

NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH SINH HỌC VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA MỘT SỐ CHỦNG VIRUS GÂY BỆNH CA-RÊ Ở CHÓ TẠI VIỆT NAM NĂM 2020

*Trương Quang Lâm, Nguyễn Thị Lan, Đào Lê Anh,
Nguyễn Thị Yên, Lê Thị Luyên, Nguyễn Văn Thắng*
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu đã tiến hành xác định đặc tính sinh học, sinh học phân tử của 3 chủng virus Ca-rê được phân lập tại 3 tỉnh, thành phố (Hà Nội, Ninh Bình và Nghệ An) trong năm 2020. Kết quả nuôi cấy cho thấy 3 chủng virus nhân lên nhanh trên môi trường nuôi cấy tế bào Vero-DST với bệnh tích điển hình thể hợp bào (syncytium); hiệu giá virus dao động từ $5,56 \times 10^6$ - $6,67 \times 10^6$ TCID₅₀/ml. Virus bắt đầu nhân lên sau 6 giờ gây nhiễm và phá hủy tế bào với hiệu giá virus cao nhất sau 48 giờ gây nhiễm. Kết quả giải trình tự và phân tích gen H của 3 chủng virus VNUA.CDV.NA04, VNUA.CDV.NB05 và VNUA.CDV.HN11 cho thấy các chủng virus này thuộc genotype Asia 1, nằm cùng nhánh phát sinh của các chủng tham chiếu được phân lập tại Việt Nam (2013-2017), Trung Quốc. Kết quả nghiên cứu này sẽ phục vụ cho các nghiên cứu chọn và tạo chủng virus tiềm năng để sản xuất chế phẩm phòng và điều trị bệnh Ca-rê.

Từ khóa: Virus Ca-rê, đặc tính sinh học, sinh học phân tử, Việt Nam.

Research on biological, molecular biology characteristics of some Canine distemper virus strains in Viet Nam in 2020

*Truong Quang Lam, Nguyen Thi Lan, Dao Le Anh,
Nguyen Thi Yen, Le Thi Luyen, Nguyen Van Thang*

SUMMARY

Study on the biological and molecular biology characteristics of 3 Carré virus strains isolated in Ha Noi City, Ninh Binh and Nghe An provinces was carried out in 2020. The culture result showed that 3 CDV strains: VNUA.CDV.NA04, VNUA.CDV.NB05 and VNUA.CDV.HN11 multiplied rapidly on Vero-DST cells with typical lesions of syncytium with viral titers from 5.56×10^6 - 6.67×10^6 TCID₅₀/ml. Virus began multiplying after 6 hours of infection and destroying cells (CPE) with the highest titer after 48 hours of infection. The result of sequencing and analyzing the H gene of 3 CDV strains indicated that these virus strains belonged to genotype Asia 1, located in the same phylogenetic branch of CDV strains that isolated in Viet Nam (2013-2017) and in China. This studied results will serve for researches on selecting potential virus strains to produce the bio-products for prevention and treatment of canine distemper.

Keywords: Canine distemper virus, biological, molecular characteristics, Viet Nam.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh sởi chó (Canine Distemper) hay Ca-rê là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm và phổ biến nhất trên chó. Bệnh phân bố ở nhiều quốc gia trên thế giới và gây bệnh trên hầu hết các loại thú ăn thịt như chồn, cáo, hổ, sư tử,...(Appel *et al.*, 1994). Bệnh do virus thuộc giống Morillivirus,

họ Paramyxoviridae, là virus có vỏ bọc, đường kính 150nm đến 300nm (Appel MJ *et al.*, 1995). Là virus có cấu trúc nucleocapsid chứa một sợi RNA không phân đoạn gồm 15.690 nucleotide có khả năng lây lan rộng qua đường hô hấp hoặc dịch bài tiết (Frisk *et al.*, 1999; Sykes, 2013). Hệ thống genome của Canine Distemper Virus

(CDV) mã hóa cho 6 loại protein: nucleocapsid (N), phosphoprotein (P), matrix (M), fusion (F), hemagglutinin (H) và polymerase (L). Trong đó protein H đóng vai trò quan trọng trong quyết định tính kháng nguyên của virus. CDV chỉ có một serotype duy nhất, tuy nhiên dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen H, người ta đã chia ra thành 5 type virus lớn được phân lập từ những vùng địa lý khác nhau: type châu Âu, cổ điển (Classic type), châu Á-1, châu Á-2 và Mỹ (Lan và ctv., 2006). Đoạn gen H của CDV đóng vai trò quan trọng trong việc biến đổi di truyền giữa các chủng virus này (Hashimoto và ctv., 2001). Vì vậy thông tin về gen H của CDV nhằm giúp hiểu rõ hơn về tính đa dạng di truyền, dịch tễ học phân tử và cung cấp thêm thông tin về nguồn gốc của virus thực địa.

Bệnh lần đầu tiên được phát hiện tại Việt Nam vào năm 1920. Bệnh nguy hiểm nhất trên chó con 3 - 6 tháng tuổi; tỷ lệ chết 50 - 80%, có thể lên tới 100% nếu không được điều trị kịp

thời (Hồ Đình Chúc, 1993). Cho đến nay, bệnh Ca-rê xảy ra ở hầu hết các tỉnh và gây thiệt hại lớn cho người nuôi chó; mặc dù đã được tiêm phòng vaccin nhưng mức độ bảo hộ chưa cao. Xuất phát từ thực tiễn đó, nhóm nghiên cứu đã tiến hành nghiên cứu đặc tính sinh học, sinh học phân tử của chủng virus CDV phân lập từ chó nhiễm bệnh tại thực địa, từ đó phát hiện được những biến đổi về đặc điểm sinh học, đặc tính di truyền so với các chủng virus vaccin thương mại đang được sử dụng tiêm phòng cho chó, nhằm giải thích cho hiệu quả phòng bệnh bằng vaccin không cao tại thực tiễn. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu sẽ bổ sung thêm vào ngân hàng chủng giống virus để từ đó giúp cho việc sàng lọc và lựa chọn chủng virus tiềm năng để phục vụ nghiên cứu sản xuất các chế phẩm có khả năng phòng và điều trị bệnh Ca-rê.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Bảng 1. Thông tin 3 chủng virus CDV sử dụng trong nghiên cứu

STT	Chủng virus	Nguồn gốc	Năm thu thập
1	VNUA.CDV.NA04	Nghệ An	2020
2	VNUA.CDV.NB05	Ninh Bình	2020
3	VNUA.CDV.HN11	Hà Nội	2020

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. RT-PCR

Bao gồm các bước tách chiết RNA của virus và các bước thực hiện kỹ thuật RT-PCR. RNA được tách chiết từ mẫu ruột và phân của các chó mổ khám bằng kit Qiagen. Quy trình tách chiết RNA của virus theo hướng dẫn của nhà sản xuất. RNA sau khi tách chiết được bảo quản ở nhiệt độ -30°C.

Phản ứng RT-PCR được thực hiện theo hướng dẫn của bộ kit. Cặp mồi được sử dụng gồm: Upp1: 5'-ATGTTTATGATCACAGCGCGGT-3' và Upp2: 5'-ATTGGGTTGCACCACTTGTC-3' (Lan và cs., 2005), xác định một đoạn 409 bp từ nucleotide 2.132 đến 2.541. Tiến hành khuếch

đại sản phẩm trong máy PCR với chu kỳ nhiệt: 1 chu kỳ: 50°C/30 phút, 95°C/2 phút; 35 chu kỳ: 95°C/30 giây, 50°C/1 phút, 72°C/2 phút; 1 chu kỳ: 72°C/10 phút, kết thúc ở 4°C. Điện di kiểm tra kết quả RT-PCR ở hiệu điện thế 100V trong 30 phút. Quan sát và chụp ảnh kết quả điện di sản phẩm RT-PCR trên máy chụp ảnh gel.

2.2.2. Phân lập virus

Môi trường DMEM có 5% FBS được làm ấm trong tủ 37°C trong 30 phút trước khi lấy tế bào ra nuôi cấy. Tế bào Vero-DST được bảo quản trong nitơ lỏng được giải đông nhanh chóng. Tế bào sau khi giải đông được chuyển vào ống ly tâm có chứa 5ml môi trường DMEM. Ly tâm 1.500 vòng/5 phút để loại bỏ hoàn toàn

dung dịch bảo quản và giữ lại cận tế bào. Hòa tan cận tế bào trong 1ml môi trường đã chuẩn bị ở trên. Chuyển tế bào ra khay nuôi cấy 12 giếng chứa 1ml môi trường DMEM, 5% FBS. Nuôi cấy trong điều kiện 37°C, 5% CO₂ hàng ngày theo dõi sự phát triển của tế bào.

Khi tế bào Vero-DST mọc được một lớp trên bề mặt nuôi cấy được gây nhiễm virus với mẫu bệnh phẩm được nghiền nhỏ, pha loãng trong môi trường DMEM và lọc qua màng lọc 0,22µm. Mẫu bệnh phẩm đã được xử lý ở trên được cho vào khay chứa tế bào Vero-DST, ủ ở 37°C trong 1 giờ, sau đó loại bỏ dịch gây nhiễm và rửa tế bào bằng dung dịch PBS 1X có bổ sung antibiotic – abimycotic. Cuối cùng, bổ sung môi trường nuôi cấy DMEM chứa 5% FBS, 1% antibiotic – abimycotic và 0,1% G418 Disulfate. Hàng ngày đánh giá bệnh tích tế bào trên kính hiển vi soi ngược. Khi bệnh tích tế bào chiếm khoảng 80 – 90% diện tích đáy nuôi cấy, virus được thu từ môi trường nuôi cấy.

2.2.3. Xác định hiệu giá virus

Các chủng virus phân lập được pha loãng theo cơ số 10. Mỗi độ pha loãng virus sau đó gây nhiễm trên 8 giếng tế bào của đĩa 96 giếng. Theo dõi bệnh tích tế bào hàng ngày với kính hiển vi soi ngược. TCID₅₀ được tính theo phương pháp Spearman và Karber (Kärber G., 1931; Spearman C., 1908).

2.2.4. Xác định đường cong sinh trưởng

Tế bào được chuẩn bị vào bình T25 (5x10⁶ tế bào/bình) với liều gây nhiễm MOI = 0,01. Sau 1 giờ ủ trong điều kiện 37°C, 5% CO₂, dịch gây nhiễm virus được loại bỏ bằng dung dịch PBS 1X, bổ sung môi trường nuôi cấy DMEM chứa 5% FBS, 1% antibiotic – abimycotic và 0,1% G418 Disulfate. Virus được thu tại các thời điểm khác nhau sau khi gây nhiễm theo thứ tự: 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 và 96 giờ. Đường cong sinh trưởng của virus được xác định dựa vào giá trị hiệu giá log₁₀ TCID₅₀/ml tại mỗi thời điểm thu virus.

2.2.5. Giải trình tự gen

Bảng 2. Thông tin cặp mồi giải trình tự

Tên mồi	Trình tự (5' – 3')	Vị trí	Kích thước
CDVff1	TCGAAATCCTATGTGAGATCACT	6897–6919	2.100 bp
CDVHS2	ATGCTGGAGATGGTTTAATTCAATCG	8994–8969	

Kết quả thu được được xử lý bằng phần mềm Genetyx để xử lý và thu nhận chuỗi gen cần nghiên cứu với bộ mã di truyền. Phân tích xác nhận chuỗi gen thu nhận được thông qua chương trình Blast trên Ngân hàng Gen (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Truy cập ngân hàng gen thu nhận và xác định sự tương đồng về nucleotide của các chuỗi gen tương ứng với các phân đoạn gen thu được trong nghiên cứu. Thành phần amino acid của virus được thu nhận bằng cách sử dụng bộ mã của vi sinh vật bậc thấp (Bộ mã vi khuẩn – Bacterial code) có trong Ngân hàng Gen và so sánh thông qua chương trình Genetyx.

2.2.6. Xử lý số liệu

Các số liệu được tính toán và xử lý bằng phần mềm Excel.

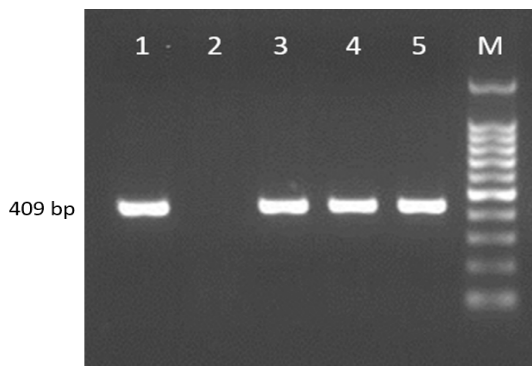
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập CDV trên môi trường tế bào Vero-DST

Bằng kỹ thuật RT-PCR, đã khẳng định chắc chắn sự có mặt của virus gây bệnh Ca-rê trên chó. Sau đó, các chủng virus được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm khác nhau của chó mắc bệnh trên môi trường tế bào một lớp Vero-DST.

Kết quả bảng 3 cho thấy, sau 12 giờ gây nhiễm hai chủng VNUA.CDV.NA04, VNUA.CDV.NB05 đã xuất hiện bệnh tích tế bào (CPE)

với biểu hiện tế bào hòa màng, nhân co cụm hình thành các thể hợp bào (thể syncytium).



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR

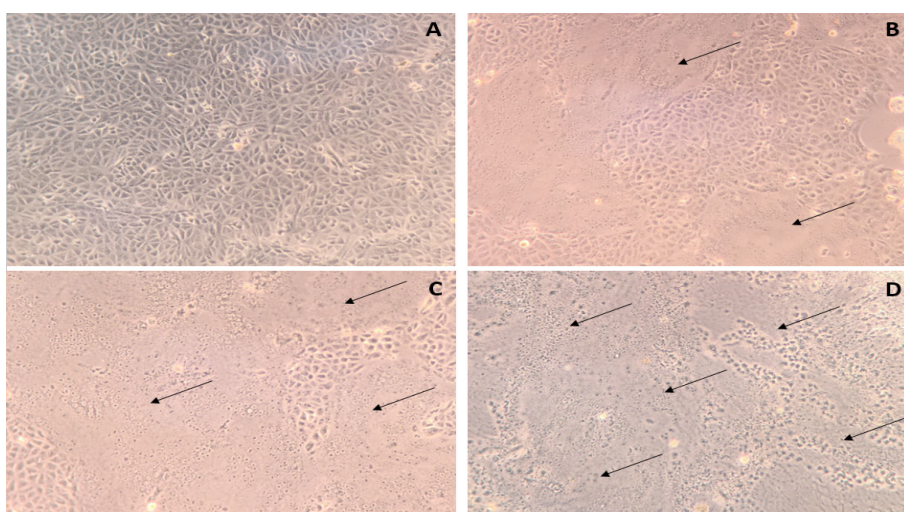
Chú thích: M: Marker; 1. đối chứng dương; 2. đối chứng âm; 3, 4, 5: các mẫu phân lập CDV

Tại thời điểm 24 giờ sau gây nhiễm virus, 3 chủng virus phân lập đều xuất hiện bệnh tích tế bào đặc trưng. Thời điểm 36-48 giờ sau gây nhiễm, hai chủng VNUA.CDV.NA04, VNUA.CDV.NB05 phá hủy đạt gần 80-85% số lượng tế bào trên môi trường nuôi cấy trong khi chủng còn lại chỉ phá hủy 65%. Ở thời điểm 72-96 giờ trên môi trường nuôi cấy không quan sát được bệnh tích tế bào do virus gây ra bởi vì toàn bộ các tế bào đã bị phá hủy và bong tróc khỏi bề mặt chai nuôi cấy. Hình ảnh bệnh tích tế bào sau khi gây nhiễm virus trong nghiên cứu này tương tự như bệnh tích tế bào sau khi gây nhiễm virus đã được mô tả trong các nghiên cứu trước đây (Fumio Seki *et al.*, 2003; Nguyen Thi Lan *et al.*, 2005). Kết quả này phù

Bảng 3. Kết quả phân lập và khả năng gây bệnh tích tế bào

Chó	Bệnh phẩm	Chủng virus	Thời gian quan sát sau khi gây nhiễm (giờ)							
			6	12	24	36	48	60	72	96
C1	Ruột	VNUA.CDV.HN11	-	-	15**	25	65	80	100	B
C2	Phổi	VNUA.CDV.NB05	-	*	35	50	85	90	100	B
C3	Ruột	VNUA.CDV.NA04	-	*	30	45	80	95	100	B

Ghi chú: (-): chưa có bệnh tích tế bào (CPE - Cytopathologic Effects); (*): CPE dưới 5%; (**): biểu hiện % số lượng tế bào bị phá hủy so với tổng diện tích bề mặt nuôi cấy; (B): Tế bào bong tróc hoàn toàn khỏi bề mặt nuôi cấy



Hình 2. Chủng virus VNUA.CDV.NA04 trên dòng tế bào Vero-DST

A: Đối chứng tế bào thời điểm bắt đầu thí nghiệm (0 giờ), B: CPE sau 12 giờ gây nhiễm, C: CPE sau 48 giờ gây nhiễm, D: CPE sau 60 giờ gây nhiễm

hợp với kết quả nghiên cứu trước đây trên hai chủng virus MD77 và Onderstepoort (Nguyen Thi Lan *et al.*, 2005) về thời điểm xuất hiện và diễn biến bệnh tích sau khi gây nhiễm trên môi trường tế bào Vero-DST. Ở thời điểm 72-96 giờ sau gây nhiễm thì năm chủng virus nghiên cứu và hai chủng virus MD77 và Onderstepoort (Nguyen Thi Lan *et al.*, 2005) đều không quan sát thấy bệnh tích tế bào trên môi trường nuôi cấy.

3.2. Hiệu giá virus

Để xác định hiệu giá của CDV, nghiên cứu tiến hành cấy truyền đời virus đến đời thứ 5 để virus ổn định, thích nghi với môi trường tế bào. Sau đó xác định hiệu giá virus của các chủng CDV phân lập ở đời thứ 5, kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả hiệu giá virus ở đời thứ 5

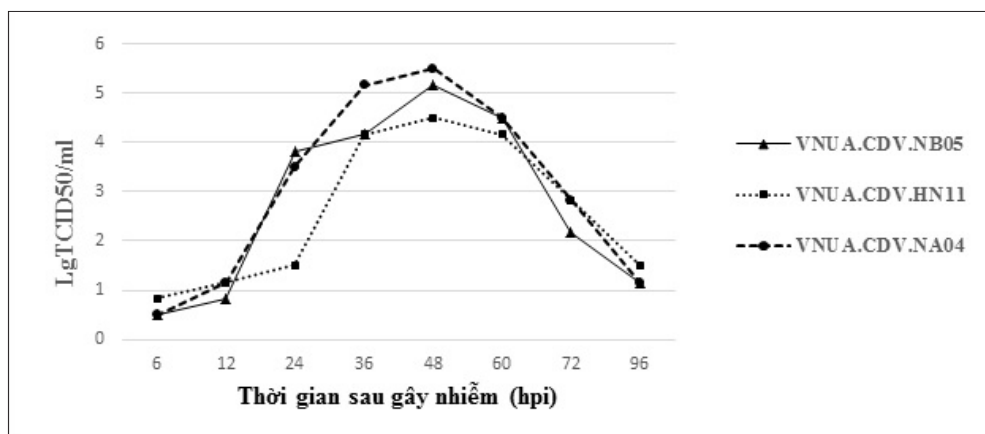
STT	Chủng Virus	TCID ₅₀ /ml
1	VNUA.CDV.HN11	6,26 x 10 ⁶
2	VNUA.CDV.NB05	6,67 x 10 ⁶
3	VNUA.CDV.NA04	5,56 x 10 ⁶

Kết quả nghiên cứu cho thấy tại đời thứ 5, tất cả các chủng CDV phân lập được đều có khả năng phát triển, nhân lên trên môi trường tế bào Vero-DST, hiệu giá của virus thu được dao động từ 5,56 x 10⁶ – 6,67 x 10⁶TCID₅₀/ml.

3.3. Xác định đường cong sinh trưởng của chủng virus phân lập

Các chủng virus được gây nhiễm lên tế bào Vero-DST với liều MOI=0,01. Dịch virus được thu theo các khoảng thời gian khác nhau để xác định hiệu giá virus nhân lên. Kết quả chuẩn độ CDV ở các chủng virus tại các thời điểm khác nhau cho thấy hiệu giá virus tăng dần theo thời gian và đạt giá trị cao nhất sau 48 giờ gây nhiễm. Biểu đồ biểu diễn sự nhân lên của virus cho thấy sau 6 giờ gây nhiễm hàm lượng virus (LogTCID₅₀/ml) của cả ba chủng bắt đầu tăng và đạt giá trị cao nhất ở các chủng VNUA.CDV.HN11, VNUA.CDV.NB05, VNUA.CDV.NA04 lần lượt là 10^{4,5}TCID₅₀/ml, 10^{5,16}TCID₅₀/ml và 10^{5,5}TCID₅₀/ml. Hiệu giá virus ở các thời điểm gây nhiễm tiếp theo cho thấy hiệu giá virus có xu hướng giảm. Đường cong sinh trưởng cho thấy với liều gây nhiễm MOI=0,01; hiệu giá virus đạt giá trị cao nhất sau 48 giờ gây nhiễm.

Kết quả nghiên cứu tương tự kết quả của Nguyen Thi Lan *et al.* (2005) khi xác định quy luật nhân lên của hai chủng virus MD77 và Onderstepoort.



Hình 3. Đường cong sinh trưởng của chủng virus CDV phân lập

Bảng 5. Kết quả so sánh các sự khác biệt chính về amino acid của các chủng CDV phân lập tại Việt Nam và chủng tham chiếu

STT	Vị trí amino acid	Các chủng CDV phân lập, tham chiếu và chủng vaccin															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	47	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	V	V	V	V
2	50	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	M	L	L	M
3	51	A	T	T	A	A	A	A	A	T	T	T	A	A	A	A	A
4	58	V	V	I	V	V	I	V	I	I	V	V	V	V	V	V	V
5	150	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	L	F	F	L
6	157	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	I	I	I	I
7	159	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	L	I	I	L
8	160	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	R	R	R	R
9	171	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	L	L	L	L
10	177	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	R	G	G	R
11	178	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G
12	198	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	F	V	V	F
13	241	G	G	G	G	R	G	G	G	G	G	G	G	G	R	R	G
14	245	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	T	T	T	T
15	247	E	K	K	E	K	K	K	K	K	K	K	K	K	E	E	K
16	262	D	N	N	D	D	D	D	D	N	N	N	D	D	D	D	D
17	277	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	N	N	N	N
18	313	D	N	N	D	D	D	D	D	N	N	N	D	D	D	D	D
19	337	T	I	I	T	T	T	T	T	I	I	I	I	V	V	V	V
20	344	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	K	K	K	K
21	345	I	V	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
22	358	I	V	V	I	I	I	I	I	V	V	V	I	I	I	I	I
23	359	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	A	A	A	A
24	365	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	A	A	A	A
25	367	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	A	A	V
26	376	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	G	G	N
27	383	H	Q	Q	H	H	H	H	H	Q	Q	Q	H	Q	Q	Q	Q
28	386	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	T	T	S
29	401	G	R	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	R	R	G
30	417	I	V	V	I	I	I	I	I	V	V	V	I	I	V	V	I
31	446	D	E	E	D	D	D	D	D	E	E	E	D	D	N	N	D
32	475	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	I	L	L	I
33	497	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	F	S	S	F
34	517	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	K	S	S	N
35	530	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	D	S	S	D
36	544	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	K	T	T	K
37	547	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	F	Y	Y	F
38	549	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	H	H	Y	Y	H	H	Y
39	584	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	D	D	D	D
40	587	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	D	N	N	N
41	588	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	F

Ghi chú: 1. VNUA.CDV.NB05, 2. VNUA.CDV.NA04, 3. VNUA.CDV.HN11, 4. LC159587.1 CDV/dog/HCM/33/140816 VN 2017, 5. LC159586.1 CDV/dog/HCM/38/140827 2014, 6. LC159585.1 CDV/dog/HCM/29/140127 2014, 7. LC159584.1 CDV/dog/HCM/24/140112 VN 2014, 8. LC159583.1 CDV/dog/HCM/01/131018 2013, 9. MF926611.1 isolate BJ17F21 Dog China 2017 Asia I, 10. MH337872.1 isolate SD16F Dog China 2016 Asia I, 11. KJ685550.1 isolate SD(14)2 Dog China 2014 Asia I, 12. KJ437595.1 isolate NJ(12)3 Dog China 2012 Asia I, 13. FJ461702.1 Vaccine Vanguard Plus - Pfizer, 14. FJ461710.1 Vaccine Virbac, 15. FJ461709.1 Vaccine Intervet, 16. EF095750.1 Vaccine strain Hungary.

Trình tự amino acid mã hóa từ đoạn gen H của 3 chủng CDV trong nghiên cứu có cùng kết quả là 607 amino acid. Kết quả so sánh cho thấy giữa trình tự amino acid của 3 chủng CDV nghiên cứu và 13 chủng tham chiếu có sự đột biến thay thế, thấy có 41 vị trí sai khác.

Phân tích trình tự amino acid (607 aa) protein H của 3 chủng phân lập VNUA.CDV.NB05, VNUA.CDV.NA04/, VNUA.CDV.HN11 đều cho thấy sự hiện diện của 8 thay thế khác biệt ở các vị trí 47I (Ile), 160K (Lys), 171L (Leu), 178A (Ala), 245S (Ser), 277T (Thr), 337I/T (Ile / Thr), 359V (Val) được xác định là kiểu gen Asia-1 tương tự như các chủng Asia-1 tham chiếu (bảng 5). Chúng tôi đã tìm thấy một sự thay đổi trong đa dạng di truyền của gen H với các kiểu thay thế ở các vị trí amino acid 6 (D), 22 (R), 49 (V), 51 (T), 58 (I), 68 (V), 191 (S), 235 (M), 247 (E), 296 (G), 313 (N), 345 (V), 358 (V), 384 (G), 401 (R), 417 (V), 442 (G), 446 (E), 598 (M) trong số các chủng CDV mới phân lập so với các chủng CDV đã công bố trước đó (2013-2017) ở Việt Nam. Đáng chú ý, VNUA.CDV.NA04 là một biến thể di truyền mới với kiểu thay thế duy nhất ở các vị trí amino acid 345V (Val), 358V (Val), 401R (Arg) khác với các chủng CDV được báo cáo trước đây ở Việt Nam hoặc các chủng Asia-1 tham chiếu. Ngoài ra, trình tự amino acid của các chủng CDV phân lập tại Việt Nam trong dòng Asia-1 có tổng số 41 vị trí amino acid sai khác so với trình tự nguyên mẫu từ các chủng vaccin tham chiếu (bảng 5).

Nghiên cứu đánh giá trình tự amino acid (aa 157-169 và 364 - 392) bao gồm các vị trí kháng nguyên trung hòa chính của H protein của CDV (Qiao và cs., 2011; Ke và cs., 2015; Eman và cs., 2018) cho thấy trình tự amino acid đại diện từ các chủng CDV phân lập tại Việt Nam và chủng tham chiếu Asia-1 phân lập tại Trung Quốc có sự khác biệt rõ rệt với 8 sự thay thế amino acid so với các chủng vaccin thương mại (FJ461702.1 Vaccine Vanguard Plus - Pfizer; FJ461710.1 Vaccine Virbac; FJ461709.1 Vaccine Intervet; EF095750.1 Vaccine strain Hungary) trong vùng epitope aa 157-169 và aa 364 – 392 thuộc H protein (bảng 2). Tất cả các chủng CDV Việt Nam đều có Val (V), Val (V), Lys (K), Val (V), Val (V), Asn (N), His (H) / Tyr (Y), Ser (S) khác

biệt lần lượt so với với các chủng vaccin thương mại là Ile (I), Leu (L) / Ile (I), Arg (R), Ala (A), Ala (A) / Val (V), Gly (G) / Asn (N), Gln (Q) và Thr (T) / Ser (S) lần lượt ở các vị trí amino acid 157, 159, 160, 365, 367, 376, 383 và 386 (bảng 5). Sự khác biệt và sự biến đổi của các epitope aa 157-169 và aa 364 - 396 có thể liên quan đến việc chó vẫn bị nhiễm bệnh và không thể bảo vệ được sau khi tiêm vaccin CDV thương mại tại Việt Nam và nhiều ghi nhận tại Nhật, Trung Quốc, Mỹ (Iwatsuki và cs., 2000; Qiao và cs., 2011; Eman và cs., 2018). Chó được tiêm vaccin đều có hiệu giá kháng thể cao, tuy nhiên hiệu giá kháng thể trung hoà chéo lại rất thấp đối với chủng CDV độc lực gây bệnh ngoài tự nhiên (Iwatsuki và cs., 2000; Qiao và cs., 2011; Eman và cs., 2018). Qua đó cho thấy sự cần thiết phải tiếp tục nghiên cứu và phát triển, cập nhật loại vaccin phòng bệnh Ca-rê phù hợp do sự khác biệt lớn về đặc tính di truyền và kháng nguyên giữa chủng virus CDV đang lưu hành và các chủng vaccin hiện đang được sử dụng ở Việt Nam và trên thế giới.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập và xác định được đặc tính sinh học, sinh học phân tử của 3 chủng virus VNUA.CDV.NA04, VNUA.CDV.NB05 và VNUA.CDV.HN11 tại Việt Nam trong năm 2020. Các chủng virus nhân lên nhanh chóng trên môi trường nuôi cấy tế bào Vero-DST với bệnh tích điển hình thể hợp bào (Syncytium) với hiệu giá virus dao động từ $5,56 \times 10^6$ - $6,67 \times 10^6$ TCID₅₀/ml. Virus bắt đầu nhân lên sau 6 giờ gây nhiễm và phá hủy tế bào với hiệu giá virus cao nhất sau 48 giờ gây nhiễm. Nghiên cứu đã giải trình tự nucleotide và phân tích di truyền của đoạn gen H của 3 chủng Canine distemper virus VNUA.CDV.NA04, VNUA.CDV.NB05 và VNUA.CDV.HN11 thuộc genotype Asia 1, nằm cùng trong nhánh phát sinh của các chủng tham chiếu được phân lập tại Việt Nam (2013-2017) và Trung Quốc.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu 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 Ca-rê do Canine distemper virus gây ra trên chó”, mã số đề tài: ĐTKHCN.WB.08/2020.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anis E., Newell T. K., Dyer N., Wilkes R. P., 2018. Phylogenetic analysis of the wild-type strains of Canine distemper virus circulating in the United States. *Virology Journal* 15:118 (2018)
- Appel, M. J., Yates, R. A., Foley, G. L., Bernstein, J. J., Santinelli, S., Spelman, L. H., . . . Barr, M., 1994. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6(3), 277-288.
- Hồ Đình Chúc, 1993. *Bệnh Ca-rê trên đàn chó ở Việt Nam và kinh nghiệm điều trị*. Công trình nghiên cứu, Hội Thú y Việt Nam.
- Nguyễn Văn Dũng, Vũ Kim Chiến, Phan Xuân Thảo, 2018. Phân lập và xác định đặc tính di truyền của virus gây bệnh Ca-rê trên chó nuôi tại thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*. Tập XXV, Số 4/2018 trang 19-26.
- Fumio Seki, Nobuyuki Ono, Ryoji Yamaguchi, Yusuke Yanagi, 2003. Efficient isolation of wild strains of Canine distemper virus in vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *J Virol*. 2003 Sep;77(18):9943-50.
- Frisk, A., König, M., Moritz, A., & Baumgärtner, W., 1999. Detection of Canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *Journal of clinical microbiology*, 37(11), 3634-3643.
- Iwatsuki K., Miyashita N., Yoshida E., Gemma T., Shin Y. S., Mori T., Hirayama N., Kai C., Mikami T., 2000. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of Canine distemper virus from naturally infected dogs. *J. Gen. Virol.* 78, 373–380.
- Jianjun Zhao, Ning Shi, Yangang Sun, Vito Martella, Veljko Nikolin, Chunsheng Zhu, Hailing Zhang, Bo Hu, Xue Bai, Xijun Yan, 2015. Pathogenesis of Canine distemper virus in experimentally infected raccoon dogs, foxes, and minks. *Antiviral Research* 122 (2015) 1–11
- Kärber G., 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv f experiment Pathol u Pharmakol*, 162: 480-483.
- Ke G. M., Ho C. H., Chiang M. J., Sanno-Duanda B., Chung C. S., Lin M. Y., Shi Y. Y., Yang M. H., Tyan Y. C., Liao P. C., Chu P. Y., 2015. Phylodynamic analysis of the Canine distemper virus hemagglutinin gene. *BMC Veterinary Research* 11:164
- Lan, N., Yamaguchi, R., Furuya, Y., Inomata, A., Ngamkala, S., Naganobu, K., Uchida, K., 2005. Pathogenesis and phylogenetic analyses of Canine distemper virus strain 007Lm, a new isolate in dogs. *Veterinary microbiology*, 110(3-4), 197-207.
- Lan, N., Yamaguchi, R., Uchida, K., Sugano, S., & Tateyama, S., 2005. Growth profiles of recent canine distemper isolates on Vero cells expressing canine signalling lymphocyte activation molecule (SLAM). *Journal of comparative pathology*, 133(1), 77-81.
- Lan, N. T., Sihoungvanh, B., Yển, N. T., Nam, N. H., 2015. Một số đặc điểm bệnh lý của chó được gây bệnh thực nghiệm bằng chủng virus Ca-rê (CDV-768). *J. Sci*, 13(1), 56-64.
- Miry, C., Ducatelle, R., Thoonen, H., & Hoorens, J., 1983. Immunoperoxidase study of Canine distemper virus pneumonia. *Research in veterinary science*, 34(2), 145-148.
- Mochizuki, M., Hashimoto, M., Hagiwara, S., Yoshida, Y., & Ishiguro, S., 1999. Genotypes of Canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *Journal of clinical microbiology*, 37(9), 2936-2942.
- Spearman C., 1908. The Method of “Right and Wrong Cases” (Constant Stimuli) without Gauss’s Formula. *Br J Psychol*; 2: 227-242.
- Sykes, J. E., 2013. Canine distemper virus infection. *Canine and feline infectious diseases*. Elsevier, St. Louis, Missouri, 152-165.
- Wada, Y., Kondo, H., Nakaoka, Y., & Kubo, M., 1996. Gastric attaching and effacing Escherichia coli lesions in a puppy with naturally occurring enteric colibacillosis and concurrent Canine distemper virus infection. *Veterinary pathology*, 33(6), 717-720.
- Zhao, J., Shi, N., Sun, Y., Martella, V., Nikolin, V., Zhu, C., Yan, X., 2015. Pathogenesis of Canine distemper virus in experimentally infected raccoon dogs, foxes, and minks. *Antiviral research*, 122, 1-11.
- Qiao J., Meng Q., Chen C., Xia X., Cai X., Ren Y., Zhang H., 2011. Characterization of a new dog isolate of Canine distemper virus from China. *Acta virologica* 55: 303 – 310, 2011

Ngày nhận 1-12-2021

Ngày phản biện 6-2-2022

Ngày đăng 1-6-2022