dài trong khoảng thời gian từ 7 đến 11 tuần sau khi tiêm vaccin.
2. Vịt 15 ngày tuổi có đáp ứng miễn dịch trung bình khi đ-ợc tiêm vaccin vô hoạt nhũ dầu H5N1. Sau khi tiêm hiệu giá kháng thể tăng lên từ từ đạt mức cao nhất ở tuần thứ 6 sau tiêm nhắc lại rồi giảm dần. L-ợng kháng thể đ-ợc tạo ra đủ bảo hộ cho 66,67% số vịt thí nghiệm chỉ kéo dài từ tuần thứ 5 đến tuần thứ 9 sau khi tiêm vaccin.
3. Vịt 1 ngày tuổi không có đáp ứng miễn dịch với vaccin cúm gia cầm vô hoạt nhũ dầu H5N1.
4. Ngan 15 ngày tuổi có đáp ứng miễn dịch yếu đối với vaccin cúm gia cầm H5N1. Thời gian xuất hiện kháng thể sau khi tiêm vaccin chậm, l-ợng kháng thể tạo ra ít (hiệu giá kháng thể trung bình cao nhất cũng chỉ đạt $2,53 \pm 0,28 \log_2$).

Tài liệu tham khảo

i. Tài liệu tiếng Việt

1. Bùi Quang Anh, Văn Đăng Kỳ (2004), “Bệnh cúm gia cầm: Lưu hành bệnh, chẩn đoán và kiểm soát dịch bệnh”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 11 (3), tr. 69-75.
2. Bùi Quang Anh (2005), *Báo cáo về dịch cúm gia cầm tại hội nghị kiểm soát dịch cúm gia cầm khu vực châu á do FAO, OIE tổ chức tại thành phố Hồ Chí Minh từ 23 - 25 tháng 2 năm 2005*.
3. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2005), *Quy trình chẩn đoán bệnh cúm gia cầm*, 10 TCN. Hà Nội 2005.
4. Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn (2005), *Quyết định số 1715/QĐ/BNN-TY về việc ban hành Quy định tạm thời về sử dụng vacxin cúm gia cầm*.
5. Caroline Yuen (2004), “Đánh giá tiêm chủng vacxin cúm gà H5 năm 2003 tại Hồng Kông”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 11(2), tr. 79- 80.
6. Cục thú y (2004), *Bệnh cúm ở gia cầm và biện pháp phòng chống*, NXBNN, Hà Nội.
7. Cục thú y (2005), *Sổ tay hướng dẫn phòng chống bệnh cúm gia cầm và bệnh cúm trên người*, Hà Nội.
8. J.H. Breytenbach (2004), “Tiêm chủng , một phần của chiến lược khống chế bệnh cúm gà” (Nguyễn Thị Mến, Bùi Văn Đông dịch), *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 11(2), tr. 72-78.
9. Nguyễn Tiến Dũng, Malik Peiris, Robert Webster, Đào Thanh Vân, Bùi Ngọc Anh, Nguyễn Thế Vinh, Kent Inui, Bùi Nghĩa V- ọng, Nguyễn Việt Không và Ngô Thanh Long (2004), “Nguồn gốc virut cúm gia cầm H5N1 tại Việt Nam năm 2003 - 2004 ”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 11(3), tr. 6-14.
10. Nguyễn Tiến Dũng, Đỗ Quý Ph- ơng, Đào Thanh Vân, Bùi Ngọc Anh, Bùi

- Nghĩa Vượng, Nguyễn Thế Vinh, Nguyễn Thuý Duyên (2005), “ Giám sát bệnh cúm gia cầm tại Thái Bình”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 12(2), tr. 6-12.
11. Nguyễn Tiến Dũng, Đào Thanh Vân, Bùi Ngọc Anh, Kenjiro Inui, Bùi Nghĩa V- ọng, Nguyễn Thế Vinh, Nguyễn Bá Thành, Phạm Thị Kim Dung (2005), “Giám sát tình trạng nhiễm vi rút cúm gia cầm tại đồng bằng Sông Cửu Long cuối năm 2004”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 12(2), tr. 13-18.
 12. Đào Yến Khanh (2005), báo cáo luận văn thạc sỹ nông nghiệp, Đại học nông nghiệp I, Hà Nội.
 13. Phạm Sỹ Lăng (2004), “Diễn biến bệnh cúm gia cầm ở châu á và các hoạt động phòng chống bệnh”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 11(3), tr. 91-94.
 14. Lê Văn Năm (2004), “Kết quả khảo sát các biểu hiện lâm sàng và bệnh tích đại thể bệnh cúm gia cầm ở một số cơ sở chăn nuôi các tỉnh phía Bắc”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 11(3), tr. 86- 90.
 15. Tô Long Thành (2004), “Thông tin cập nhật về tái xuất hiện bệnh cúm gia cầm tại các n- óc Châu á”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 11(4), tr. 87- 93.
 16. Tô Long Thành (2005), “Một số thông tin mới về bệnh cúm gia cầm”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, 12(1), tr.50-53.
 17. Tô Long Thành (2005), “Kinh nghiệm phòng chống dịch cúm gia cầm và sử dụng vacxin cúm gia cầm tại Trung Quốc”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 12(3), tr. 87- 90.
 18. Tô Long Thành (2006), “Thông tin cập nhật về bệnh cúm gia cầm và vacxin phòng chống”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 13(1), tr. 66-76.
 19. Tổ chức Y tế thế giới (2004), *H- ướng dẫn phòng tránh lây nhiễm bệnh cúm gà*, NXBNN, Hà Nội.
 20. Tóm tắt sản phẩm Bio Flu H5N9 . Hãng Merial (2006).

21. T. An (2005), *Rumani tiếp tục giết bỏ gia cầm*,
<http://vnexpress.net/Vietnam/Suc-khoe/2005/10/3B9E31D7/>
22. Phan Anh (2005), *16/11 Đông Tháp đóng cửa các v-òn chim*,
<http://vnexpress.net/Vietnam/Xa-hoi/2005/11/3B9E40C7/>
23. H-ơng Cát (2005), *Đã phát hiện chủng vi-rút H3, H4 trên thủy cầm*,
<http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2005/11/512189/>
24. Quốc Dũng (2005), *Phải tiêu diệt toàn bộ thủy cầm thả rong*,
<http://vietnamnet.vn/dichcumga/chongdich/2005/12/522637/>
25. Quốc Dũng (2005), *Thêm dấu hiệu virus cúm gà kháng thuốc Tamiflu*,
<http://vietnamnet.vn/xahoi/doisong/2005/12/525916/>
26. V.H (2005), *Hôm nay Tp.HCM không còn nuôi gia cầm*,
<http://vnexpress.net/Vietnam/Xa-hoi/2005/11/3B9E4170/>
27. Lệ Hà (2005), *Việt Nam thử nghiệm sản xuất vắc-xin phòng cúm H5N1*.
<http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2005/01/366405/>
28. Lệ Hà (2005), *Gen quy định độc lực của vi-rút H5N1 giảm hơn năm 2004*,
<http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2005/11/514502/>
29. Lệ Hà (2005), *Cần 17.000 tỷ đồng phòng chống đại dịch cúm*,
<http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2005/11/516713/>
30. M.L (2005), *Hy Lạp có cúm gà*,
<http://vnexpress.net/Vietnam/Suc-khoe/2005/10/3B9E32F7/>
31. Mỹ Lan (2006), *Test nhanh không chẩn đoán đ-ợc H5N1*,
<http://vnexpress.net/Vietnam/Suc-khoe/2006/02/3B9E680B/>
32. Ngọc Lan (2005), *Giải phẫu vi-rút H5N1 ở viện Pasteur Tp.HCM*.
<http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2005/11/511302/>
33. Mỹ Linh (2005), *150 triệu ng-ời có thể chết vì cúm gà*,
<http://vnexpress.net/Vietnam/Suc-khoe/2005/10/3B9E2A72/>
34. Mỹ Linh (2005), *Khả năng định cúm gà ở Thổ Nhĩ Kỳ là H5N1*, <http://vnexpress.net/Vietnam/Suc-khoe/2005/10/3B9E3146/>
35. Mỹ Linh (2005), *Vùng Vịnh xuất hiện cúm gà*,

- <http://vnexpress.net/Vietnam/Suc-khoe/2005/11/3B9E3F62/>
36. Mỹ Linh (2005), *Cúm gà lan mạnh ở Trung Quốc*,
<http://vnexpress.net/Vietnam/Suc-khoe/2005/11/3B9E44A3/>
 37. Mỹ Linh (2005), *Virus H5N1 đã tiến hoá*,
<http://vnexpress.net/Vietnam/Suc-khoe/2005/12/3B9E5516/>
 38. Mỹ Linh (2006), *Cúm gà tới Azerbaijan*,
<http://vnexpress.net/Vietnam/Suc-khoe/2006/02/3B9E6A51/>
 39. Mỹ Linh (2006), *Iraq có thêm ng-ời tử vong do cúm gà*,
<http://vnexpress.net/Vietnam/Suc-khoe/2006/02/3B9E682F/>
 40. Mỹ Linh (2006), *Cúm gà tràn sang châu Phi*,
<http://vnexpress.net/Vietnam/Suc-khoe/2006/02/3B9E68FF/>
 41. Thanh L-ong (2005), *Sau 30/11 không đ-ợc nuôi chim cảnh ở Tp.HCM*,
<http://vnexpress.net/Vietnam/Xa-hoi/2005/11/3B9E41E9/>
 42. Thanh Nhàn (2005), *H5N1 ở Việt Nam đã có nhiều đột biến nguy hiểm*.
<http://vnexpress.net/Vietnam/Suc-khoe/2005/11/3B9E406B/>
 43. Song Nhi (2005), *Giết mổ gia cầm để bị cúm A/H5N1 nhất*,
<http://www.cumgiacam.gov.vn/moi/2005/12/520046/>
 44. Tuyết Nhung (2006), *Singapore: Sản xuất test phát hiện nhanh H5N1*
<http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2006/01/537552/>
 45. Minh Sơn (2005), *Vi-rút H5N1 đã kháng lại thuốc Tamiflu*,
<http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2005/12/525216/>
 46. Minh Sơn (2006), *Virut H5N1 sống lâu trong phân gia cầm*,
<http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2006/01/534803/>
 47. Minh Sơn, (2006), *Giải mã gen 169 loại virut cúm gia cầm*,
<http://vietnamnet.vn/khoahoc/quocte/2006/01/537606/>
 48. Q.Thuần - Huỳnh Thu - B N Long (2005), *Nguy cơ bùng nổ dịch cúm gia cầm: Đã xảy ra dịch ở 17 tỉnh, thành phố*,
<http://www.thanhnien.com.vn/Xahoi/2005/11/19/129447.tno>
 49. Nh- Trang (2005), *Cúm gà đã lan tới 13 tỉnh thành*,

- <http://vnexpress.net/Vietnam/Xa-hoi/2005/11/3B9E4209/>
50. TTXVN (2005), *Phấn đấu đến 2006 không còn dịch cúm gia cầm*, <http://www.cumgiacam.gov.vn/moi/2005/12/526074/>
 51. Bích Vân (2004), *Hoàn tất giải mã gen virus H5N1, song virus vẫn đột biến từng năm*, <http://vietnamnet.vn/suckhoe/tintuc/2004/02/52595/>
 52. Hà Yên (2006), *Cấm áp mới thủy cầm đến hết tháng 2/2007*, <http://www.cumgiacam.gov.vn/moi/2006/01/528570/>
 53. *AIDS + H5N1 = H5N1 tiến hoá?* (theo BBC, Nhân Dân- 2005), <http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2005/11/513335/>
 54. *Bộ xét nghiệm vi-rút H5N1 cho kết quả ngay* (theo TTXVN - 2005), <http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2005/11/511060/>
 55. *Dịch cúm gia cầm lan rộng tại Cadăxtan* (theo TTXVN - 2005), <http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2005/08/476318/>
 56. *Đóng cửa v-òn U Minh Th-ơng* (theo TTXVN- 2005), <http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2005/11/517381/>
 57. *Nga: Cúm gia cầm ở Siberia xuất phát từ Đông Nam á* (theo Nhân Dân - 2005), <http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2005/08/474817/>
 58. *Phát hiện cúm gia cầm bằng xét nghiệm n-ớc bọt* (theo TTXVN - 2005), <http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2005/09/491424/>
 59. *Tamiflu: Không nên mua uống bừa* (theo Thanh Niên - 2005), <http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2005/12/518681/>
 60. *Viện vắc-xin Nha Trang sản xuất vắc-xin H5N1* (Theo báo SGGP- 2006), <http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2006/02/540612/>
 61. *Virut kháng thuốc điều trị cúm* (theo TTXVN- 2006), <http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2006/02/538268/>
 62. *VQG Cúc Ph-ơng: Cúm gia cầm giết chết 3 cây h-ơng* (theo TTXVN- 2005), <http://vietnamnet.vn/khoahoc/suckhoe/2005/08/483902/>

II. Tài liệu tiếng Anh

63. Alexander D.J., G. Parsons and R.J. Manvell (1986), “Experimental assessment of the pathogenicity of eight Avian Influenza A viruses of H5 subtype for chickens, turkeys, ducks and quail”, *Avian Patho*, 15:647-662.
64. Alexander D.J. (1993), “Orthomyxovirus Infections”, *Viral Infections of Vertebrates*, Volume 3: Viral Infections of Birds, Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 287-316.
65. Alexander D.J. (1996), “Highly Pathogenic Avian Influenza (fowl plague)”, *OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. List A and B diseases of mammals, birds and bees*, 3rd ed., Office International des Epizooties: Paris, 155-160.
66. Alexander D.J. (2001), “Ecology of Avian Influenza in domestic bird” (p. 25-33) in B. Dodet and M. Vicari (ed) *Emergence and control of zoonotic ortho and paramyxovirus disease*, John Libbey Eurotext, Paris, France.
68. Beard, C. W (1980), “Isolation and Identification of avian pathogens”, In S. B. Hitchner, C. H. Domermuth, H. G. Purchase and J. E. Williams (eds) *Am Assoc, Avian Pathol*, Kennett Square, PA, pp.67-69.
68. Capua, I., Terregino, C., Cattoli, G., Mutinelli, F., Rodriguez, J.F., (2003), “Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza”, *Avian Pathol*, 32 (1), 47-55.
69. Choppin, P. W. and R. W. Compans (1975), “The structure of influenza virus”, *The influenza viruses and Influenza*. Academic Press, New York, pp. 15- 47.
70. Council of the European Communities (1992), “Council Directive 92/40/EEC of 19th May 1992 introducing Community measures for the control of Avian influenza”, *Off. J. European Communities*, L167, 1-15

71. B. C. Easterday, Virginia S, Hinshaw, David A. Halvorson (1997), "Influenza", *Diseases of Poultry*, 10th edition, Iowa State University Press, Ames, pp.583-606.
72. Fener, F., P. A. Murphy, M. J Studdert, D. O. White (eds.) (1987), *Veterinary Virology*, Academic Press. Orlando, FL. pp. 473- 484.
73. Franklin, R. M. and E. Wecker (1950), "Inactivation of some animal viruses by hydroxylamine and the structure of Ribonucleic acid", *Nature*, 84:343-345.
74. Hinshaw, V.S., R.G. Webster, B.C. Easterday and W.J. Bean (1981), "Replication of avian influenza A viruses in mammals", *Infect Immun*, 34:345-361.
75. Hinshaw, V.S.and R.G. Webster (1982), "The natural history of influenza A viruses", *Basic and Applied influenza research*, CRC Press, Inc., Boca raton, Fl, pp 79-104.
76. Hinshaw, V.S., W.J. Bean, J. Geraci, P. Fiorelli, G. Early and R.G. Webster (1986), "Characterization of two influenza viruses from a pilot Whale", *J. Virol*, 58:655-656.
77. Hinshaw, V.S., C. W. Olsen, N. Dybdahlsissoko, D. Evans (1994), "Apoptosis: A mechanism of cell killing by influenza A and b viruses", *J. Virol*, 68:3667-3673.
78. Ian Tizard (1982), *An introduction to veterinary immunology*, Second edition, W. B. Saunders company.
79. Kawaoka. Y (1991), "Difference in receptor specificity among influenza A viruses from different species of animals", *J. Vet. Med. Sci* 53, pp.357-358.
80. Katz JM, Lu X, Frace AM, Morken T, Zaki SR, Tumpey TM.(2000),

- “Pathogenesis of and immunity to avian influenza A H5 viruses”, *Biomed Pharmacother*, 54(4): 178-87.
81. Kida, H., Y. Kawaoka, C. W. Naeve and R. G. Webster (1987), “Antigenic and genetic conservation of H3 influenza virus in wild Ducks”, *Virology*, 159:109-119.
 82. Kingsbury, D (1985), “Orthomyxo- and paramyxoviruses and their replication”, *Virology*, Raven Press, New York, pp.1157-1178.
 83. Kishida N, Sakoda Y, Isoda N, Matsuda K, Eto M, Sunaga Y, Umemura T, Kida H (2005), “Pathogenicity of H5 influenza viruses for ducks”, *Arch Virol*, 2005 Jul; 150(7):1383-92.
 84. Klenk, H. D., W. Keil, H. Niemann, R. Geyer, R. T Schwarz (1983), “The characterization of influenza virus by carbohydrate analysis”, *Curr Top Microbiol Immuno*, 104:247-57.
 85. B. Klingeborn, Englund, L, R. Rott, N. Juntti and G. Rockborn (1985), “An Avian influenza A virus killing a mammalian species - the Mink”. *Arch Virol*, 86:347-351.
 86. Liu, C (1961), “Diagnosis of influenza infection by means of fluorescent antibody staining”, *Am Rev Respir Dis*, 83:530-535.
 87. Lu X, Tumpey TM, Morken T, Zaki SR, Cox NJ, Katz JM (1999), “A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A (H5N1) viruses isolated from humans”, *J Virol*, 73(&):5903-11.
 88. Nicholas J. Savill, Suzanne G. St Rose, Matthew J. Keeling, Mark E. J. Woolhouse (2006), “Silent spread of H5N1 in vaccinated poultry”, *Nature*, 442, 757.
 89. Office International des Epizooties (2006), *Update on avian influenza in*

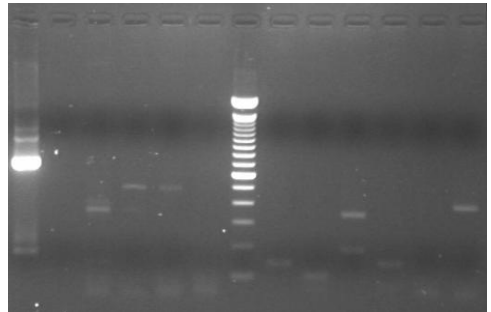
animals (typeH5),

http://www.oie.int/download/AVIAN%20INFLUENZA/A_AI-Asia.htm

90. Qiao, C.L., Yu, K.Z., Jiang, Y.P., Jia, Y.Q., Tian, G.B., Liu, M., Deng, G.H., Wang, X.R., Meng, Q.W., Tang, X.Y. (2003), "Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes", *Avian Pathol*, 32 (1), 25-32.
91. Schafer, W (1955), "Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die viren der Influenza und Klassischen", *Geflügelpest Z Naturforsch*, 10b:81-91.
92. Seo. S and R. G Webster (2001), "Cross-reactive cell-mediated immunity and protection of chickens from lethal H5N1 influenza virus infection in the HongKong poultry markets", *J. Virol* 75, pp. 2516-2525.
93. Snyder, D. B., W. W. Marquardt, F. S. Yancey, P. K. Savage (1985), "An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against avian influenza virus", *Avian Dis*, 29:136- 44.
94. Stubbs, E. L (1965), "Fowl Plague", *Diseases of Poultry*, 5th edition, Iowa State University Press, Ame, pp.813-822.
95. Suarez, D.L., Schultz, C.S. (2000), "Immunology of avian influenza virus: a review", *Dev.Comp.Immunol*, 24 (2-3), 269-283.
96. Swayne, D.E., Beck, J.R., Kinney, N. (2000a), "Failure of a recombinant fowl poxvirus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a fowl pox vaccine", *Avian Dis*, 44 (1), 132-137.
97. Swayne, D.E., Perdue, M.L., Beck, J.R., Garcia, M., Suarez, D.L., (2000b), "Vaccines protect chickens against H5 highly pathogenic avian influenza in the face of genetic changes in field viruses over multiple

- years”, *Vet.Microbiol*, 74 (1/2), 165-172.
98. Swayne DE, Beck JR, Perdue ML, Beard CW (2001), “Efficacy of vaccines in chickens against highly pathogenic Hong Kong avian influenza”, *Avian Dis*, 45(2):355-65
 99. Swayne, D.E., Suarez, D.L. (Eds) (2003), “Proceeding of the fifth International Symposium on Avian Ifluenza”, *Avian Diseases* (Special issues), Carter Comp., Richmond, USA.
 100. Terrence M. Tumpey (2004), *Animal Influenza Diagnosis and Surveillance*, Hokkaido University, August 18-23, 2004.
 101. Tian G, Zhang S, Li Y, Bu Z, Liu P, Zhou J, Li C, Shi J, Yu K, Chen H (2005), “Protective efficacy in chickens, geese ang ducks of an H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics”, *Virology*, 2005 Oct. 10; 341(1):153-62
 102. World Health Organization (1980), *A revision of the system of nomenclature for Influenza virus: a WHO memorandum*, Bull, WHO, 58, 585-591.
 103. World Health Organization (2002.5), *WHO manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance*.
 104. World Health Organization (2006), *Confirmed human cases of Avian Influenza A (H5N1)*, http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_08_17/en/index.html
 105. Yoshihiro Kawaoka (2004), “Molecular biology of Influenza virus”, WHO AI Training Course in Japan 2004.

Một số hình ảnh minh hoạ



Bộ giáo dục và đào tạo
Tr- ờng đại học nông nghiệp i

D- ình quân

khảo sát đáp ứng miễn dịch
Của ngan, vịt Với vacxin cúm gia cầm
trên thực địa

luận văn thạc sĩ nông nghiệp

Chuyên ngành: Thú y

Mã số : 60.62.50

Ng- ười h- ớng dẫn khoa học : TS. Nguyễn tiến dũng

Hà nội - 2006

Lời cam đoan

- Tôi xin cam đoan rằng, số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và ch- a từng đ- ợc sử dụng để bảo vệ một học vị nào.

- Tôi xin cam đoan rằng, mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện luận văn này đã đ- ợc cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong luận văn này đã đ- ợc chỉ rõ nguồn gốc.

Tác giả luận văn

D- Đình Quân

Lời cảm ơn

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban giám hiệu trường ĐHNN I, Khoa Sau đại học, Khoa Chăn nuôi thú y cùng các thầy cô giáo trong nhà trường đã tận tình giảng dạy, tạo điều kiện cho tôi được tiếp cận với những kiến thức khoa học về nông nghiệp trong 2 năm học ở trường.

Để hoàn thành tập luận văn này, tôi luôn nhận được sự giúp đỡ tận tình của các thầy hướng dẫn khoa học TS. Nguyễn Tiến Dũng và PGS. TS Tr- ong Quang.

Trong quá trình thực hiện đề tài tôi đã nhận được sự động viên giúp đỡ, tạo điều kiện của Ban lãnh đạo Viện Thú y, Ban lãnh đạo Phân viện Thú y Miền Trung; các anh, chị, em trong bộ môn nghiên cứu Siêu vi trùng Viện Thú y và Phân viện Thú y Miền Trung cùng các bạn bè đồng nghiệp.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới gia đình, người thân đã động viên giúp đỡ tôi vượt qua mọi khó khăn trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu thực hiện đề tài.

Tác giả luận văn

D- Đình Quân

Mục lục

Lời cam đoan	i
Lời cảm ơn	ii
Mục lục	iii
Danh mục các chữ viết tắt	vi
Danh mục các bảng	vii
Danh mục các hình	viii
1. Mở đầu	1
2. Tổng quan tài liệu	4
2.1. Giới thiệu chung về bệnh cúm gia cầm	4
2.2. Virus học bệnh cúm gia cầm	9
2.3. Miễn dịch chống bệnh cúm gia cầm	17
2.4. Dịch tễ học bệnh cúm gia cầm.	23
2.5. Triệu chứng	26
2.6. Bệnh tích	27
2.7. Chẩn đoán	27
2.8. Kiểm soát bệnh	29
3. Nội dung, nguyên liệu và ph- ơng pháp nghiên cứu	33
3.1. Nội dung nghiên cứu	33
3.2. Nguyên liệu dùng trong nghiên cứu	33
3.3. Ph- ơng pháp nghiên cứu	33
3.4. Bố trí thí nghiệm	39
4. Kết quả và thảo luận	43
4.1. Kết quả khảo sát đáp ứng miễn dịch đối với đàn vịt đẻ	44
4.1.1 Kết quả kiểm tra sự có mặt của virus H5 trong đàn vịt đẻ tr- ớc và sau khi tiêm vacxin	44
4.1.2. Kết quả kiểm tra kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt đẻ tr- ớc khi tiêm vacxin	45

4.1.3. Kết quả kiểm tra kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt đẻ sau khi tiêm vaccin	46
4.2. Kết quả khảo sát đáp ứng miễn dịch đối với đàn vịt đẻ tiêm mũi vaccin đầu tiên lúc 15 ngày tuổi	51
4.2.1 Kết quả kiểm tra sự l- u hành của virus H5 trong đàn vịt 15 ngày tuổi trước và sau khi tiêm vaccin	51
4.2.2. Kết quả kiểm tra kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt 15 ngày tuổi trước khi tiêm vaccin	54
4.2.3. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt 15 ngày tuổi sau khi tiêm vaccin	55
4.3. Kết quả khảo sát đáp ứng miễn dịch đối với đàn vịt đẻ tiêm mũi vaccin đầu tiên lúc 1 ngày tuổi	60
4.3.1 Kết quả kiểm tra sự có mặt của virus H5 trong đàn vịt 1 ngày tuổi trước và sau khi tiêm vaccin	60
4.3.2. Kết quả kiểm tra kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt 1 ngày tuổi trước khi tiêm vaccin.	62
4.3.3. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt 1 ngày tuổi sau khi tiêm vaccin	62
4.4. Kết quả khảo sát đáp ứng miễn dịch đối với đàn ngan đẻ tiêm mũi vaccin đầu tiên lúc 15 ngày tuổi	66
4.4.1. Kết quả kiểm tra sự có mặt của virus H5 trong đàn ngan 1 ngày tuổi trước và sau khi tiêm vaccin	66
4.4.2. Kết quả kiểm tra kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của ngan 15 ngày tuổi trước khi tiêm vaccin	68
4.4.3. Kết quả kiểm tra kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của ngan 15 ngày tuổi sau khi tiêm vaccin	68
5. Kết luận	754
Tài liệu tham khảo	

Danh mục các chữ viết tắt

AI	: Cúm gia cầm (Avian Influenza)
ADN	: Acid Deoxyribonucleic
ARN	: Acid ribonucleic
BNN&PTNT	: Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn
cADN	: Phân tử ADN bổ sung (Complementary ADN)
CPE	: Bệnh tích tế bào (Cytopathogen effect)
FAO	: Tổ chức Nông L- ơng Liên hợp quốc (The United Nations Food and Agriculture Organization)
HA	: Ng- ng kết hồng cầu (Haemagglutinin)
HI	: ức chế ng- ng kết hồng cầu (Haemagglutinin Inhibition)
HPAI	: Virus cúm gia cầm thể độc lực cao (High Pathogenicity Avian Influenza)
LPAI	: Virus cúm gia cầm thể độc lực thấp (Low Pathogenicity Avian Influenza)
OIE	: Tổ chức dịch tễ thế giới (Office International des Epizooties)
PBS	: Dung dịch muối đệm phốt phát (Phosphate- Buffered- Saline)
RT-PCR	: Phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ng- ợc (Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction)
SPF	: Không có tác nhân gây bệnh đặc hiệu (Specific Pathogen Free)
WHO	: Tổ chức Y tế thế giới (World Health Organization)

Danh mục các bảng

Bảng 4.1. Kết quả xác định sự có mặt của virus trong dịch ngoáy ở nhớt của vịt đẻ bằng kỹ thuật RT-PCR	44
Bảng 4.2. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt đẻ đ- ợc tiêm vaccin H5N1	47
Bảng 4.3. Kết quả xác định sự có mặt của virus trong dịch ngoáy ở nhớt của vịt 15 ngày tuổi bằng kỹ thuật RT-PCR.	53
Bảng 4.4. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh vịt 15 ngày tuổi tr- ớc khi tiêm vaccin	54
Bảng 4.5. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt đ- ợc tiêm vaccin lần 1 lúc 15 ngày tuổi	56
Bảng 4.6. Kết quả xác định sự có mặt của virus trong dịch ngoáy ở nhớt của vịt 1 ngày tuổi bằng kỹ thuật RT-PCR.	61
Bảng 4.7. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh vịt 1 ngày tuổi tr- ớc khi tiêm vaccin.	62
Bảng 4.8. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của vịt đ- ợc tiêm vaccin lần 1 lúc 1 ngày tuổi	63
Bảng 4.9. Biến động hiệu giá kháng thể trung bình và tỷ lệ bảo hộ của đàn vịt đ- ợc tiêm vaccin lúc 1 ngày tuổi	65
Bảng 4.10. Kết quả xác định sự có mặt của virus trong dịch ngoáy ở nhớt của ngan đ- ợc tiêm vaccin cúm gia cầm H5N1 lúc 15 ngày tuổi bằng kỹ thuật RT-PCR.	67
Bảng 4.11. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng virus H5 trong huyết thanh của ngan đ- ợc tiêm vaccin lần 1 lúc 15 ngày tuổi	69

Danh mục các hình

Hình 2.1. Virus cúm nhìn d-ới kính hiển vi điện tử [32]	10
Hình 2.2. Mô hình cấu trúc của virus cúm A H5N1 [105]	10
Hình 2.3. Sơ đồ mô tả sự nhân lên của virus cúm [100]	13
Hình 4.1. Kết quả xác định virus H5 trong đàn vịt đẻ bằng phản ứng RT - PCR.	45
Hình 4.2. Biến động hiệu giá kháng thể trung bình của đàn vịt đẻ sau khi tiêm vaccin cúm gia cầm H5N1	49
Hình 4.3: Sự biến động của tỷ lệ vịt có kháng thể và tỷ lệ bảo hộ sau khi tiêm vaccin cúm gia cầm H5N1 cho vịt đẻ	50
Hình 4.4. Kết quả xác định virus H5 trong đàn vịt 15 ngày tuổi bằng phản ứng RT - PCR.	53
Hình 4.5: Sự biến động hiệu giá kháng thể trung bình của vịt đ-ợc tiêm mũi vaccin H5N1 đầu tiên lúc 15 ngày tuổi	58
Hình 4.6: Sự biến động của tỷ lệ vịt có kháng thể và tỷ lệ bảo hộ sau khi tiêm vaccin cúm gia cầm H5N1 cho vịt lúc 15 ngày tuổi	59
Hình 4.7. Kết quả xác định virus H5 trong đàn vịt 1 ngày tuổi bằng phản ứng RT - PCR.	61
Hình 4.8. Sự biến động hiệu giá kháng thể trung bình	65
Hình 4.9. Kết quả xác định virus H5 trong đàn ngan 15 ngày tuổi bằng kỹ thuật RT-PCR.	67
Hình 4.10. Biến động hiệu giá kháng thể trung bình của đàn ngan đ-ợc tiêm mũi vaccin đầu tiên lúc 15 ngày tuổi	71
Hình 4.11 Sự biến động tỷ lệ ngan có kháng thể và tỷ lệ bảo hộ của đàn ngan đ-ợc tiêm mũi vaccin đầu tiên lúc 15 ngày tuổi	72