

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG THÍCH ỨNG CỦA MỘT SỐ CHỦNG VIRUT CƯỜNG ĐỘC ĐẬU DÊ THỰC ĐỊA TRÊN TẾ BÀO TINH HOÀN DÊ SƠ CẤP

Đỗ Văn Khiên¹, Phạm Hùng¹ và Lê Thanh Hòa²

TÓM TẮT

Từ các mẫu bệnh phẩm thu thập có kết quả PCR dương tính với virus đậu dê, 7 mẫu bệnh phẩm đã được lựa chọn đại diện cho các địa phương nghiên cứu để phân lập virus trên tế bào tinh hoàn dê sơ cấp (GT cell). Kết quả cho thấy cả 7 mẫu bệnh phẩm đều phân lập được virus đậu dê trên tế bào GT, gây bệnh lý tế bào (CPE) từ ngày thứ 8 - 9 sau khi gây nhiễm. Các mẫu dịch tế bào sau khi thu hoạch cũng được kiểm tra lại bằng phản ứng PCR với cặp mồi P1, P2 đều cho kết quả dương tính với virus đậu dê. Sản phẩm PCR sau khi điện di là đoạn gen có độ dài 192bp. Kết quả chuẩn độ virus từ đời 5 đến đời 7 trên đĩa tế bào GT 96 giếng, chỉ số TCID₅₀ dao động từ 10^{5.0} đến 10^{5.2}.

Từ khóa: Virus đậu dê, Sản phẩm PCR, Bệnh lý tế bào.

Isolation and evaluation of the adaptability of some goat pox virus strains isolated from field on primary goat testicular cells

Do Van Kien, Pham Hung and Le Thanh Hoa

SUMMARY

From the PCR test positive goat pox virus (GPV) samples, 7 samples represented of investigated locals were choosen for virus isolation on primary cultures of goat testicular cells. The results indicated that all 7 virus cultured had cytopathic effects (CPE) on 8 - 9 days post inoculation. After harvested, the virus cultured fluid samples were checked for GPV using primers P1, P2. The results showed that all of them were GPV positive with the PCR products were the sections gen of 192bp. We also carried out the virus title from passage 5th to passage 7th and had TCID₅₀ index of 10^{5.0} - 10^{5.2}.

Key words: Goat pox virus, PCR product, Cytopathic effects.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh đậu dê, cừu có tên tiếng Anh là Sheep and goat pox (SGPX), là bệnh truyền nhiễm cấp tính cho dê, cừu. Đặc trưng bởi sự lây lan nhanh và tỷ lệ chết tới 50%, có trường hợp tỷ lệ chết trong đàn gia súc non lên đến 100%. Bệnh được Tổ chức dịch tễ thế giới (OIE) xếp vào bảng A danh mục các bệnh cực kỳ nguy hiểm. Căn bệnh

do một loại DNA virus thuộc giống *Capripoxvirus*, họ phụ *Chordopoxvirinae*, họ *Poxviridae* gây ra. Bệnh xảy ra ở nhiều nơi trên thế giới như Bắc Phi, Trung Đông, Ấn Độ, Nga, Mông Cổ và Việt Nam, gây nhiều thiệt hại về kinh tế cho ngành chăn nuôi dê, cừu.

Ở Việt Nam bệnh xuất hiện đầu tiên vào 2005 tại một số tỉnh phía Bắc như Cao Bằng, Lạng Sơn, Bắc Giang, Hà Tây (cũ). Sau đó bệnh nhanh chóng lan ra các tỉnh có chăn nuôi dê, cừu thuộc miền Trung và miền Nam, gây ảnh hưởng

¹ Phân viện thú y miền Trung;

² Viện công nghệ sinh học

nghiêm trọng đến chăn nuôi dê, cừu ở nước ta. Để có những dữ liệu nghiên cứu sâu về bệnh đậu dê ở Việt Nam, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành phân lập và đánh giá khả năng thích ứng của một số chủng virus cường độc đậu dê phân lập từ thực địa trên tế bào tinh hoàn dê sơ cấp, để làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về virus đậu dê ở Việt Nam.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

- *Mẫu bệnh phẩm đậu dê* là tổ chức da dê có chứa mụn đậu

- *Động vật thí nghiệm* là dê đực 2 - 3 tháng tuổi khỏe mạnh, không có kháng thể chống virus đậu dê

- *Tế bào, môi trường nuôi cấy:*

Tế bào tinh hoàn dê sơ cấp do Bộ môn virus - Phân viện thú y miền Trung cung cấp.

Môi trường nuôi cấy tế bào EMEM bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê.

- *Kit chiết tách DNA và primer:*

Sử dụng bộ kit QIAamp DNA minikit của hãng QIAGEN dùng để chiết tách mẫu ADN tổng số từ mẫu bệnh phẩm và dịch tế bào nuôi cấy virus đậu dê.

Cặp mồi giám định virus đậu dê trong phản ứng PCR gồm:

Mồi xuôi P1F: 5'- TTT CCT GAT TTT TCT TAC TAT -3'

Mồi ngược P2R: 5'- AAA TTA TAT AGC TAA ATA AC -3'

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập và giám định virus

- *Phương pháp xử lý mẫu bệnh phẩm:* mẫu tổ chức da dê có mụn đậu (1g) được nghiền với môi trường EMEM theo tỷ lệ 1/10 có bổ sung kháng sinh và chất chống nấm. Bệnh phẩm sau khi được

xử lý làm đông tan 3 lần, ly tâm tốc độ 10.000 vòng/phút (v/p) trong thời gian 10 phút, thu dịch nước trong gây nhiễm cho tế bào. Theo dõi bệnh lý tế bào (CPE) sau khi gây nhiễm đến 14 ngày.

- *Phương pháp tách tế bào tinh hoàn sơ cấp:* Tinh hoàn dê được lấy từ dê 2 - 3 tháng tuổi khỏe mạnh, chưa được miễn dịch với vaccine đậu dê. Tinh hoàn dê được xử lý, cắt nhỏ, tách tế bào tinh hoàn bằng quy trình trypsin ẩm. Tế bào tách được ly tâm thu cạn hòa với môi trường nuôi EMEM có 10% huyết thanh bào thai bê cho vào chai nuôi. Các chai tế bào nuôi được đặt trong tủ ẩm 37 °C với 5% CO₂, khi tế bào trong chai nuôi đạt độ phủ 90% diện tích chai là lúc thích hợp để gây nhiễm virus.

- *Phương pháp giám định virus đậu dê:* theo phương pháp của Ireland và Binopal (1998) sử dụng cặp mồi P1 và P2. Chạy PCR theo chu trình nhiệt 95°C, 5 phút; tiếp theo 35 chu kỳ 94°C 1 phút, 55°C 1 phút, 72°C 1 phút; 72°C 10 phút; Bảo quản sản phẩm ở 4°C cho đến khi điện di kiểm tra sản phẩm và bảo quản lâu dài ở -20°C.

- *Phương pháp chuẩn độ virus đậu dê:* xác định chỉ số TCID₅₀ trên đĩa tế bào GT 96 giếng.

Kết quả được tính toán theo phương pháp của Reed - Muench.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

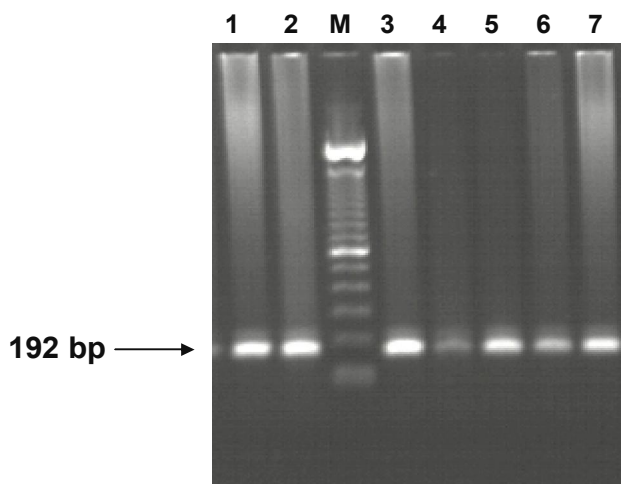
3.1. Kết quả phân lập virus đậu dê

3.1.1. Kết quả xác định sự có mặt của virus đậu dê trong các mẫu bệnh phẩm thu thập

Chúng tôi tiến hành thu thập 410 mẫu bệnh phẩm dê, cừu nghi mắc bệnh đậu có triệu chứng lâm sàng và bệnh tích giống với bệnh đậu dê. Các mẫu bệnh phẩm này được thu thập tại các trang trại chăn nuôi hoặc hộ chăn nuôi gia đình thuộc 3 tỉnh Khánh Hòa, Ninh Thuận, Phú Yên. Tất cả các mẫu bệnh phẩm đều được tách chiết DNA tổng số bằng bộ kit tách chiết DNA của hãng QIAGEN. Tiếp theo,

để khẳng định một cách chắc chắn rằng trong các mẫu bệnh phẩm nghiên cứu có virus đậu dê, chúng tôi tiến hành xác định sự có mặt đoạn gen 192bp của hệ gen virus đậu dê bằng phản ứng PCR, sử dụng cặp mồi P1, P2 theo thiết kế của Ireland và Binopal (1998).

Kết quả phản ứng PCR được điện di kiểm tra trên thạch agarose 1%, trong tổng số 410 mẫu kiểm tra đã phát hiện được 69 mẫu dương tính với virus đậu dê cho sản phẩm PCR đoạn gen có độ dài 192bp, chiếm tỷ lệ 16,83%.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR đoạn gen có độ dài 192bp

Giếng M: thang DNA chuẩn;

Giếng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: sản phẩm PCR của các mẫu NT1, NT3, NT4, NT6, KH9, KH10 và PY7

3.1.2. Kết quả phân lập virus đậu dê trên tế bào tinh hoàn dê sơ cấp (GT)

Trên cơ sở kết quả của phản ứng PCR đối với các mẫu bệnh phẩm có kết quả dương tính với virus đậu dê, chúng tôi chọn 7 trong số 69 mẫu bệnh phẩm đại diện cho các địa phương nghiên cứu để phân lập virus trên tế bào GT. Các chai tế bào mà chúng tôi sử dụng ở thí nghiệm này có diện tích bề mặt đáy là 25cm² đã được phủ tế bào GT từ 80 - 90%. Từ các mẫu bệnh phẩm lựa chọn, chúng tôi tiến hành nghiền 1g mẫu tổ chức da dê có mụn đậu với môi trường EMEM theo tỷ lệ 1/10 có bổ sung kháng sinh, ly tâm thu dịch nước nổi. Đồng tan, pha loãng rồi gây nhiễm cho các chai tế bào GT theo 2 nồng độ 1/10 và 1/20 với liều 0,5 ml/chai. Các chai tế bào GT sau khi

gây nhiễm được đặt vào tủ ẩm 37⁰C với 5% CO₂. Hàng ngày quan sát bệnh lý tế bào bằng kính hiển vi soi ngược đến 14 ngày. Kết quả thể hiện ở bảng 1.

Kết quả quan sát cho thấy, cả 7 chủng virus sau khi gây nhiễm bằng huyền dịch virus đã xử lý, đến thời điểm ngày thứ 8 - 9 sau khi gây nhiễm, bệnh lý tế bào (CPE) mới xuất hiện. Ở thời điểm 14 ngày sau khi gây nhiễm, chúng tôi tiến hành thu hoạch toàn bộ các chai tế bào có CPE đạt từ 2+ đến 4+, bảo quản ở -80⁰C. Các mẫu dịch nuôi tế bào của 7 chủng virus phân lập được trên tế bào GT có CPE đều được chúng tôi chiết tách DNA và kiểm tra bằng phản ứng PCR để xác định chính xác sự có mặt của virus đậu dê.

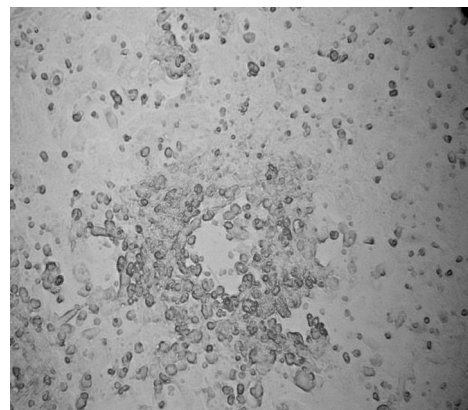
KHOA HỌC KỸ THUẬT THÚ Y - TẬP XVIII - SỐ 6 - 2011

Bảng 1. Khả năng thích ứng của virus cường độc đậu dê trên môi trường tế bào tinh hoàn dê

Chủng virus	Độ pha loãng	Liều gây nhiễm (ml)	CPE qua các giai đoạn sau khi gây nhiễm virus					
			8 ngày	9 ngày	10 ngày	11 ngày	12 ngày	13 ngày
NT1	1/10	0,5	+	+	++	+++	+++	++++
	1/20	0,5	-	+	+	++	++	+++
NT3	1/10	0,5	-	+	+	++	+++	++++
	1/20	0,5	-	+	+	++	++	+++
NT4	1/10	0,5	+	+	++	++	+++	+++
	1/20	0,5	-	+	+	++	+++	+++
NT6	1/10	0,5	-	+	+	+	++	+++
	1/20	0,5	-	+	+	+	++	+++
KH9	1/10	0,5	+	+	++	++	+++	++++
	1/20	0,5	-	+	+	+	++	+++
KH10	1/10	0,5	-	+	+	+	++	+++
	1/20	0,5	-	+	+	+	++	+++
PY7	1/10	0,5	-	+	+	+	++	+++
	1/20	0,5	-	-	+	+	++	++

Kết quả kiểm tra đối với 7 chủng virus phân lập trên tế bào GT cho thấy, cả 7 chủng virus nuôi cấy đều cho kết quả PCR dương tính với virus đậu dê bằng cặp mồi P1, P2 cho sản phẩm PCR có độ dài đoạn gen là 192bp. Điều này chứng tỏ các chủng virus phân lập đều có khả năng thích ứng trên môi trường tế bào GT. Tuy nhiên, kết quả cũng cho thấy khả năng thích nghi của mỗi chủng virus có sự khác nhau, các chủng ký hiệu

NT1, NT3 và KH9 có khả năng thích nghi cao hơn so với các chủng NT4, NT6, KH10 và PY7 trong lần đầu tiên gây nhiễm. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Bhanuprakash et al. (2003); Ramisse et al. (1978); Ramesh et al. (1980). Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc phân lập virus đậu dê trên tế bào GT (hình 2).



Hình 2. Bệnh lý tế bào (CPE) do virus đậu dê gây ra trên tế bào GT

3.2. Khả năng thích ứng của virus đậu dê trên tế bào GT qua các lần tiếp đời

Từ kết quả thí nghiệm trên, chúng tôi tiếp tục kiểm tra khả năng nhân lên của các chủng virus cường độc đậu dê trên môi trường tế bào GT ở các lần cấy truyền tiếp theo để đánh giá khả năng

thích ứng của chúng trên tế bào GT. Các chai tế bào gây nhiễm virus đậu dê có bệnh lý tế bào sau khi thu hoạch được đông tan 3 lần, ly tâm tốc độ 10.000v/p và gây nhiễm cho các chai tế bào GT ở các đời tiếp theo. Kết quả gây nhiễm virus qua các lần tiếp truyền tiếp theo thể hiện ở bảng 2.

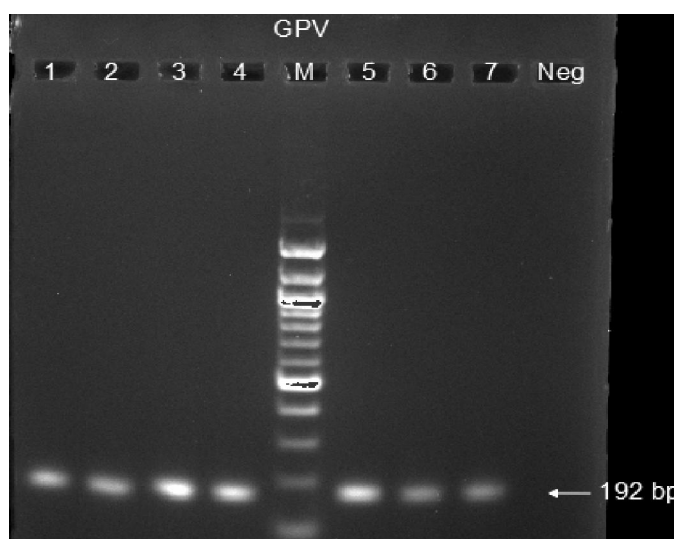
Bảng 2. Khả năng thích ứng của virus cường độc đậu dê trên tế bào GT

Số đời gây nhiễm	Số chai tế bào gây nhiễm	Ngày xuất hiện CPE	Kết quả PCR
1	2	8	(+)
2	2	7	(+)
3	2	7	(+)
4	2	6	(+)
5	2	4	(+)
6	2	4	(+)
7	2	4	(+)

Bảng 2 cho thấy, virus cường độc đậu dê có khả năng thích ứng tốt trên tế bào GT thể hiện ở khả năng gây bệnh lý tế bào tăng dần qua các lần cấy truyền liên tiếp trên tế bào GT. Từ lần cấy truyền thứ 5 đến thứ 7, virus gây bệnh lý tế bào ổn định ở ngày thứ 4 (96 giờ) sau khi gây nhiễm. Ở tất cả các lần cấy truyền virus đậu dê trên tế

bào GT, sau khi thu hoạch dịch nuôi cấy tế bào đều được chúng tôi chiết tách DNA và kiểm tra bằng phản ứng PCR. Kết quả cho thấy, những chai tế bào sau khi gây nhiễm virus có bệnh lý tế bào đồng thời cũng dương tính với virus đậu dê (hình 3).

Hình ảnh PCR qua các lần tiếp truyền virus trên tế bào GT



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR đoạn gen có độ dài 192bp

Giếng M: thang DNA chuẩn; giếng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: sản phẩm PCR của các mẫu virus đậu dê qua 7 lần tiếp đời qua tế bào GT.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Hess et al. (1963); Babiuk et al. (2007) cho rằng nuôi cấy virus trên tế bào tinh hoàn dê non cho hiệu giá virus cao và CPE ổn định với cả các chủng phân lập ngoài thực địa và các chủng sử dụng làm vaccin.

3.3. Kết quả chuẩn độ virus cường độc đậu dê trên tế bào GT

Từ kết quả các lần phân lập virus đậu dê trên tế bào GT, chúng tôi tiến hành chọn chủng virus NT1, chủng gây bệnh lý tế bào ổn định nhất trong số 7 chủng virus để chuẩn độ. Virus từ đời tiếp truyền thứ 4 đến thứ 7 trên tế bào GT được pha loãng theo cơ số 10, từ 10^{-1} - 10^{-9} gây nhiễm cho đĩa tế bào GT 96 giếng. Kết quả xác định chỉ số TCID₅₀ được tính toán theo công thức của Reed - Muench.

Bảng 3. Kết quả xác định chỉ số TCID₅₀

Số đời virus chuẩn độ	TCID ₅₀
4	$10^{4,6}$
5	$10^{5,2}$
6	$10^{5,0}$
7	$10^{5,2}$

Kết quả chuẩn độ cho thấy, từ đời thứ 5 đến đời thứ 7, hiệu giá virus (TCID₅₀) đạt từ $10^{5,0}$ đến $10^{5,2}$, cao hơn so với đời thứ 4 (TCID₅₀ = $10^{4,6}$). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Babiuk et al. (2009) khi phân lập virus đậu dê trên tế bào tinh hoàn cừu.

IV. KẾT LUẬN

- Các chủng virus đậu dê phân lập từ thực địa có khả năng thích ứng tốt trên tế bào tinh hoàn dê sơ cấp và gây bệnh lý tế bào ổn định.

- Chỉ số TCID₅₀ chuẩn độ trên tế bào GT dao động từ $10^{5,0}$ đến $10^{5,2}$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Babiuk S, Parkyn G, Copps J, Larence J E, Marta I. Sabara, Timothy R. Bowden, David B. Boyle and Paul Kitchin R (2007). Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization. *J Vet*, 19: 486-491.
2. Babiuk S, Bowden TR, Parkyn G, Dalman B, Hoa DM, Long NT, Vu PP, Bieu do X, Copps J, Boyle DB (2009). Yemen and Vietnam capripoxviruses demonstrate a distinct host preference for goats compared with sheep. *J Gen Virol*, 90(1):105-114.
3. Bhanuprakash V, Indrani BK, Moorthy ARS, Krishnappa G (2003). Isolation, purification and comparison of protein profiles of sheep poxviruses. *Indian J Comp Microbiol Immunol Infect Dis*, 24(1):15-20.
4. Hess W.R, May H.J, Patty R.E (1963). Serial cultures of lamb testicular cell and their use in virus studies. *Am J Vet Res*, 24: 59-63.
5. Ireland DC, Binopal YS (1998). Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *J Virol Methods*, 74(1):1-7.
6. Ramesh KG (1980). Immunological studies on the Ranipet strain of sheep poxvirus propagated in lamb testes cell culture. *MVSc Thesis*. Uni Agric Sci, Bangalore, Karnataka, India.
7. Ramisse J, Asso J, Hassan A, Anane O, Jemli J (1978). Cell culture of sheep pox virus: application to vaccine production and testing of immunity. *Revue d'Elevage et de Méd Vét des pays-trop*, 31:11-19.