

MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC CHỦNG CANINE PARVO VIRUS TYPE 2 GÂY BỆNH VIÊM RUỘT TRÊN CHÓ Ở PHÍA BẮC VIỆT NAM

Trương Quang Lâm*, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Anh Tuấn,
Nguyễn Thị Yến, Nguyễn Thị Hoa, Lê Thị Luyên

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: tqlam@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 10.03.2021

Ngày chấp nhận đăng: 21.01.2022

TÓM TẮT

Bệnh viêm ruột do Canine parvo virus gây ra là bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm đối với mọi giống chó đang nuôi tại Việt Nam. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập các chủng Canine parvovirus tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam, xác định genotype và một số đặc tính sinh học trên môi trường tế bào CRFK. Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 3 chủng CPV: VNUA.CPV.HN01, VNUA.CPV.HN04 và VNUA.CPV.HY05 trên môi trường tế bào CRFK từ 30 mẫu bệnh phẩm. Kết quả phân tích cây phả hệ cho thấy các chủng phân lập đều thuộc nhóm genotype CPV2c. Các chủng virus phân lập không gây bệnh tích ở đời đầu tiên mà phải qua từ 2 đến 4 đời cấy chuyển mù mới có khả năng gây bệnh tích trên tế bào CRFK. Thời điểm xuất hiện bệnh tích tối thiểu 24 giờ sau gây nhiễm và phá hủy hoàn toàn tế bào sau 60-72 giờ nuôi. Hiệu giá virus thu được cao, đạt $10^{7.47}$ TCID₅₀/ml đối với chủng VNUA.CPV.HN04 được phân lập ở Hà Nội. Đường cong sinh trưởng của các chủng nghiên cứu đạt cao nhất ở thời điểm 60-72 giờ, sau đó giảm dần.

Từ khóa: Canine parvo virus, phân lập, PCR, giải trình tự, đặc điểm sinh học.

Biological Characterization of Canine Parvovirus Type 2 Isolates Causing Canine Parvovirus Enteritis in North Viet Nam

ABSTRACT

Canine parvovirus (CPV) is a highly contagious viral disease that commonly causes acute gastrointestinal illness in dog breeds in Vietnam. We isolated and determined genotype and biological characteristics of CPV in the CRFK cell line. Three strains of CPV, VNUA.CPV.HN01, VNUA.CPV.HN04 and VNUA.CPV.HY05 in the CRFK cell line were isolated from 30 clinical samples. The phylogenetic analysis revealed that all CPV isolates belonged to the genotype CPV2c. CPV did not cause disease in the first passage but caused cytopathogenic effect in the CRFK cells after 2 to 4 blind passages. Cytopathic effect (CPE) occurred within 24 hours post-infection and the cells were completely destroyed after 60 to 72 hours of infection. CPE viral titer was high, at $10^{7.47}$ TCID₅₀/ml. The growth curve reached the peak at 60 to 72 hours after infection and then decreased gradually.

Keywords: Canine parvo virus, Isolation, PCR, Sequencing, biological characteristics.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Canine parvovirus (CPV) là một trong những loại virus phổ biến nhất gây viêm ruột tiêu chảy trên chó. Virus này thuộc họ *Parvoviridae*, gây bệnh cho nhiều loài động vật khác nhau, từ côn trùng (phân họ *Densovirinae*) đến chim và các loài động vật có vú (phân họ *parvovirinae*) (Taguchi & cs., 2010; Snoussiand,

2014). Bệnh do parvo virus gây ra ở chó rất dễ lây lan trong tự nhiên, chiếm tới 26% tỉ lệ tử vong trong số các bệnh do virus, là một trong những loại virus rất nguy hiểm với tỉ lệ mắc bệnh cao (100%) và tỉ lệ tử vong lên đến 10% ở chó trưởng thành, 91% ở chó con (Appel & cs., 1979). CPV được cho là có nguồn gốc từ một biến thể của FPV (felin panleucopenia virus), đột biến trực tiếp từ FPV và được thích nghi trên

vật chủ mới là chó thông qua chồn và cáo. Bệnh được đặc trưng bởi hai thể lâm sàng; (i) thể ruột còn được gọi là viêm ruột xuất huyết, đây là dạng phổ biến của bệnh, triệu chứng nôn mửa tiêu chảy phân sẫm màu hoặc có máu; (ii) thể viêm cơ tim xảy ra ở chó con dưới 4 tuần tuổi (Hayes & cs., 1979). Thời gian ủ bệnh dao động từ 3 đến 14 ngày, đối với những cá thể chó bị mắc bệnh virus được bài thải ra ngoài môi trường qua phân bắt đầu từ ngày thứ 4-5 của thời kỳ ủ bệnh, kéo dài trong suốt thời gian biểu hiện triệu chứng lâm sàng và 10 ngày sau khi hồi phục (Decaro & cs., 2005b).

CPV được công bố xuất hiện lần đầu tiên ở châu Âu vào khoảng năm 1976 và nhanh chóng lây lan một cách không kiểm soát sau đó 2 năm. Qua các kết quả nghiên cứu cho thấy CPV-2 có khả năng tạo ra các biến thể kháng nguyên giống như virus cúm ở người (Shackelton & cs., 2005), minh chứng là có đến 3 chủng biến thể CPV-2a, CPV2b, CPV-2c trong vòng 3 thập kỷ qua (Raj & cs., 2010). Vào năm 2000, biến thể CPV-2c với axit glutamic ở vị trí 426 lần đầu tiên được xác định ở Ý và sau đó lần lượt ở Tây Ban Nha, Đức, Nhật Bản, Mexico và Hoa Kỳ công bố sự có mặt của CPV-2c trên chó mắc bệnh. Các biến thể CPV-2c hiện nay xuất hiện phổ biến ở Châu Á như ở Trung Quốc, Đài Loan, Lào, Thái Lan và Việt Nam (Minh Hoang & cs., 2018; Tuong Nguyen Manh & cs., 2020).

Mặc dù được coi là mầm bệnh truyền nhiễm quan trọng trên chó, nhưng vấn đề nghiên cứu về phân lập và xác định đặc tính sinh học của Canine parvovirus tại Việt Nam còn rất hạn chế. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm phân lập và xác định một số đặc tính sinh học của các chủng CPV2 thực địa lưu hành tại Việt Nam. Ngoài ra cung cấp thêm thông tin khoa học liên quan đến genoype gây bệnh hiện nay, khả năng sinh trưởng của virus phục vụ nghiên cứu và đào tạo.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu bệnh phẩm bao gồm máu (huyết thanh), phân và nội tạng được thu thập từ từng

cá thể chó dương tính với CPV đã được giám định bằng phương pháp PCR.

Hóa chất, dụng cụ, trang thiết bị phục vụ nghiên cứu bao gồm: tế bào Crandell-Rees Feline Kidney (CRFK), môi trường nuôi cấy tế bào DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Corning), FBS (huyết thành bào thai bò), Trypsin, PBS (Phosphate buffer saline), kit tách chiết DNA (Qiagen), GoTaq PCR green (Promega), tủ cấy an toàn sinh học cấp II, tủ ấm CO₂, máy PCR, máy điện di, máy ly tâm, máy vortex, bình nuôi cấy tế bào, khay 12 giếng, pipet các loại, đầu tip các loại, ống ly tâm 15ml và 50ml...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xử lý mẫu

Các mẫu dương tính với CPV được giám định bằng phương pháp PCR sẽ được sử dụng để phân lập. Các mẫu phân sẽ được hòa tan trong dung dịch muối đệm PBS 0,1M có bổ sung kháng sinh streptomycin (100 mg/l) và penicilin (1 lac U/I) và ly tâm ở 12.000 vòng/5 phút. Thu dịch nổi, lọc qua màng 0,22µm sau đó thu mẫu và lưu ở -81°C.

2.2.2. Nuôi cấy tế bào CRFK

Tế bào CRFK được bảo quản trong nitơ lỏng được đưa ra ngoài giải đông. Tế bào sau giải đông được đưa vào ly tâm chứa thêm 5ml môi trường DMEM. Ly tâm ở 1.500 vòng/5 phút để loại bỏ hết chất bảo quản thu cận tế bào. Hoàn nguyên cận tế bào trong 1ml môi trường DMEM sau đó chuyển tế bào vào bình nuôi cấy chứa 5ml DMEM bổ sung 10% FBS và 1% kháng sinh. Nuôi tế bào ở 37°C với 5% CO₂. Theo dõi sự phát triển của tế bào đến khi tế bào mọc đủ dày trên bề mặt bình nuôi cấy.

2.2.3. Phân lập virus

Tế bào CRFK được nuôi ở trong bình nuôi cấy tế bào T-25 với diện tích đáy 25cm² chứa môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS (Fetal bovine serum) và 1 % PenStrep, nuôi tế bào ở điều kiện nhiệt độ 37°C với 5% CO₂, khi tế bào phát triển phủ hết đáy bình thì tiến hành gây nhiễm.

Mẫu bệnh phẩm cho kết quả dương tính với CPV đã xử lý và lưu ở -80°C trước đó được gây nhiễm lên môi trường tế bào CRFK.

Tế bào đã chuẩn bị ở trên loại bỏ hết môi trường và được rửa lại với dung dịch muối đệm PBS 0,1M. Sau đó gây nhiễm 500µl mẫu bệnh phẩm đã chuẩn bị. Tiến hành ủ trong thời gian 90 phút ở 37°C sau đó bổ sung 5ml môi trường phân lập (DMEM với 5% FBS, 1% PenStrep) nuôi cấy ở điều kiện 37°C với 5% CO₂ trong 5 ngày.

Bình tế bào sau gây nhiễm virus được theo dõi bệnh tích tế bào bằng kính hiển vi soi ngược mỗi 12 giờ một lần, và tiến hành thu bình tế bào gây nhiễm virus khi xuất hiện bệnh tích tế bào khoảng 70-90% diện tích đáy bình, và lưu ở -80°C. Nếu 5 ngày không xuất hiện bệnh tích tế bào thì thu dịch nuôi và tế bào, lưu ở -80°C. Bình tế bào sau gây nhiễm được đông tan 3 lần ở nhiệt độ phòng, ly tâm loại bỏ tế bào thu dịch nổi. Đối với các mẫu chưa xuất hiện bệnh tích tế bào sẽ được cấy chuyển các đời tiếp theo đến khi có bệnh tích.

2.2.4. Phương pháp PCR

Các mẫu bệnh phẩm của chó nghi ngờ mắc Canine parvo virus được thu thập, kiểm tra và được giám định bằng phương pháp PCR. Mẫu bệnh phẩm được tách chiết bằng Kit Qiagen, các bước tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản

xuất. DNA sau tách chiết được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Nghiên cứu sử dụng cặp mồi để chẩn đoán định tính Canine Parvo virus 555for/555rev (Bảng 1).

Mẫu DNA sau khi tách chiết sẽ được hỗn hợp với các thành phần phản ứng của Kit Invitrogen bao gồm: 6,5µl nuclease-free water; 12,5µl master mix; 1µl reverse primer; 1µl forward primer; 5µl khuôn mẫu DNA. Đối chứng dương là DNA CPV dương tính, đã được khẳng định bằng PCR và giải trình tự thuộc Đề tài trọng điểm cấp Học viện, nghiệm thu 2019. Chu trình nhiệt được thực hiện gồm 3 bước: Tiền biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút; Chu kỳ lặp lại 40 lần: Biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 40 giây, gắn mồi ở 57°C trong 40 giây, tổng hợp kéo dài ở 72°C trong 50 giây; Hoàn thành ở 72°C trong 5 phút. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR: Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,2%. Điện di ở hiệu điện thế 100V cường độ 100mA, thời gian điện di trong 30 phút. Kết thúc điện di, bản gel được lấy ra nhuộm Red gel trong khoảng 5-7 phút. Sau khi nhuộm bản gel được chuyển vào máy phát tia UV để quan sát kết quả điện di. Vị trí các đoạn DNA được phát hiện bằng những vệt sáng tương ứng của thuốc nhuộm, chụp ảnh và đọc kết quả. Kết quả dương tính khi mẫu cho kích thước sản phẩm DNA theo đúng thiết kế mồi, mẫu âm tính không có sản phẩm DNA.

Bảng 1. Trình tự nucleotide của cặp mồi sử dụng trong phát hiện Canine parvo virus

Mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm	Tham khảo
555for	CAGGAAGATATCCAGAAGGA	583bp	Buonavoglia & cs. (2001)
555rev	GGTGCTAGTTGATATGTAATAAACA		

Bảng 2. Bảng thống kê các mẫu bệnh phẩm thu thập được tại một số tỉnh phía Bắc

Tỉnh	Số mẫu	Mẫu thu thập		
		Huyết thanh	Phân	Nội tạng
Hà Nội	11	2	7	2
Hưng Yên	13	2	10	1
Vĩnh phúc	3	1	2	0
Bắc Ninh	6	2	3	1
Tổng	33	7	22	4

2.2.5. Xác định hiệu giá virus

Tế bào CRFK được chuẩn bị trên khay 48 giếng đạt độ phủ 95-98%. Mẫu virus cần xác định hiệu giá được pha loãng theo cơ số 10 từ 10^{-1} đến 10^{-8} , tiến hành gây nhiễm 50 μ l dung dịch virus ở các nồng độ khác nhau vào các giếng có chứa tế bào CRFK, ở mỗi nồng độ pha loãng gây nhiễm 3 giếng tế bào. Theo dõi bệnh tích trên tế bào bằng kính hiển vi soi ngược. Hiệu giá virus được xác định theo phương pháp của Spearman & Karber.

2.2.6. Xác định đường cong sinh trưởng của virus

Tế bào CRFK được chuẩn bị vào khay 96 giếng (môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS và 1% kháng sinh). Virus phân lập được gây nhiễm lên các giếng tế bào với MOI = 1 TCID₅₀/tế bào, ủ 1h ở 37°C, sau đó hút bỏ dịch và bổ sung môi trường nuôi (HIRASAWA & cs 1984). Các giếng tế bào sau gây nhiễm được thu dịch tế bào-virus, và tiến hành đông tan các giếng nuôi virus để thu toàn bộ virus trong và ngoài tế bào tại các thời điểm 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 84h, 96h sau gây nhiễm. Sau đó, dịch virus sau đông tan được tiến hành xác định hiệu giá và xây dựng đường cong sinh trưởng của virus theo biến logarit thập phân của TCID₅₀ tại mỗi thời điểm thu virus.

2.2.7. Giải trình tự gene và xây dựng cây sinh học phân tử

Sản phẩm phản ứng PCR được tinh sạch bằng bộ kit QIAquick Extraction (Qiagen, Đức), chạy phản ứng PCR sequence, sau đó giải trình tự trực tiếp sản phẩm phản ứng PCR sequence trên máy giải trình tự gene tự động CEQ-8000 (Beckman coulter, Mỹ). Dữ liệu trình tự gene thu được từ máy giải trình tự gene được xử lý bằng phần mềm MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 10). Cây sinh học phân tử được xây dựng bằng phần mềm MEGA, sử dụng phương pháp test Maximum likelihood với giá trị bootstrap là 1.000 đơn vị. Các chủng CPV tham chiếu sử dụng để xây dựng cây sinh học phân tử được thu thập từ dữ liệu trên ngân hàng gene thế giới (NCBI).

2.2.8. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm GraphPad Prism 6.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu thập mẫu chó phục vụ phân lập Canine Parvo virus

Các mẫu được thu thập tại một số phòng khám chó, mèo trên địa bàn một số tỉnh phía Bắc: Hà Nội, Hưng Yên, Vĩnh Phúc và Bắc Ninh. Việc thu thập mẫu dựa vào triệu chứng lâm sàng điển hình của bệnh và kết quả test bằng kit chẩn đoán nhanh phát hiện virus Canine parvo.

Trong tổng số 33 mẫu thu thập được bao gồm 7 mẫu huyết thanh, 22 mẫu phân và 4 mẫu nội tạng tại các tỉnh Hà Nội (11 mẫu), Hưng Yên (13 mẫu), Vĩnh Phúc (3 mẫu) và Bắc Ninh (6 mẫu). Các mẫu thu thập được chiết tách DNA và giám định bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho CPV, kết quả được trình bày ở hình 1.

Qua kết quả sàng lọc các mẫu bằng phương pháp PCR thu được 30 trên tổng số 33 mẫu dương tính với virus Canine parvo cho sản phẩm PCR có độ dài 583bp, tương ứng với sự khuếch đại một phân đoạn gen VP2 được quan sát bằng điện di trên gel (Hình 1). Các mẫu âm tính là 3 trên 30, chiếm tỉ lệ 9,09%; quá trình thu thập mẫu tại có thể do quá trình bảo quản và sử dụng kit chẩn đoán nhanh không đúng cách dẫn đến hiện tượng dương tính giả; triệu chứng lâm sàng không điển hình gây khó khăn trong quá trình thu thập mẫu.

3.2. Kết quả phân lập CPV

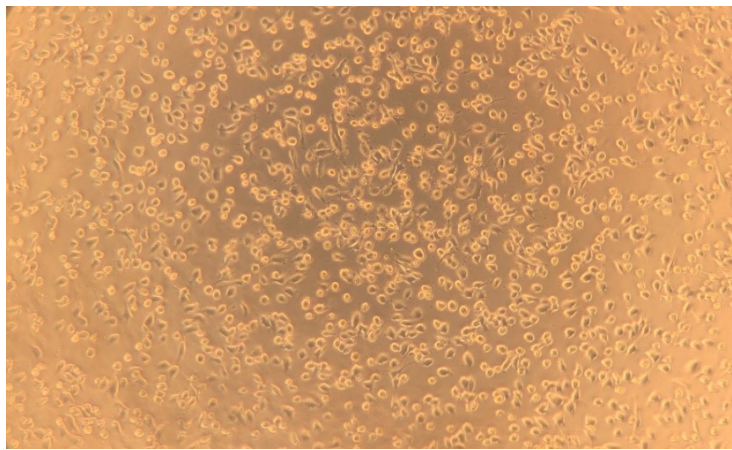
Các mẫu bệnh phẩm bao gồm phân, huyết thanh và nội tạng cho kết quả PCR dương tính đã được lựa chọn xử lý và phân lập trên môi trường tế bào CRFK. Kết quả thu được 3 trên tổng số 30 mẫu bệnh phẩm, chiếm tỉ lệ 10%. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Trong thí nghiệm này, các mẫu phân lập được cấy chuyển mù 5 đời liên tục trên tế bào CRFK, do bệnh tích trên tế bào mà CPV gây ra có thể không xuất hiện ở đời cấy chuyển đầu tiên. Sau 5 đời cấy chuyển, các mẫu không có bệnh tích tế bào được coi là âm tính.



Ghi chú: M: Marker; 1-9: Các mẫu bệnh phẩm thu thập; 10: Đối chứng dương (583bp); 11: Đối chứng âm.

Hình 1. Kết quả sàng lọc các mẫu bệnh phẩm dương tính với CPV bằng phương pháp PCR



Hình 2. Hình ảnh tế bào bị co tròn sau khi ủ virus

Bảng 3. Kết quả phân lập CPV qua các đời cấy chuyển mù liên tiếp trên tế bào CRFK

Địa phương	Số mẫu PCR dương tính	Số mẫu phân lập	Bệnh tích tế bào				
			Đời 1	Đời 2	Đời 3	Đời 4	Đời 5
Hà Nội	11	2	0	1	2	2	2
Hung Yên	12	1	0	0	0	1	1
Vĩnh Phúc	3	0	0	0	0	0	0
Bắc Ninh	4	0	0	0	0	0	0
Tổng	30	3	0	1	2	3	3

Trong quá trình phân lập, quan sát thấy hiện tượng tế bào CRFK bị co tròn và bong lên khỏi đáy bình nuôi ngay sau khi được ủ với virus (Hình 2). Các mẫu có hiện tượng trên chiếm tỉ lệ thấp, tuy nhiên các mẫu này được coi là âm tính do không thể theo dõi được bệnh tích tế bào. Hiện tượng trên có thể do hàm lượng

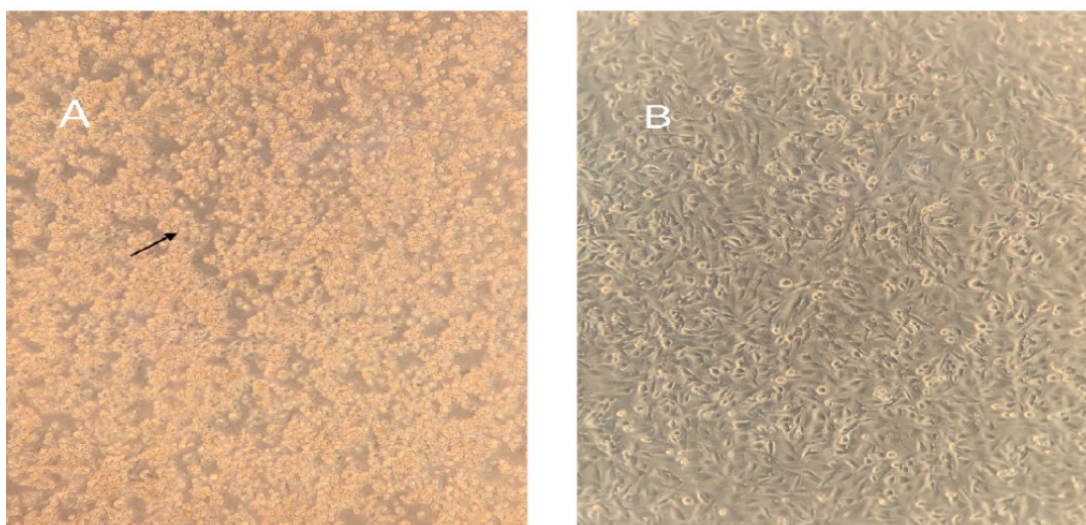
trypsin có trong các mẫu phân, ruột hoặc các độc tố không xác định trong dịch ruột hoặc mẫu phân gây ảnh hưởng đến tế bào. Các mẫu được thu thập từ nhiều địa bàn, quá trình bảo quản và vận chuyển quá lâu có thể làm giảm chất lượng của các mẫu, ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả phân lập.

Kết quả bảng 3 cho thấy, 2 chủng phân lập ở Hà Nội và 1 chủng phân lập ở Hưng Yên đều không gây bệnh tích ở đời thứ nhất. Trong 2 chủng phân lập ở Hà Nội kí hiệu là VNUA.CPV.HN04; VNUA.CPV.HN01 lần lượt xuất hiện bệnh tích ở đời cấy chuyển thứ 2; thứ 3. Chủng còn lại phân lập ở Hưng Yên kí hiệu là VNUA.CPV.HY04 xuất hiện bệnh tích ở đời cấy chuyển thứ 4. Các nghiên cứu phân lập CPV trên thế giới đều chỉ ra rằng: đối với các chủng virus khác nhau, việc ghi nhận thời điểm xuất hiện bệnh tích trên tế bào ở các đời phân lập là khác nhau. Parthiban & cs. (2011) cũng đã tiến hành phân lập CPV qua 5 đời cấy chuyển mù và thu được 3 trên tổng số 18 mẫu ở đời cấy chuyển thứ 3. Theo Kaur & cs. (2015) phân lập được 5 chủng từ 60 mẫu bệnh phẩm trong đó 4 chủng phân lập ở đời cấy chuyển thứ nhất và 1 chủng ở đời cấy chuyển thứ 2.

Virus cần có thời gian để thích nghi trên môi trường mới; số lượng virus ít, chưa đủ để

gây nên bệnh tích trên tế bào hoặc bệnh tích xuất hiện ít và ở dạng rounding: tế bào co tròn, tụ thành đám và bong tróc lên khỏi đáy bình, khiến cho việc quan sát bệnh tích trên tế bào rất dễ nhầm lẫn với các tế bào chết không do bệnh lý, đòi hỏi nhiều thời gian và công sức.

Một số công bố trên thế giới đã chỉ ra rằng ngoài CPV còn có một số virus cũng gây tiêu chảy trên chó và có khả năng gây ra bệnh tích trên tế bào CRFK: (i) CAV (OngrádI & cs., 2019); (ii) CCoV (Regan & cs., 2012). Vì vậy để khẳng định kết quả nghiên cứu phân lập các chủng CPV và tính thuần khiết, không bị tạp nhiễm với các loại virus khác. Các chủng được giám định bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho Canine Parvovirus (CPV); Canine Adenovirus (CAV); Canine Coronavirus (CCoV). Kết quả PCR cho thấy các chủng phân lập được hoàn toàn thuần khiết và không bị tạp nhiễm bởi các loại virus khác (Bảng 4, Hình 4).

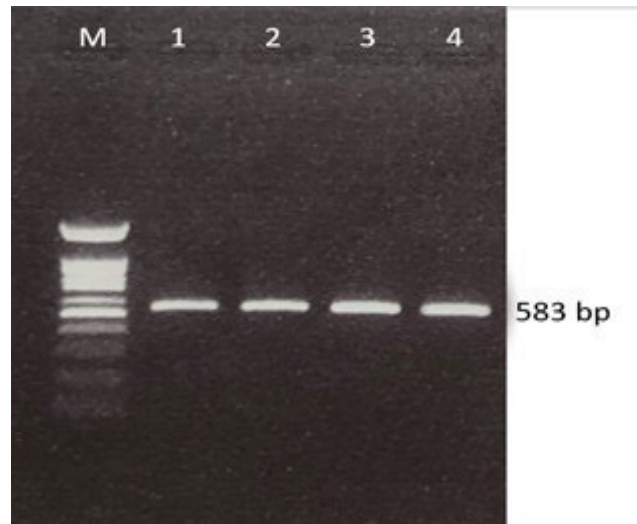


Ghi chú: (A) Bệnh tích tế bào do CPV gây ra; (B) Tế bào CRFK bình thường.

Hình 3. Bệnh tích tế bào do CPV gây ra trên tế bào CRFK sau 60h gây nhiễm

Bảng 4. Kết quả kiểm tra thuần khiết của các chủng CPV phân lập được

STT	Tên chủng	CPV	CAV	CCoV
1	VNUA.CPV.HN01	+	-	-
2	VNUA.CPV.HN04	+	-	-
3	VNUA.CPV.HY05	+	-	-



Ghi chú: M: Marker; 1: VNUA.CPV.HN01; 2: VNUA.CPV.HN04; 3: VNUA.CPV.HY05; 4: Đối chứng dương.

Hình 4. Kết quả PCR kiểm tra tạp nhiễm của các chủng phân lập được

Các phân tích so sánh trình tự đoạn gen VP2 được thực hiện bằng cách giải trình tự sản phẩm PCR dương tính (Hình 1). Kết quả phân tích nguồn gốc phát sinh loài theo sự sai khác nucleotide của đoạn gene VP2 (Hình 4) cho thấy các chủng phân lập VNUA.CPV.HN01, VNUA.CPV.HN04 và VNUA.CPV.HY05 có độ tương đồng cao về nucleotide và nằm trong nhánh phát sinh CPV2c. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với các kết quả nghiên cứu năm 2016-2018 khi xác định genotype của các chủng virus CPV2c tại Việt Nam dựa trên dữ liệu đoạn gen VP2 (Minh Hoang & cs., 2019; Tuong Nguyen Manh & cs., 2020) và cho thấy các chủng CPV-2c Việt Nam có chung nguồn gốc tiến hóa với các chủng CPV-2c châu Á. Đáng chú ý, kết quả phân tích cho thấy có sự khác biệt về nguồn gốc phát sinh và sự tương đồng đối với các biến thể CPV-2c phân lập tại Việt Nam so với các chủng vaccin thuộc genotype CPV2a, CPV2b sử dụng trong các loại vaccin thương mại nhập khẩu đang được sử dụng rộng rãi hiện nay. Nhiều loại vaccin CPV-2 đã và đang được sử dụng tại Việt Nam; tuy nhiên, chưa có nghiên cứu và tài liệu đánh giá nào về hiệu quả bảo hộ của việc tiêm vaccin CPV-2 nhập ngoại đối với các biến thể CPV-2c hiện tại đang lưu hành tại Việt Nam. Do đó, việc đánh giá hiệu quả của vaccin hiện tại đối với CPV-2c cần phải được nghiên cứu đánh giá.

3.3. Kết quả xác định một số đặc tính sinh học của các chủng CPV phân lập

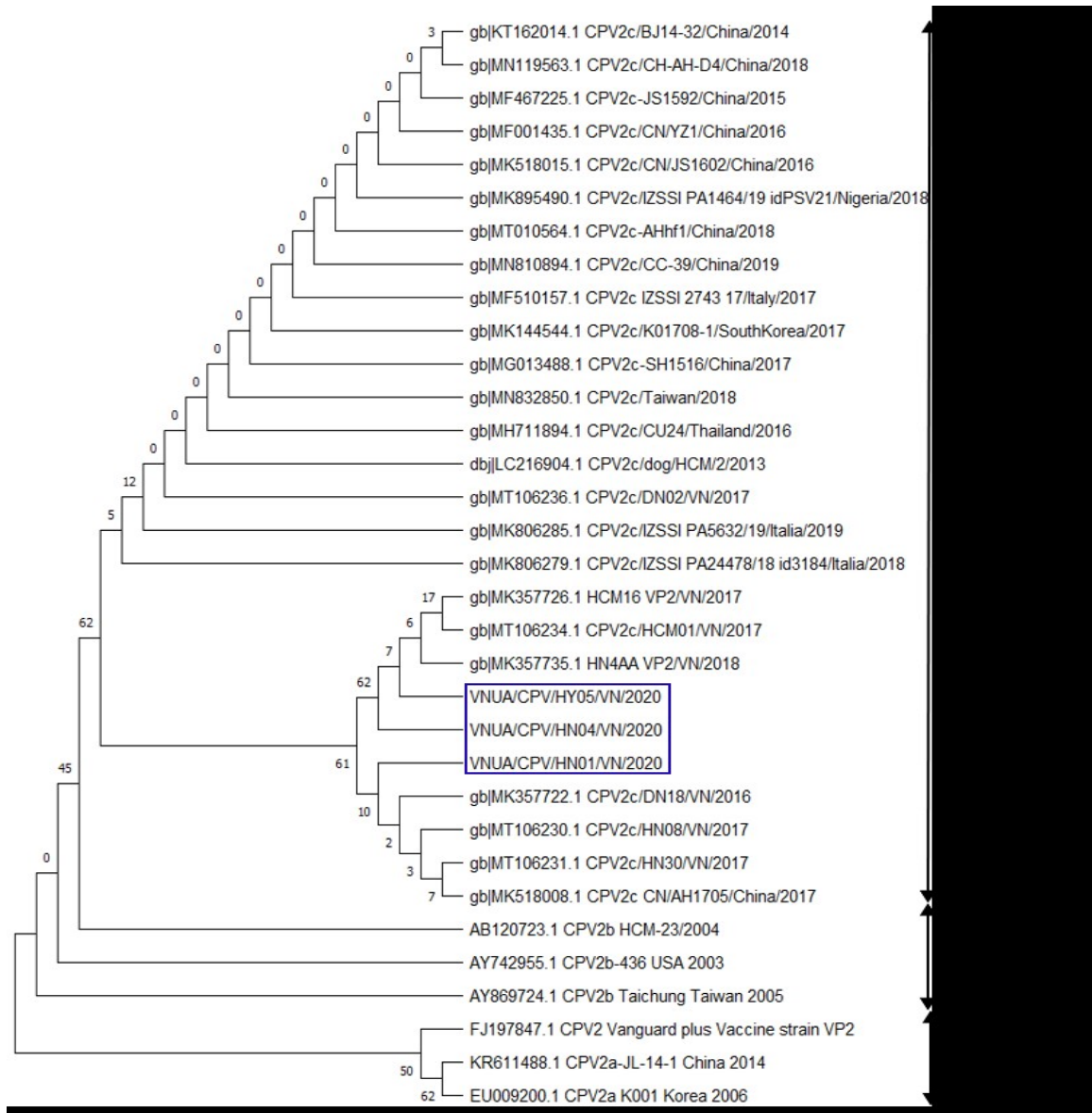
3.3.1. Kết quả xác định khả năng gây bệnh tích theo thời gian của các chủng CPV trên môi trường tế bào CRFK

Các chủng phân lập CPV được gây nhiễm trên tế bào CRFK để quan sát và theo dõi bệnh tích tại các thời điểm khác nhau sau gây nhiễm. Kết quả cho thấy thời gian tối thiểu để các chủng virus bắt đầu gây ra bệnh tích trên tế bào là 24 giờ sau gây nhiễm; phá hủy 100% tế bào ở thời điểm 60 giờ; 72 giờ sau gây nhiễm toàn bộ bệnh tích tế bào tan rã và bong lên khỏi đáy bình nuôi (Bảng 5, Hình 6).

3.3.2. Kết quả xác định hiệu giá virus

Kết quả nghiên cứu xác định hiệu giá của các chủng CPV phân lập được trình bày ở bảng 6. Trong đó, chủng virus VNUA.CPV.HN04 đạt hiệu giá cao nhất, $10^{7,47}$ TCID₅₀/ml; thấp hơn là 2 chủng VNUA.CPV.HN01, VNUA.CPV.HY05 lần lượt đạt $10^{7,13}$ TCID₅₀/ml, $10^{6,8}$ TCID₅₀/ml.

Các công bố trên thế giới chỉ ra rằng CPV có thể được phân lập trên các tế bào khác như MDCK và A-72. Chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm so sánh hiệu giá virus trên các loại tế bào này, kết quả cho thấy hiệu giá virus trên tế bào CRFK cao hơn so với hiệu giá virus trên tế bào MDCK và A-72 (Kết quả không được trình bày).



Hình 5. Cây sinh học phân tử của các chủng CPV2 dựa vào một phần đoạn gen VP2 của các chủng CPV nghiên cứu

Bảng 5. Khả năng gây bệnh tích theo thời gian của các chủng phân lập CPV nghiên cứu

Các chủng	12h	24h	36h	48h	60h	72h
VNUA.CPV.HN01	-	+	+	++	+++	B
VNUA.CPV.HN04	-	+	++	++	+++	B
VNUA.CPV.HY05	-	+	+	++	+++	B

Ghi chú: “-” chưa có bệnh tích; “+” 10-30%; “++” 30-70%; “+++” 70-100% bệnh tích tế bào; “B” tế bào bị bong tróc.

Theo nghiên cứu của Aiko Fukuma & cs. (2013) phân lập CPV trên tế bào CRFK, virus đạt hiệu giá 10^7 TCID₅₀/ml. Hiệu giá virus được phân lập trên tế bào MDCK là $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml

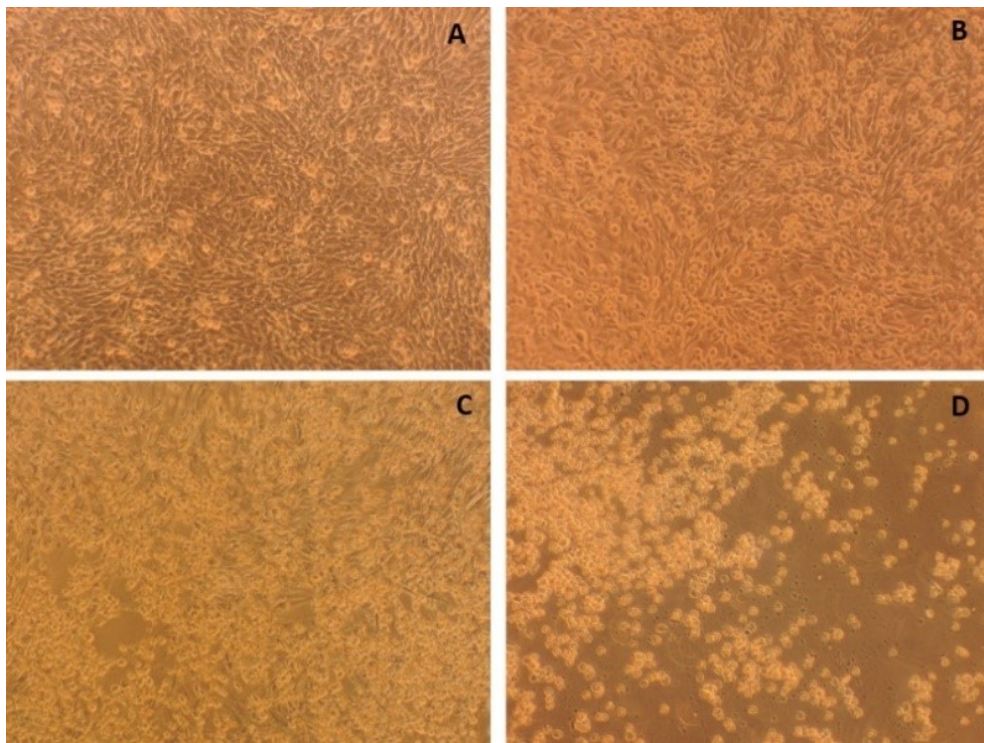
theo công bố của Mochizuki & cs. (2006). M.Horiuchi & cs. (1994) đã thử phân lập CPV trên tế bào A-72 và thu được virus có hiệu giá $2,5 \times 10^4$. Các kết quả nghiên cứu trên tương

đồng với kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi, làm cơ sở lựa chọn tế bào để phân lập được virus có hiệu giá cao

3.3.3. Đường cong sinh trưởng của các chủng virus phân lập được

Đường cong sinh trưởng được xây dựng dựa trên hiệu giá của 3 chủng virus được thu ở các thời điểm khác nhau. Kết quả ở hình 7 cho thấy chủng virus VNUA.CPV.HN04 thích nghi nhân lên trên tế bào CRFK tốt hơn 2 chủng còn lại ở các thời điểm nuôi cấy. Kết quả cũng cho thấy sự tương đồng về đặc tính sinh trưởng của các chủng virus, khả năng nhân lên và giải phóng

virus khỏi tế bào ở các thời điểm khác nhau là khác nhau. Virus bắt đầu nhân mạnh trong khoảng thời gian 12 giờ đến 48 giờ sau gây nhiễm, đạt mức độ cao nhất ở thời điểm 60 giờ sau gây nhiễm. Hiệu giá virus duy trì đến thời điểm 72 giờ sau gây nhiễm, sau đó giảm dần. Từ kết quả bảng 6 cho thấy thời điểm virus đạt hiệu giá cao nhất là khi virus phá hủy hoàn toàn tế bào và giải phóng ra ngoài, có ý nghĩa trong việc lựa chọn thời điểm thu virus thích hợp để đạt hiệu giá cao. Các chủng virus này có thể được sử dụng để nghiên cứu chế tạo vaccin chống lại các chủng CPV đang lưu hành ở Việt Nam.

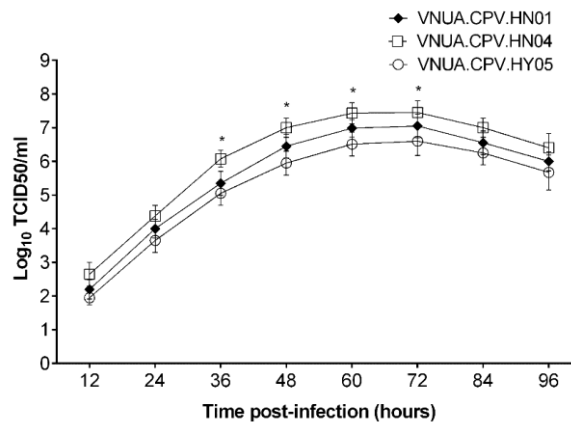


Ghi chú: (A) bệnh tích sau 24h gây nhiễm CPV; (B) bệnh tích sau 36h gây nhiễm CPV; (C) bệnh tích sau 48h gây nhiễm CPV; (D) bệnh tích sau 60h gây nhiễm CPV.

Hình 6. Bệnh tích do chủng VNUA.CPV.HN04 gây ra trên tế bào CRFK tại các thời điểm khác nhau

Bảng 6. Hiệu giá virus của các chủng CPV phân lập được

Chủng virus	Số giếng tế bào có bệnh tích ở các nồng độ								Hiệu giá (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
VNUA.CPV.HN01	3	3	3	3	3	1	0	0	7,13
VNUA.CPV.HN04	3	3	3	3	3	2	0	0	7,47
VNUA.CPV.HY05	3	3	3	3	2	1	0	0	6,8



Hình 7. Đường cong sinh trưởng của các chủng phân lập CPV trên tế bào CRFK

4. KẾT LUẬN

Tổng số 3 chủng CPV đã được phân lập từ 30 mẫu bệnh phẩm có kết quả PCR dương tính với CPV được thu thập tại Hà Nội, Hưng Yên, Bắc Ninh và Vĩnh Phúc. Các chủng phân lập VNUA.CPV.HN01, VNUA.CPV.HN04 và VNUA.CPV.HY05 đều nằm trong nhánh phát sinh genotype CPV2c.

Các chủng CPV phân lập không xuất hiện bệnh tích tế bào ở đời đầu tiên cấy chuyển mà phải qua 5 đời cấy chuyển mù. Bệnh tích tế bào quan sát được ở dạng co tròn, bệnh tích tế bào xuất hiện sau 24 giờ gây nhiễm và nhanh chóng đạt 100% trong 60 giờ sau gây nhiễm. Hiệu giá virus thu được dao động 10^7 TCID₅₀, trong đó cao nhất là chủng VNUA.CPV.HN04 với hiệu giá đạt $10^{7,47}$ TCID₅₀/ml, thấp nhất là VNUA.CPV.HY05 đạt $10^{6,8}$ TCID₅₀/ml. Virus nhân lên mạnh tại thời điểm 36 đến 48 giờ và đạt cao nhất ở 60 giờ sau gây nhiễm và sau đó giảm dần.

Kết quả trên sẽ là tiền đề cho việc triển khai các nghiên cứu tiếp theo nhằm lựa chọn được chủng giống tiềm năng phục vụ nghiên cứu sản xuất chế phẩm và vaccin phòng và điều trị bệnh trên chó.

LỜI CẢM ƠN

Bài báo này được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài: “Nghiên cứu chế tạo kháng huyết thanh tối miễn dịch để điều trị bệnh viêm ruột

tiêu chảy do Canine parvo virus gây ra trên chó” do dự án WordBank tài trợ (ĐTKHCN.WB.09/20).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Appel M.J., Carmichael L.E. & Scott F.W. (1980). U.S. Patent No. 4193990. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Buonavoglia C., Martella V., Pratelli A., Tempesta M., Cavalli A., Buonavoglia D. & Carmichael L. (2001). Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *Journal of General Virology*. 82(12): 3021-3025.
- Decaro N., Elia G., Campolo M., Desario C., Lucente M.S., Bellacicco A.L. & Buonavoglia C. (2005). New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 52(7-8): 316-319.
- Fukuma A., Yoshikawa R., Miyazawa T. & Yasuda J. (2013). A new approach to establish a cell line with reduced risk of endogenous retroviruses. *PloS one*. 8(4): e61530.
- Hayes M.A., Russel R.G., Mueller R.W. & Lewis R.J. (1979). Myocarditis in young dogs associated with a parvovirus-like agent. *The Canadian Veterinary Journal*. 20(5): 126.
- Hirasawa T., Tsujimura N. & Konishi S. (1985). Multiplication of canine parvovirus in CRFK cells. *The Japanese Journal of Veterinary Science*. 47(1): 89-99.
- Horiuchi M., Goto H., Ishiguro N. & Shinagawa M. (1994). Mapping of determinants of the host range for canine cells in the genome of canine parvovirus using canine parvovirus/mink enteritis virus chimeric viruses. *Journal of general virology*. 75(6): 1319-1328.
- Kaur G., Chandra M., Dwivedi P.N. & Sharma N.S. (2015). Isolation of Canine parvovirus with a view

- to identify the prevalent serotype on the basis of partial sequence analysis. *Veterinary world*. 8(1): 52.
- Minh Hoang, Wei-Hao Lin, Van Phan Le, Bui Thi To Nga, Ming-Tang Chiou & Chao-Nan Lin (2019). Molecular epidemiology of canine parvovirus type 2 in Vietnam from November 2016 to February 2018. *Journal of Virology*. 16.
- Mochizuki M. (2006). Growth characteristics of canine pathogenic viruses in MDCK cells cultured in RPMI 1640 medium without animal protein. *Vaccine*. 24(11): 1744-1748.
- Patterson M.G., West M.A., Shackleton V.J., Dawson J.F., Lawthom R., Maitlis S. & Wallace A.M. (2005). Validating the organizational climate measure: links to managerial practices, productivity and innovation. *Journal of organizational behavior*. 26(4): 379-408.
- Parthiban S., Mukhopadhyay H.K., Panneer D., Antony P.X. & Pillai R.M. (2011). Isolation and typing of canine parvovirus in CRFK cell line in Puducherry, South India. *Indian journal of microbiology*. 51(4): 456-460.
- Raj J.M., Mukhopadhyay H.K., Thanislass J., Antony P.X. & Pillai R.M. (2010). Isolation, molecular characterization and phylogenetic analysis of canine parvovirus. *Infection, Genetics and Evolution*. 10(8): 1237-1241.
- Snoussi K. & Kann M. (2014). Interaction of parvoviruses with the nuclear envelope. *Advances in biological regulation*. 54: 39-49.
- Shackleton L.A., Parrish C.R., Truyen U. & Holmes E. C. (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(2): 379-384.
- Taguchi M., Namikawa K., Maruo T., Lynch J. & Sahara H. (2010). Antibodies to parvovirus, distemper virus and adenovirus conferred to household dogs using commercial combination vaccines containing *Leptospira* bacterin. *Veterinary Record*. 167(24): 931-934.
- Tuong Nguyen Manh, Chutchai Piewbang, Anudep Rungsipipat & Somporn Techangamsuwan. (2020). Molecular and phylogenetic analysis of Vietnamese canine parvovirus 2C originated from dogs reveals a new Asia-IV clade. *Transboundary and Emerging Diseases*. DOI: 10.1111/tbed.13811
- Verma S., Singh M., Chander V., Glora P., Chakrovarty S., Thomas J. & Kumawat S. (2016). Isolation of canine parvovirus-2 in A-72 cell line. *J Immunol Immunopathol*. 18(2):122-126.