

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA *CORONAVIRUS* TRÊN CHÓ NUÔI TẠI THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Nguyễn Văn Dũng, Lê Việt Bảo, Lê Đình Hà Thanh
Chi cục Chăn nuôi và Thú y, Tp. Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm phát hiện, phân lập và xác định các đặc tính sinh học của các chủng *Canine Coronavirus* (CCoV) đang lưu hành trên chó nuôi ở Thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ lưu hành CCoV-II trên chó nuôi ở Thành phố Hồ Chí Minh là 10% (5/50). Tất cả các chủng CCoV-II phát hiện được đều thuộc subtype IIb và CCoV-IIb là type chính đang lưu hành trên chó nuôi. Không phát hiện chó nhiễm CCoV-I. Kết quả phân tích di truyền 1 chủng CCoV-IIb phân lập được cho thấy chủng virus này có quan hệ họ hàng gần với chủng *Coronavirus* trên động vật hoang dã ở Trung Quốc. Chủng CCoV-IIb tăng sinh tốt trên tế bào fcfw-4 hơn là các dòng tế bào khác. Thử nghiệm gây nhiễm trên chó cho thấy chủng CCoV-IIb không gây các dấu hiệu lâm sàng nhưng tạo được miễn dịch tốt trên chó gây nhiễm. Chủng CCoV-IIb phân lập được là chủng tiềm năng cho việc nghiên cứu phát triển vaccin và các sinh phẩm chẩn đoán.

Từ khóa: Chó nuôi, *Coronavirus*, type, phân lập, Tp. Hồ Chí Minh.

Isolation and identification of biological characteristics of *Canine Coronavirus* in domestic dogs in Ho Chi Minh City

Nguyen Van Dung, Le Viet Bao, Le Dinh Ha Thanh

SUMMARY

The objective of this study aimed at identifying, isolating and determining the biological characteristics of the *Canine Coronaviruses*, circulating in the domestic dogs in Ho Chi Minh City. The studied result indicated that the prevalence of CCoV-II in the domestic dogs in Ho Chi Minh City was 10% (5/50). All the detected CCoV-II belonged to subtype: CCoV-IIb. This was predominant subtype, circulating in the domestic dogs. The type: CCoV-I was not found in the domestic dogs. One CCoV-IIb strain was successfully isolated. Genetic analysis of this isolated CCoV-IIb strain showed that it possessed close relationship with the Chinese CCoV-IIb strains in the wild animals. The isolated CCoV-IIb strain grew well in fcfw-4 cells rather than in the other cell lines. There was not clinical signs in the experimental infection dogs with CCoV-IIb strain, but this virus strain generated immune response in the infection dog. The isolated CCoV-IIb was a potential strain for researching, developing vaccine and other biological products for diagnostics.

Keywords: Domestic dogs, *Coronavirus*, type, isolation, Ho Chi Minh City.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

CCoV (*Canine Coronavirus*) là một RNA virus, thuộc giống *Alphacoronavirus*. CCoV được chia thành 2 type: CCoV-I và CCoV-II, trong type CCoV-II được phân ra subtype CCoV-IIa, CCoV-IIb dựa vào trình tự amino acid vùng đầu N của gen S (Spike gene). Bệnh do CCoV trên chó thường gây các triệu chứng

liên quan đến viêm ruột. CCoV lần đầu tiên phát hiện trên chó quân đội tại Đức năm 1971[1], từ đó đến nay CCoV lây lan sang nhiều nước trên thế giới như Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc, Ý, Mỹ...v.v. Tại Việt Nam, những thông tin liên quan đến CCoV như tỷ lệ nhiễm, type lưu hành, nghiên cứu phân lập CCoV dùng sản xuất vaccin - sinh phẩm trên chó nuôi rất hạn chế,

đặc biệt là tại Thành phố Hồ Chí Minh. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và xác định các đặc tính sinh học của chủng CCoV đang lưu hành nhằm tạo cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về sản xuất vắc xin và các chế phẩm sinh học dùng trong phòng và trị bệnh trên chó nuôi.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung

Phát hiện, phân lập *Coronavirus* từ mẫu dịch ngoáy trực tràng trên chó nuôi tại Thành phố Hồ Chí Minh và xác định một số đặc tính sinh học của virus phân lập được trong *in vitro* và *in vivo*.

2.2. Nguyên liệu

Mẫu dịch ngoáy trực tràng (swab): Tổng cộng 50 mẫu swab trực tràng được thu thập từ chó nuôi trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh, có độ tuổi từ 2 tháng đến 13 năm tuổi. Mẫu swab được hòa tan trong dung dịch đệm PBS, bảo quản -80°C cho đến khi thực hiện các thí nghiệm.

Tế bào: tế bào fcwf-4 (*Felis catus* whole fetus-4, ATCC Number CRL-2787) được nuôi cấy trong môi trường DMEM (Dulbecco's minimum essential medium (Life Technologies, USA).

Vật tư, hóa chất và thiết bị: Kit ly trích RNA, kit PCR, kit tinh sạch DNA, kit giải trình tự, tủ an toàn sinh học cấp II, tủ âm, máy ly tâm, máy đun nhiệt PCR, kính hiển vi đảo ngược v.v... và các hóa chất, vật dụng thường quy khác phòng thí nghiệm.

Động vật thí nghiệm: chó nuôi giống Bealge, các động vật khi thực hiện thí nghiệm đảm bảo tính nhân đạo trên động vật.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Ly trích RNA virus và thực hiện phản ứng RT-PCR

RNA virus được ly trích từ tế bào nhiễm

CCoV sử dụng RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) và từ mẫu swab sử dụng Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Để phát hiện RNA virus trong mẫu bệnh phẩm, phản ứng RT-PCR được thực hiện dựa trên bộ kit One step RT-PCR (Qiagen) với cặp mồi ORF3F, 5'-CAC TAA ACT CAA AAT GTT GAT TC-3' và ORF3R, 5'-TTA AGG ATT AAA AAC ATA TTC TA-3' (Poder et al., 2013) cho việc phát hiện CCoV type I; cặp mồi 2bF, 5'-AGG TTG TTG TGG ATG CAT AG-3' và 2bR, 5'-ACG GTC AAG TTC GTC AAG TA-3'[2] cho việc phát hiện CCoV type II. Sản phẩm khuếch đại được phát hiện bằng kỹ thuật điện di trên agarose 2% có kích thước 628 bp đối với CCoV-I và 232 bp đối với CCoV-II. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng QIAquick PCR Purification kits (Qiagen) dùng cho việc giải trình tự.

2.3.2. Phân tích trình tự nucleotide gen S (Spike gen)

Để xác định phân type của CCoV-II, cặp mồi 1bF, 5'-TTG ATT CAA AGA TTT GAG TAT TGG-và CCVSR, 5'-GTT AGT TTG TCT AAT AAT ACC AAC ACC-3' được sử dụng để khuếch đại đầu 5' của gen S (Spike) [3]. Phản ứng RT-PCR được thực hiện với kit TaKaRa RNA LA PCR TM kit (AMV) Ver.1.1 (Takara, Japan) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3.3. Nuôi cấy phân lập virus

Các mẫu bệnh phẩm có kết quả dương tính với RT-PCR được tiến hành nuôi cấy virus trên môi trường tế bào fcwf-4. Tế bào được nuôi cấy trên môi trường DMEM (Dulbecco's minimum essential medium, Life Technologies, USA) chứa 10% FBS (Sigma-Aldrich, USA), 100 đơn vị/ml penicillin và 100 µg/ml streptomycin (Life Technologies). Tế bào fcwf-4 một lớp trong đĩa nuôi cấy 6 giếng được thêm vào dung dịch mẫu swab (sau khi đã lọc qua màng lọc) và được ủ 37°C với 5% CO₂. Tế bào gây nhiễm được theo dõi, kiểm tra bệnh tích tế bào (CPE- cytopathic effect) hàng ngày. Nếu

không phát hiện bệnh tích tế bào, tiếp tục cấy truyền trong 5 lần. Virus phân lập được tinh sạch ba lần trên tế bào fcwf-4 bằng kỹ thuật Plaque assay.

2.3.4. Tinh sạch virus bằng Plaque assay

Sử dụng lượng virus CCoV 10 PFU gây nhiễm trên tế bào fcwf-4 trên đĩa nuôi cấy tế bào 6 giếng. Sau thời gian hấp thụ 1 giờ, dịch nổi được loại bỏ và 0.8% agarose trong môi trường in DMEM chứa 10% FCS được phủ lên tế bào trong các giếng. Sau khi xuất hiện CPE, plaques được thu nhận bằng tip và hòa tan trong môi trường DMEM. Thực hiện lặp lại 3 lần theo các bước tương tự.

2.3.5. Thử nghiệm gây nhiễm trên động vật

Hai chó nuôi sạch bệnh được sử dụng cho thí nghiệm gây nhiễm CCoV phân lập được tại Việt Nam, liều gây nhiễm 10^6 PFU/ con bằng đường mũi (1ml) và đường miệng (9ml), theo dõi trong 28 ngày với các chỉ tiêu dấu hiệu lâm sàng, nhiệt độ cơ thể, thu thập mẫu phân, máu xét nghiệm định kỳ.

2.3.6. Phân tích dữ liệu

Xây dựng cây phát sinh dòng sử dụng phương pháp Neighbor-Joining với phần mềm MEGA 6.0[4]. Giá trị Bootstrap được tính toán với 1,000 lặp lại. Trình tự amino acid được suy diễn từ trình tự nucleotide dựa vào phần mềm MEGA 6.

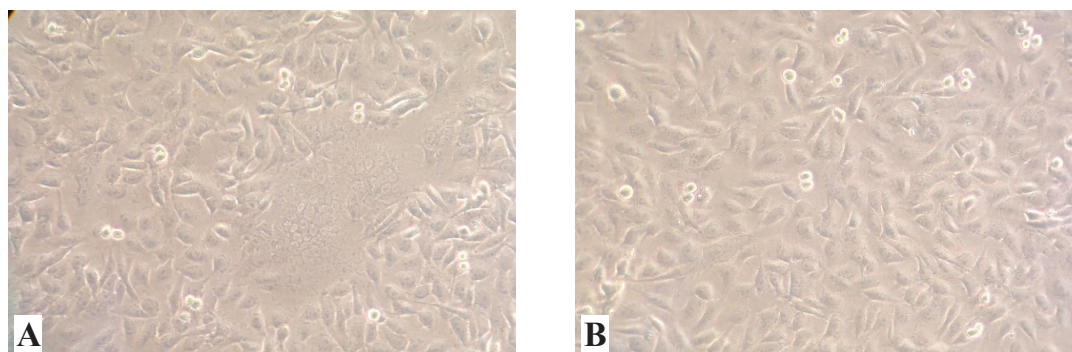
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phát hiện RNA virus trong mẫu swab

Tổng cộng có 5 mẫu bệnh phẩm được phát hiện dương tính với RT-PCR gồm mẫu 41, 45, 47, 49 và 50. Tỷ lệ nhiễm là 10% (5/50 mẫu). Kết quả xác định type, các chủng này đều thuộc CCoV-II, phân type IIb. Điều này cho thấy CCoV-IIb là type chính đang lưu hành trên chó nuôi tại Thành phố Hồ Chí Minh. Sự lưu hành CCoV đã được báo cáo ở một số nước như Nhật Bản (CCoV-I: 53,2% và CCoV-II: 56,9%) [5], Trung Quốc (CCoV-I: 4,5% và CCoV-II: 23,9%) [6], Ý (CCoV-I: 25,2% và CCoV-II: 36,3%), Anh (CCoV-I: 15,0% và CCoV-II: 20,6%), Hungary (CCoV-I: 22% và CCoV-II: 15%), Hy Lạp (CCoV-I: 37% và CCoV-II: 36%) [7], Hàn Quốc (CCoV-I: 22% và CCoV-II: 10%) [8]. Trong nghiên cứu hiện tại, không phát hiện chó nuôi nhiễm CCoV-I. Do đó, cần sử dụng thêm các cặp mồi khác nhau để nghiên cứu thêm liệu CCoV-I có hiện đang lưu hành trên đàn chó nuôi hay không.

3.2. Phân lập nuôi cấy virus

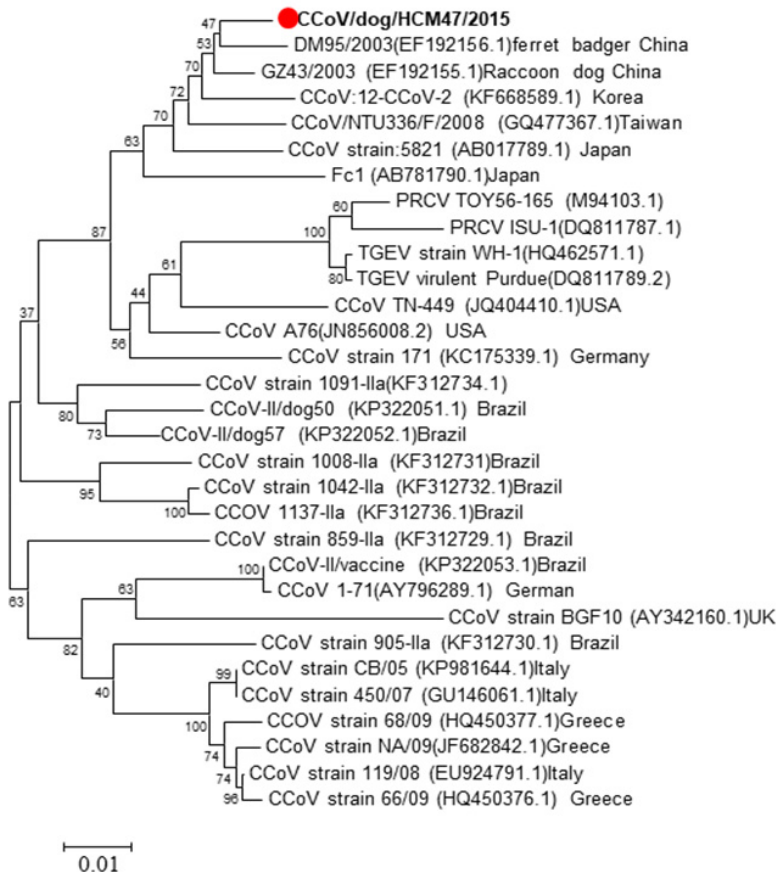
Trong số các mẫu dương tính với RT-PCR đem nuôi cấy phân lập virus, kết quả cho thấy chỉ một mẫu từ chó nuôi số 47 được phân lập thành công và đặt tên là CCoV/dog/HCM/2015. Sau 24 giờ nuôi cấy, CCoV đã gây bệnh tích tế bào đặc trưng, tạo thể hợp bào (hình 1).



Hình 1. Bệnh tích tế bào do CCoV gây ra trên tế bào fcwf-4 (A) và Mock (B)

Kết quả phân tích trình tự vùng gen S (Spike gen) cho thấy chủng CCoV/dog/HCM47/2015

tương đồng với chủng Chinese ferret badger CoV/DM95/2003 (hình 2).



Hình 2. Xây dựng cây phát sinh dòng dựa vào trình tự nucleotide gen S của CCoV

Chủng CCoV được tìm thấy trên động vật sống ở Guangzhou, tỉnh Quảng Đông, Trung Quốc[9], như vậy chủng CCoV Việt Nam và chủng từ Trung Quốc có thể có chung tổ tiên, và sự lây truyền mầm bệnh giữa các quốc gia lân cận đã xảy ra. Do đó, trong công tác phòng chống và kiểm soát lây lan bệnh do CCoV, ngoài vệ sinh phòng bệnh, sử dụng vacxin cho chó nuôi cũng cần lưu ý kiểm soát chặt chẽ chó nuôi và cả động vật hoang dã qua biên giới.

3.3. Thử nghiệm gây nhiễm trên các dòng tế bào khác nhau

Các dòng tế bào fcwf-4, A72 (ATCC®CRL

1542), CRFK (Crandell Reese Feline Kidney), MDCK (Madin Darby Canine Kidney) được chuẩn bị trên đĩa nuôi cấy tế bào (6 giếng) với môi trường DMEM có bổ sung 10% FCS. Chủng CCoV/dog/HCM47/2015 được gây nhiễm trên tế bào với lượng virus 10PFU/giếng. Theo dõi, quan sát CPE mỗi 12 giờ sau khi nhiễm. Kết quả cho thấy trên tế bào fcwf-4 xuất hiện bệnh tích sớm nhất sau 24 giờ, kế đến là tế bào A72 phát hiện bệnh tích sau 48 giờ, trong khi đó bệnh tích trên tế bào CRFK và MDCK lần lượt là sau 3-4 ngày và 4-5 ngày. Bệnh tích trên tế bào A72, CRFK, MDCK là tế bào co lại, chết và bong tróc khỏi đáy đĩa

nuôi cấy tế bào trong khi trên môi trường tế bào fcwf-4, virus gây bệnh tích điển hình là tạo thể hợp bào, bong tróc và chết. Như vậy, dòng tế bào fcwf-4 là dòng tế bào nhạy cảm nhất so với dòng tế bào A72, CRKF và MDCK. Do đó, trong phân lập CCoV-II nên sử dụng dòng tế bào fcwf-4.

3.4. Thử nghiệm gây nhiễm trên động vật thí nghiệm

Sau khi gây nhiễm CCoV, chó 1 có biểu hiện tăng nhẹ thân nhiệt trong khi chó 2 thân nhiệt ổn định, các chó thí nghiệm giảm trọng lượng khoảng 5%, tính thèm ăn của chó cũng giảm. Các chỉ số xét nghiệm máu cũng nằm trong giới hạn bình thường, ngoại trừ CRP có tăng trên cả hai chó vào ngày thứ 7 sau tiêm và trên chó 2 vào ngày thứ 17 sau tiêm (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả phân tích huyết học trên chó gây nhiễm CCoV-IIb phân lập được tại Tp. Hồ Chí Minh

Chỉ tiêu phân tích	Chó	Ngày sau khi gây nhiễm							
		0	3	7	10	14	17	21	27
C-Reactive protein (0,0-0,76mg/dl)	1	0,1	0,65	1,2	0,45	0,15	0,15	0,15	0,15
	2	0,15	0,25	2,65	0,6	0,2	6,8	0,7	0,25
Protein tổng số (5,0-7,2g/dl)	1	64	6,4	6,6	7	6,9	6,6	6,8	6,8
	2	6,6	6,5	6,5	6,4	7	7,1	6,8	7,1
Dung tích hồng cầu (29-55%)	1	50	47	49	54	51	49	50	46
	2	60	54	45	58	45	57	49	45
Tế bào hồng cầu ($495-787 \times 10^4/\mu\text{l}$)	1	694	678	676	652	702	685	722	671
	2	824	774	685	812	869	675	739	652
Tế bào bạch cầu ($59-166 \times 10^2/\mu\text{l}$)	1	117	80,5	105	141	159	125,8	129	138
	2	138	102	99,7	96,8	150	139,0	97,8	66,3
Bạch cầu đa nhân (51-88%)	1	61,7	58	61	69	64,3	64,7	68,3	69,3
	2	64,3	59,3	65,7	60	64	63	63	54
Lymphocyte (8-38%)	1	28,7	33	32,7	24,7	30,3	31,6	28	26,7
	2	26	32	28,3	34	31,7	29,3	34,3	41
Monocyte (1-9%)	1	9,7	9	6,3	6,3	5,3	3,7	3,7	4
	2	9,6	8,7	6	6	4,3	7,7	2,7	5

Điều này cho thấy, có sự tác động gây nhiễm của CCoV. Các biểu hiện lâm sàng cũng được theo dõi hàng ngày, tuy nhiên không phát hiện các dấu hiệu như ói, mửa, viêm ruột tiêu chảy. Sự bài thải virus trong phân cũng được kiểm tra, không phát hiện các trường hợp bài thải virus sau gây nhiễm từ ngày 0 đến ngày 14. Hiệu giá kháng thể được kiểm tra, kết quả cho thấy sự hình thành kháng thể bắt đầu từ ngày 14 và tăng cao lên mức 1:320 ở ngày thứ 28 (khi sử dụng chủng CCoV-

IIb phân lập được CCoV/dog/HCM47/2015 để thực hiện phản ứng trung hòa). Điều này cho thấy chủng CCoV-II phân lập được là chủng tiềm năng cho việc nghiên cứu sản xuất vaccin vì khi gây nhiễm ít hoặc không bài thải virus, không gây các triệu chứng lâm sàng nhưng gây được đáp ứng miễn dịch với hiệu giá kháng thể cao. Mặt khác, chủng virus phân lập được cũng có thể nghiên cứu chế tạo các sinh phẩm dùng trong chẩn đoán như kit chẩn đoán nhanh, kit ELISA ..v.v.

IV. KẾT LUẬN

Không phát hiện trường hợp nhiễm CCoV-I trên chó nuôi, tỷ lệ nhiễm CCoV-II trên chó nuôi là 10% và CCoV-IIb là type chính đang lưu hành tại Thành phố Hồ Chí Minh.

Phân lập thành công được một chủng CCoV-IIb (CCoV/HCM47/2015) trên chó nuôi và chủng này phát triển tốt trên tế bào f6wf-4 hơn các dòng tế bào khác.

Chủng phân lập có quan hệ họ hàng với chủng *Coronavirus* từ động vật hoang dã tại Trung Quốc.

Chủng CCoV/HCM47/2015 gây được miễn dịch trên chó nhưng không gây biểu hiện lâm sàng trầm trọng, có thể là chủng tiềm năng có thể dùng sản xuất vaccin trong nước hoặc các sinh phẩm dùng cho chẩn đoán.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. L. Binn, E.C. Lazar, K.P. Keenan, D.L. Huxsoll, R.H. Marchwicki, A.J. Strano. Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. *Proc. Annu. Meet U.S. Anim. Health Assoc.* Vol. 78 (1974), pp 359-366.
2. V. Benetka, A. Kübber-Heiss, J. Kolodziejek, N. Nowotny, P.M. Hofmann, K. Möstl. Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Vet. Microbiol.* Vol. 99 (2004), pp 31-42.
3. Y. Terada, N. Matsui, K. Noguchi, R. Kuwata, R. H. Shimoda, T. Soma, M. Mochizuki, K. Maeda. Emergence of pathogenic coronaviruses in cats by homologous recombination between feline and canine coronaviruses. *PLoS ONE* (2014), 9:e106534.
4. K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* (2013), Vol. 30(2013), pp. 2725-279.
5. T. Soma, T. Ohinata, H. Ishii, T. Takahashi, S. Taharaguchi, M. Hara. Detection and genotyping of canine coronavirus RNA in diarrheic dogs in Japan. *Res. Vet. Sci.*, Vol. 90 (2011), pp. 205-207.
6. X. Wang, C. Li, D. Guo, X. Wang, S. Wei, Y. Geng, E. Wang, Z. Wang, X. Zhao, M. Su, Q. Liu, S. Zhang, L. Feng, D. Sun. Co-circulation of canine coronavirus I and IIa/b with high prevalence and genetic diversity in Heilongjiang province, northeast China. *PLoS ONE* (2006) 11: e0146975.
7. N. Decaro, V. Mari, G. Elia, D.D. Addie, M. Camero, M.S. Lucente. Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* Vol. 16 (2010), pp. 41-47.
8. S.Y. Jeoung, S. Y. Ann, H.T. Kim, D. Kim. M gene analysis of canine coronavirus strains detected in Korea. *J. Vet. Sci.* Vol. 15(2014), pp. 495-502.
9. D. Vijaykrishna, G.J.D. Smith, J.X. Zhang, J.S. M. Peiris, H. Chen, Y. Guan. Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses. *J. Virol.* Vol. 81 (2007), pp. 4012-4020.

Ngày nhận 30-8-2019

Ngày phản biện 15-9-2019

Ngày đăng 1-12-2019