

SỰ LƯU HÀNH BỆNH CÚM CHÓ H3N2 TRÊN ĐỊA BÀN HÀ NỘI

Nguyễn Thành Trung*, Nguyễn Văn Giáp, Lê Văn Phan, Đào Công Duẩn,
Đàm Văn Phải, Phạm Ngọc Thạch

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email: nttrung.hua@gmail.com*

Ngày nhận bài: 26.02.2016

Ngày chấp nhận: 29.04.2016

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này 150 mẫu swab dịch hầu họng và niêm dịch mũi của chó nghi mắc bệnh cúm H3N2 thu thập được ở khu vực Hà Nội từ tháng 5/2015 đến 2/2016 đã được chẩn đoán bằng phương pháp RT-PCR. Kết quả chẩn đoán cho thấy tỷ lệ chó bị nhiễm với virus cúm H3N2 là 6%. Trên những cá thể chó dương tính với H3N2 có các dấu hiệu lâm sàng điển hình của bệnh cúm chó như sốt, dịch mũi, ho, bỏ ăn, chảy mắt, khó thở và có thể kể phát viêm phổi. Tỷ lệ chó mắc cao nhất ở lứa tuổi 2 - 6 tháng. Chó nuôi vào mùa đông và mùa xuân có tỷ lệ mắc bệnh cao hơn trong mùa thu và mùa hè.

Từ khóa: Cúm chó, H3N2, Hà Nội.

The Prevalence of H3N2 Canine Influenza Virus in Hanoi

ABSTRACT

A total of 150 nasal swab specimens collected from H3N2 canine influenza - suspected cases in Hanoi from May 2015 to February 2016 were diagnosed by the RT-PCR method. The diagnostic results showed that 6% of swab samples were positive for H3N2 canine influenza. Dogs infected with canine influenza virus (CIV) showed typical clinical signs such as coughing, sneezing, difficulty to breathe and fever. However, some cases occasionally developed secondary complications, such as severe pneumonia. The rate of infected dogs was highest at 2-6 months old. The proportion of infected dogs with H3N2 in winter-spring was higher than in summer-autumn.

Keywords: Canine influenza, dogs, H3N2, Hanoi.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chó là loài động vật rất gần gũi và thân thiết của con người. Hiện nay, nước ta đang hòa nhập vào nền kinh tế thị trường thế giới và đang trên đà phát triển, chất lượng cuộc sống ngày càng được nâng cao; nhu cầu nuôi thú cưng cũng ngày một gia tăng, trong đó chó là loài được lựa chọn nhiều nhất. Nhiều giống chó được nhập vào nước ta, để phục vụ nhu cầu của người nuôi và làm phong phú đa dạng hơn về số lượng và chủng loại các giống chó. Song song với sự phát triển đó, nhiều dịch bệnh nguy hiểm, gây nhiều thiệt hại cho người chăn nuôi chó

cũng xảy ra; nhất là các bệnh lây nhiễm, trong đó có bệnh cúm chó. Đặc biệt, bệnh thường gặp hoặc nhầm lẫn với bệnh care, vì vậy, việc chẩn đoán chính xác bằng kỹ thuật RT-PCR là thực sự cần thiết.

Bệnh cúm chó đã được phát hiện ở các nước Thái Lan (Bunpapong *et al.*, 2014), Hàn Quốc (Baek *et al.*, 2009; Lyoo *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2009), Trung Quốc (Li *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013) và Kyrgyzstan (Parms *et al.*, 2015). Tuy nhiên, rất ít thông tin hoặc chưa có nghiên cứu nào tại Việt Nam về bệnh cúm chó. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm làm rõ sự lưu hành của bệnh trên địa bàn Hà Nội và nâng cao hiệu quả phòng, trị bệnh, làm giảm thiệt hại cho

ngành chăn nuôi chó, đồng thời bổ sung vào các tài liệu nghiên cứu bệnh cúm chó ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu bao gồm tất cả những cá thể chó bị nghi mắc bệnh có biểu hiện lâm sàng liên quan đến bệnh cúm như sốt, dữ mũi, ho, máy mũi và đã được chẩn đoán dương tính với bệnh cúm chó H3N2 bằng phản ứng RT-PCR.

2.2. Nội dung

Xác định tỷ lệ chó mắc bệnh cúm H3N2 tại phòng khám thú y Animal Care (424/16 Thụy Khuê, Tây Hồ, Hà Nội) bằng phản ứng RT-PCR.

Điều tra một số đặc điểm dịch tễ của bệnh cúm chó H3N2 theo giống, lứa tuổi, mùa và theo dõi một số triệu chứng lâm sàng điển hình của bệnh.

2.3. Phương pháp

2.3.1. Thu thập mẫu bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm được thu thập gồm swab dịch hầu họng và niêm mạc dịch mũi trong PBS (pH7,4) của chó nghi mắc bệnh với các biểu hiện lâm sàng liên quan đến bệnh cúm như sốt, dữ mũi, ho, máy mũi. Mẫu được bảo quản ở -70°C cho tới khi kiểm tra. Các mẫu bệnh phẩm này được thu thập từ tháng 5/2015 đến tháng 2/2016.

2.3.2. Phương pháp RT-PCR

Bao gồm các bước thiết kế mồi và thực hiện kỹ thuật RT-PCR.

Thiết kế mồi: Các cặp mồi đặc hiệu dùng trong nghiên cứu này được lựa chọn dựa theo các nghiên cứu đã công bố trước đây. Thông tin về cặp mồi được trình bày ở bảng 1.

Tách và tinh sạch ARN tổng số từ dịch swab hầu họng và niêm mạc mũi chó nghi mắc bệnh. Các bước chiết tách ARN tổng số huyền dịch virus được thực hiện theo các bước sau: Ly giải mẫu bằng TRIzol Reagent (Invitrogen); tách pha ARN bằng chloroform; rửa ARN bằng iso-propanol; rửa rửa ARN bằng 1ml cồn 75% (pha trong nước cất đã xử lý bằng DEPC); sau đó hòa tan rửa ARN trong 30µl nước cất 3 lần đã xử lý bằng DEPC. ARN sau tách chiết được đưa đi tổng hợp cDNA và phần ARN còn lại được bảo quản ở -70°C.

Tổng hợp cDNA được tiến hành bằng kit Invitrogen (Hàn Quốc) với random primer (10pmol) 2µl, ARN tổng số 10µl để 65°C/15 phút và giữ ở 4°C. Sau đó cho dNTPs (40mM) 1µl, DTT (0,1M) 2µl, First strand buffer (5x) 4µl, MMLV (200 U/µl) 1µl để 25°C/5 phút, 37°C/60 phút và 72°C/10 phút và giữ ở 4°C.

Tối ưu hóa phản ứng PCR.Sử dụng kit PCR i-Star Master với các thành phần được phối hợp sẵn. Thể tích cuối cùng của phản ứng là 20µl gồm 17µl i-Star Master mix solution + 1µl mỗi xuôi + 1µl mỗi ngược + 1µl cDNA.

Phản ứng PCR để chẩn đoán virus cúm A với cặp mồi AIVF/AIVR được thực hiện với chu trình nhiệt ở bảng 2. Sản phẩm PCR được phân tích bằng phương pháp điện di trong thạch agarose 1,5%, có bổ sung lượng thuốc nhuộm phù hợp (RedSafe™Nucleic Acid Staining Solution (20.000x) và được đọc kết quả bằng máy UV.

Bảng 1. Trình tự mồi dùng chẩn đoán sử dụng trong phản ứng RT-PCR

Mồi xuôi/ngược	Trình tự mồi (5' - 3')	Kích thước (bp)	Gen khuếch đại	Tài liệu tham khảo
AIVF	CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG	244	M	(Fouchier <i>et al.</i> , 2000)
AIVR	AGG GCA TTT TGG ACA AAG/T CGT CTA			
HA3F	AAAGCAAACCTTAGTGATTTTCGAAAGG	381	H3	(Lee <i>et al.</i> , 2016b)
HA3R	CATAATGTTATTTGTCCAAACTATTTTC			
NA2F	GGCAGGGGACCAAGCTGAACAATAACA	747	N2	(Lee <i>et al.</i> , 2016a)
NA2R	GTCCAGCCACCAATGACCTTGAAAGTCTC			

Bảng 2. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR dùng chẩn đoán virus cúm A

Cặp mồi	Giai đoạn phản ứng	Nhiệt độ(°C)	Thời gian (giây)	Số vòng lặp lại
AIVF/AIVR	Tiền biến tính	94	180	1
	Biến tính	94	30	35
	Bắt mồi	50	30	
	Kéo dài	72	30	
	Kéo dài cuối cùng	72	420	1

Bảng 3. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR dùng chẩn đoán virus cúm H3N2

Cặp mồi	Giai đoạn phản ứng	Nhiệt độ(°C)	Thời gian (giây)	Số vòng lặp lại
HA3F/HA3R NA2F/NA2R	Tiền biến tính	94	180	1
	Biến tính	94	30	35
	Bắt mồi	55	30	
	Kéo dài	72	30	
	Kéo dài cuối cùng	72	420	1

Nếu sản phẩm PCR dương tính sẽ tiếp tục được định type (subtype) với cặp mồi HA3F/HA3R và NA2F/NA2R. Chu trình nhiệt được thể hiện ở bảng 3.

2.3.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bởi phần mềm Excel 2010.

Thí nghiệm được thực hiện từ tháng 5/2015 đến tháng 2/2016.

2.4. Địa điểm nghiên cứu

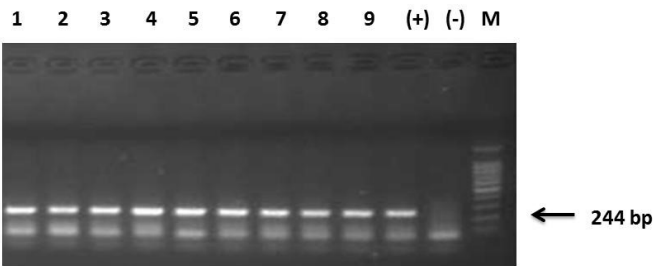
Nghiên cứu được tiến hành tại Phòng khám

Animal Care (424/16 Thụy Khuê, Tây Hồ, Hà Nội), cùng với sự giúp đỡ của Phòng thí nghiệm Nghiên cứu và phát triển, Công ty Cổ phần Công nghệ phát triển nông thôn (RTD) và Phòng thí nghiệm vi sinh vật của Trường Đại học Y Hà Nội.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

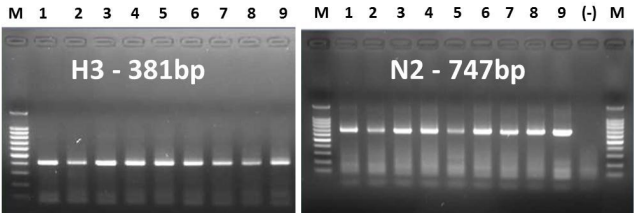
3.1. Kết quả khảo sát tình hình mắc bệnh trên các ca chó kiểm tra

Kết quả chẩn đoán virus cúm A trên các ca chó kiểm tra thể hiện qua hình 1.



Hình 1. Kết quả chẩn đoán virus cúm A bằng phản ứng PCR

Ghi chú: M: DNA marker 100bp, giếng 1-9: số mẫu kiểm tra, (+) đôi chứng dương, (-) đôi chứng âm



Hình 2. Kết quả kiểm tra virus cúm H3N2 bằng phản ứng PCR với các cặp mồi HA3F/HA3R và NA2F/NA2R

Ghi chú: M: DNA marker 100bp, giếng 1-9: số mẫu dương tính với cúm A, (-) đối chứng âm

Từ hình 1 cho thấy, trong 150 mẫu bệnh phẩm swab thì có 9 mẫu dương tính với virus cúm A có vạch sáng đúng với kích thước của mỗi thiết kế là 244 bp từ giếng 1 đến giếng 9. Giếng đối chứng dương có vạch sáng kích thước đúng với thiết kế. Giếng đối chứng âm không có vạch sáng của mẫu kiểm định âm tính.

Chín mẫu dương tính với cúm A tiếp tục được định type (subtype) bằng phản ứng PCR với các cặp mồi HA3F/HA3R và NA2F/NA2R. Kết quả thể hiện ở hình 2.

Từ hình 2 cho thấy, 9 mẫu dương tính với virus cúm A đều dương tính với virus cúm H3N2 với kích thước lần lượt là 381bp với H3 và 747bp với N2. Như vậy, tỷ lệ chó có phản ứng dương tính với H3N2 là 6 % (9/150). Tuy nhiên, đây là nghiên cứu đầu tiên để cập về bệnh, làm cơ sở cho việc

nghiên cứu các đặc điểm về dịch tễ của bệnh.

3.2. Một số đặc điểm dịch tễ của bệnh cúm chó H3N2

3.2.1. Tỷ lệ mắc bệnh cúm chó H3N2 theo giống

Bảng 4 cho thấy tỷ lệ chó bị nhiễm H3N2 với các triệu chứng điển hình trên tổng số chó được kiểm tra là 6%. Trong số 7 giống chó được đưa đến khám, giống chó có tầm vóc bé như Fox (9,52%), Chihuahua (10%) có tỉ lệ mắc bệnh cao hơn so với những giống chó có tầm vóc lớn như Alaska (4,76%). Bên cạnh đó, tỷ lệ nhiễm bệnh cúm chó H3N2 của giống chó nội (5%) thấp hơn chó ngoại (6,36%). Kết quả nghiên cứu này cũng giống công bố của các tác giả ở Hàn Quốc (Song *et al.*, 2009).

Bảng 4. Kết quả kiểm tra xác định tỷ lệ mắc bệnh H3N2 bằng kỹ thuật PCR trên các giống chó khác nhau

Nhóm chó	Giống chó	Số chó theo dõi (con)	Số chó dương tính với H3N2 (con)	Tỷ lệ (%)
Bản địa	Chó vàng	17	1	5,88
	Phú Quốc	23	1	4,35
	Tổng	40	2	5,0
Ngoại nhập	Fox	21	2	9,52
	Chihuahua	20	2	10,0
	Fox sóc	18	1	5,56
	Nhật	30	1	3,33
	Alaska	21	1	4,76
	Tổng	110	7	6,36
Tổng		150	9	6,0

Bảng 5. Kết quả kiểm tra tình hình mắc bệnh cúm chó H3N2 theo lứa tuổi

Nhóm tuổi (tháng)	Số chó khảo sát (con)	Số chó mắc bệnh (con)	Tỷ lệ mắc(%)
< 2	31	2	6,45
2 - < 6	50	4	8,0
6 - < 12	29	2	6,9
> 12	40	1	2,5
Tổng	150	9	6,0

Bảng 6. Tỷ lệ chó mắc bệnh cúm chó H3N2 theo mùa

Mùa vụ (5/2015 - 2/2016)	Số chó mắc bệnh (con)	Tỷ lệ (%)
Xuân (tháng 2)	4	44,44
Hè (tháng 5 - 7)	0	0
Thu (tháng 8 - 10)	1	11,12
Đông (tháng 11 - 1)	4	44,44
Tổng	9	100

Bảng 7. Tỷ lệ các triệu chứng lâm sàng điển hình ở chó mắc bệnh cúm chó H3N2

Triệu chứng	Số chó biểu hiện (n = 9)	Tỷ lệ (%)
Sốt > 40°C	9	100
Ăn ít	7	77,78
Bỏ ăn	8	88,89
Chảy dịch mũi xanh	9	100
Rối loạn hô hấp, ho	9	100
Máy mũi	9	100

Để đánh giá ảnh hưởng của độ tuổi đối với tỷ lệ mắc bệnh cúm chó H3N2, việc điều tra, tập hợp bệnh án của những ca bệnh mang tới phòng khám và những ca mắc cúm chó H3N2 được thực hiện, kết quả được trình bày ở bảng 5.

Từ bảng 5 cho thấy, chó ở các lứa tuổi khác nhau có tỷ lệ mắc bệnh khác nhau. Chó ở độ tuổi từ 2 - 6 tháng tuổi mắc bệnh với tỷ lệ cao nhất (8,0%), thấp nhất ở chó trên 12 tháng tuổi (2,5%). Các nhóm tuổi nhỏ hơn 2 tháng (6,45) và từ 6-12 tháng tuổi (6,9%).

3.2.2. Tỷ lệ chó mắc bệnh cúm H3N2 theo mùa

Kết quả khảo sát tỷ lệ mắc bệnh cúm chó H3N2 theo mùa được trình bày ở bảng 6.

Kết quả bảng 6 cho thấy, có sự sai khác rõ rệt giữa tỷ lệ mắc bệnh ở mùa đông, mùa xuân

với mùa hè và mùa thu. Trong khảo sát này, tỷ lệ nhiễm bệnh cúm H3N2 ở chó xuất hiện nhiều vào mùa đông và mùa xuân (44,44%), còn tỷ lệ nhiễm bệnh ít hơn vào mùa hè (0%) và mùa thu (11,12%). Do giới hạn về thời gian, để hiểu rõ tỷ lệ mắc bệnh cúm H3N2 theo mùa cần những nghiên cứu đầy đủ hơn.

3.3. Triệu chứng lâm sàng của chó mắc bệnh cúm chó H3N2

Biểu hiện lâm sàng của bệnh cúm chó H3N2 là sốt thường xảy ra sớm. Tiếp theo là ho và máy mũi. Kết quả theo dõi biểu hiện lâm sàng ở 9 con chó dương tính với phản ứng RT-PCR được trình bày ở bảng 7.

Theo kết quả ở bảng 7, có tới 100% ca bệnh mang tới phòng khám có biểu hiện sốt cao. Các

triệu chứng ăn ít (77,78%) thường xuất hiện ở những giai đoạn đầu của bệnh, khi virus mới xâm nhập vào. Bỏ ăn (88,89%), chảy dịch mũi xanh, (100%); rối loạn hô hấp, ho (100%) và máy mũi (100%) là những triệu chứng điển hình của bệnh cúm chó H3N2. Kết quả này tương đồng với triệu chứng lâm sàng của các tác giả khác (Song *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014).

4. KẾT LUẬN

Đã xác định chính xác 9 mẫu virus cúm H3N2 từ bệnh phẩm thu thập được tại phòng khám bằng phản ứng RT-PCR.

Tỷ lệ chó mắc bệnh cúm H3N2 là 6 % trong khảo sát này. Chó bệnh có các triệu chứng điển hình như chảy dịch mũi xanh, rối loạn hô hấp, ho, viêm phổi và máy mũi. Chó ở độ tuổi từ 2 - 6 tháng tuổi mắc bệnh với tỷ lệ cao nhất (8,0%). Bệnh thường xuất hiện nhiều vào mùa đông và mùa xuân.

Đây là kết quả nghiên cứu đầu tiên về bệnh cúm chó H3N2 ở Việt Nam. Kết quả này tạo tiền đề để nghiên cứu tiếp về các mặt dịch tễ học, vaccin phòng bệnh trong thời gian tới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baek, Y. H., Park, J. H., Song, Y. J., Song, M. S., Pascua, P. N., Hahn, Y. S., Han, H. S., Lee, O. J., Kim, K. S., Kang, C., and Choi, Y. K. (2009). Molecular characterization and phylogenetic analysis of H3N2 human influenza A viruses in Cheongju, South Korea. *J Microbiol.*, 47: 91-100.
- Bunpapong, N., Nonthabenjawan, N., Chaiwong, S., Tangwangvivat, R., Boonyapisitsopa, S., Jairak, W., Tuanudom, R., Prakairungnamthip, D., Suradhat, S., Thanawongnuwech, R., and Amonsin, A. (2014). Genetic characterization of canine influenza A virus (H3N2) in Thailand. *Virus Genes*, 48: 56-63.
- Fouchier, R. A., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Van Der Kemp, L., Rimmelzwaan, G. F., and Osterhaus, A. D. (2000). Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol.*, 38: 4096-4101.
- Lee, E., Kim, E. J., Kim, B. H., Song, J. Y., Cho, I. S., and Shin, Y. K. (2016a). Multiplex RT-PCR detection of H3N2 influenza A virus in dogs. *Mol Cell Probes*, 30: 56-60.
- Lee, E., Kim, E. J., Shin, Y. K., and Song, J. Y. (2016b). Design and testing of multiplex RT-PCR primers for the rapid detection of influenza A virus genomic segments: Application to equine influenza virus. *J Virol Methods*, 228: 114-122.
- Li, S., Shi, Z., Jiao, P., Zhang, G., Zhong, Z., Tian, W., Long, L. P., Cai, Z., Zhu, X., Liao, M., and Wan, X. F. (2010). Avian-origin H3N2 canine influenza A viruses in Southern China. *Infect Genet Evol.*, 10: 1286-1288.
- Lyoo, K. S., Kim, J. K., Kang, B., Moon, H., Kim, J., Song, M., Park, B., Kim, S. H., Webster, R. G., and Song, D. (2015). Comparative analysis of virulence of a novel, avian-origin H3N2 canine influenza virus in various host species. *Virus Res.*, 195: 135-40.
- Parms, T. A., Zorich, S. C., and Kramer, K. P. (2015). Influenza A(H3N2) outbreak at Transit Center at Manas, Kyrgyzstan, 2014. *Msmr* 22: 7-10.
- Song, D., Lee, C., Kang, B., Jung, K., Oh, T., Kim, H., Park, B., and Oh, J. (2009). Experimental infection of dogs with avian-origin canine influenza A virus (H3N2). *Emerg Infect Dis.*, 15: 56-58.
- Su, S., Chen, Y., Zhao, F. R., Chen, J. D., Xie, J. X., Chen, Z. M., Huang, Z., Hu, Y. M., Zhang, M. Z., Tan, L. K., Zhang, G. H., and Li, S. J. (2013). Avian-origin H3N2 canine influenza virus circulating in farmed dogs in Guangdong, China. *Infect Genet Evol.*, 19: 251-256.
- Sun, Y., Sun, S., Ma, J., Tan, Y., Du, L., Shen, Y., Mu, Q., Pu, J., Lin, D., and Liu, J. (2013). Identification and characterization of avian-origin H3N2 canine influenza viruses in northern China during 2009-2010. *Virology*, 435: 301-307.
- Yang, X., Liu, C., Liu, F., Liu, D., Chen, Y., Zhang, H., Qu, L., Li, Y., Xia, D., and Liu, M. (2014). Identification and genetic characterization of avian-origin H3N2 canine influenza viruses isolated from the Liaoning province of China in 2012. *Virus Genes*, 49: 342-347.