

Nghiên cứu khoa học

SO SÁNH MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA CHỦNG VIRUS PRRS PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM (KTY-PRRS-04) QUA CÁC ĐỜI CẤY TRUYỀN

*Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Bá Hiền,
Trịnh Đình Thâu, Cao Thị Bích Phượng, Lê Văn Hùng
Khoa Thú y - Học viện Nông nghiệp Việt Nam.*

TÓM TẮT

Chủng virus trong nghiên cứu này là KTY-PRRS-04, được phân lập từ lợn mắc bệnh tai xanh (PRRS) tại Bắc Giang, Việt Nam. Tế bào MARC-145 là tế bào thích hợp đã được dùng để nuôi cấy, phân lập virus KTY-PRRS-04, virus được nhân lên nhanh trong tế bào và gây bệnh tích điển hình là các tế bào co cụm lại với nhau, bong tróc khỏi đáy bình nuôi cấy. Bệnh tích tế bào (CPE) xuất hiện sớm sau 24 giờ gây nhiễm; sau 72 giờ các tế bào đều bong tróc khỏi đáy bình nuôi cấy. Hiệu giá virus đời 1 và đời 10 đạt 10^5 (TCID₅₀/25 μ l), từ đời 20 đến đời 40 là 10^6 . Số lượng virus giải phóng tự do trong môi trường nhiều hơn số lượng virus ở trong tế bào. Lượng virus nhân lên bên trong cũng như lượng virus giải phóng ra ngoài tế bào ở đời thứ nhất thấp hơn đời thứ 10, 20 (thể hiện ở giá trị \log_{10} TCID₅₀/25 μ l, trung bình đạt: 2,66 và 3,04 so với 2,87 và 3,66) và đời 10, 20 lại thấp hơn đời 30, 40 (2,87 và 3,66 so với 3,16 và 3,71).

Từ khóa: PRRSV, Phân lập virus, Đường cong sinh trưởng, Đặc tính sinh học

Comparison of some biological characteristics of PRRS virus strain (KTY-PRRS-04) isolated in Viet Nam through passage culture

*Nguyen Thi Lan, Nguyen Ba Hien,
Trinh Dinh Thau, Cao Thi Bich Phuong, Le Van Hung*

SUMMARY

The PRRSV strain in this study is KTY-PRRS-04. It was isolated from the “blue ear” disease pigs (PRRS) in Bac Giang province, Viet Nam. MARC-145 cell was used to culture and isolate KTY-PRRS-04 virus, this virus strain developed quickly in this cell and caused the typical symptom that was the cells gathered together and sloughed out of the culture jar bottom. CPE appeared early after 24 hours of infection. After 72 hours, all of the culture cells were sloughed out of the jar bottom. The numbers of virus from the 1st to the 10th passage were 10^5 (TCID₅₀/25 μ l) and from the 20th to 40th passage were 10^6 . The numbers of free virus in the media were higher than the numbers of virus in the cells. The number of virus (presented in value of \log_{10} TCID₅₀/25 μ l) in the cells or in the media, in the 1st passage were smaller than in the 10th and 20th passages (2.66; 3.04 in comparison with 2.87; 3.66) and the number of virus in the 30th and 40th passage were the highest (3.61 and 3.71).

Keywords: PRRSV, Viral isolation, Growth curves, Biological characteristics

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh tai xanh hay hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome - PRRS) là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm trên lợn, bệnh xảy ra trên mọi lứa tuổi và giống (Hill, 1990). Bệnh xuất hiện lần đầu tiên ở Mỹ vào năm 1987, sau đó lây lan nhanh (Keffaber, 1987). Năm 1988, bệnh lan sang Canada và các nước châu Âu. Năm 1998, bệnh được phát hiện ở Hàn Quốc, Nhật Bản thuộc khu vực châu Á. Từ năm 2005 trở lại đây, bệnh lây lan nhiều nước trên thế giới và gây thiệt hại kinh tế cho ngành chăn nuôi lợn công nghiệp (Neumann, 2005). Nguyên nhân gây bệnh tai xanh là virus PRRS (PRRSV) thuộc họ *Arteriviridae*, giống *Nidovirales*. Bộ gene của virus PRRS chỉ gồm một sợi RNA đơn, bên ngoài được bao bọc bởi một lớp vỏ. Giống như các virus trong họ *Arteriviridae*, virus PRRS có khả năng đột biến và tái tổ hợp gene liên tục (Allende và cs, 2000; Chang và cs, 2002; Kapur và cs, 1996; Le Gall và cs, 1998; Rowland và cs, 1999). Các chủng virus PRRS khác nhau thì khác nhau về đặc tính kháng nguyên, đặc điểm bệnh lý và đặc tính di truyền (Key và cs, 2001; Ropp và cs, 2004). Lợn bị mắc bệnh thường có biểu hiện sốt cao, da mẩn đỏ, tỷ lệ ốm và chết cao (Chen và cs, 2006; Gao và cs, 2004).

Năm 1992, người ta đã tiến hành nuôi cấy virus PRRS trên dòng tế bào có nguồn gốc từ tế bào biểu mô thận khỉ xanh như: MA104, CL2621 và MARC-145 (Baron và cs, 1992). Tuy nhiên, những nghiên cứu tiếp theo đã chỉ ra rằng dòng tế bào MARC-145 là thích hợp nhất cho việc phân lập virus PRRS (Kim và cs, 1993; Meulenberg và cs, 2000).

Tại Việt Nam, năm 1997, điều tra huyết thanh học cho thấy 10/51 lợn giống nhập từ Mỹ dương tính với virus PRRS (Bùi Quang Anh và cs, 2008). Tuy nhiên, sự bùng phát thành dịch và gây tổn thất đáng báo động cho ngành chăn nuôi lợn bắt đầu vào tháng 3 năm 2007 (Cục Thú y, 2007). Sau đó dịch lây lan nhanh và rộng khắp các tỉnh miền Bắc. Tới nay, các nghiên cứu về nguyên nhân gây bệnh, các nghiên cứu về

bệnh, đặc biệt là các đặc tính sinh học và sinh học phân tử còn hạn chế. Vì vậy, việc nghiên cứu đặc tính sinh học của các chủng virus PRRS phân lập được từ thực địa qua các đời nuôi cấy có ý nghĩa quan trọng trong việc lựa chọn ra các chủng có tiềm năng sản xuất các chế phẩm sinh học, các kit chẩn đoán nhanh và vaccin phòng bệnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng môi trường tế bào MARC-145 để tiến hành nuôi cấy chủng virus KTY-PRRS-04 qua 40 đời cấy truyền và xác định đặc tính sinh học của chúng với mục đích tuyển chọn một chủng virus làm giống gốc cho việc nghiên cứu sản xuất vaccin.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu nghiên cứu

Chủng virus PRRS phân lập được tại Việt Nam (KTY-PRRS-04) và chủng virus vaccin, tế bào MARC-145 và dụng cụ, trang thiết bị phòng thí nghiệm cần thiết trong quá trình nghiên cứu.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp nuôi cấy virus PRRS trên môi trường tế bào MARC-145.

Chuẩn bị tế bào MARC-145 một lớp: Tế bào MARC-145 được nuôi cấy trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM có bổ sung 10% Fetal bovine serum - FBS, nuôi cấy trong tủ ấm ở điều kiện 37°C, hàm lượng 5% CO₂. Tế bào MARC-145 một lớp được chuẩn bị trên khay nuôi cấy tế bào 24 giếng.

Gây nhiễm virus và quan sát kết quả: Từ các giếng tế bào MARC-145 một lớp đã chuẩn bị ở bước 1, hút bỏ môi trường nuôi cấy và bổ sung 100µl huyền dịch chứa virus. Tế bào được gây nhiễm virus được ủ ở điều kiện 37°C với 5% CO₂ trong 30 phút. Sau đó bổ sung 2 ml môi trường DMEM có chứa 10% Tryptose Phosphate Broth - TPB vào các giếng tế bào và để ở 37°C với 5% CO₂. Hàng ngày theo dõi sự phá hủy tế bào bằng kính hiển vi soi nổi và tiến hành thu virus khi 80% - 90% tế bào bị phá hủy.

- Phương pháp xác định nồng độ virus TCID₅₀/25 μ l.

Tế bào MARC-145 một lớp được chuẩn bị trên khay 96 giếng. Mẫu virus cần xác định nồng độ được pha loãng theo cơ số 10 rồi đem gây nhiễm 25 μ l dung dịch virus vào các giếng có chứa tế bào MARC-145 một lớp, mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần. Sau 1 giờ ủ, bổ sung môi trường DMEM có chứa 10% TPB. Theo dõi bệnh tích tế bào hàng ngày bằng kính hiển vi soi nổi. Giá trị TCID₅₀/25 μ l được xác định theo phương pháp Behrens - Karber (Lan NT và cs, 2005).

- Phương pháp xác định đường cong sinh trưởng của virus PRRS qua các đời cấy truyền (lựa chọn các đời thứ 1, 10, 20, 30 và 40 để nghiên cứu và so sánh).

Virus PRRS được gây nhiễm lên tế bào với tỷ lệ (Multiplicity of infection - MOI) là 0,01. Sau 1 giờ ủ, huyền dịch chứa virus được hút bỏ và môi trường nuôi dưỡng được rửa sạch với 0,5ml PBS, sau đó bổ sung môi trường DMEM có chứa 10% TPB. Virus giải phóng ngoài tế bào và trong tế bào được thu riêng ở các thời điểm khác nhau sau khi gây nhiễm virus (ở 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ, 60 giờ, 72 giờ, 84 giờ, 96 giờ và 108 giờ). Đường cong nhân lên của virus được xây dựng có biến là log₁₀ của TCID₅₀/25 μ l tại mỗi

thời điểm thu virus.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu khả năng gây bệnh tích trên môi trường tế bào MARC-145 do chủng virus KTY-PRRS-04 gây nên

Mẫu bệnh phẩm thu thập tại tỉnh Bắc Giang từ một ổ dịch PRRS xảy ra năm 2014 (mẫu này đã được giải trình tự đoạn gene ORF7; phân tích cây phát sinh chủng loại cho thấy chúng thuộc chủng Bắc Mỹ). Lợn bệnh được lựa chọn thu mẫu có biểu hiện triệu chứng và bệnh tích điển hình của PRRS: con vật sốt cao, táo bón, ho, khó thở, tai tím tái. Bệnh tích vi thể chủ yếu: thâm nhiễm tế bào viêm, phế quản - phế viêm hoặc viêm phổi thùy, xuất huyết cầu thận, bể thận... và đã được khẳng định sự có mặt của virus tai xanh bằng kỹ thuật PCR.

Đã tiến hành phân lập được một chủng virus từ mẫu bệnh phẩm này trên môi trường tế bào MARC-145 và giải trình tự gene, đã xác định chủng virus phân lập thuộc dòng Bắc Mỹ, được đặt tên là chủng virus KTY-PRRS-04. Để xác định khả năng gây bệnh tích trên môi trường nuôi tế bào MARC-145, chúng tôi gây nhiễm virus trên môi trường nuôi tế bào này, quan sát sự biến đổi bệnh tích của tế bào trong thời gian 108 giờ sau gây nhiễm có bố trí đối chứng là chủng virus vaccin PRRS dòng Bắc Mỹ để so sánh. Kết quả thu được tổng hợp và trình bày thông qua bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Kết quả theo dõi sự biến đổi CPE của tế bào MARC-145 sau gây nhiễm chủng virus KTY-PRRS-04

Thời gian (giờ)	24	36	48	60	72
Mẫu	CPE theo thời gian sau khi gây nhiễm virus (%)				
KTY-PRRS-04	5	35	60	100	B
Vaccin	5*	20	50	100	B

Chú thích: B: Toàn bộ tế bào bong tróc khỏi bề mặt bình nuôi cấy;

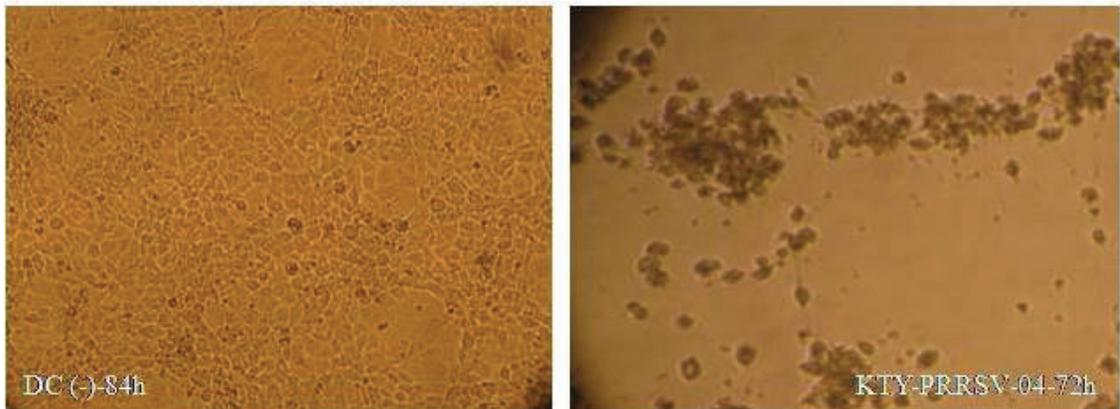
*: % tế bào bị phá hủy so với tổng diện tích đáy bình nuôi cấy (ước lượng bằng mắt khi soi trên kính hiển vi soi nổi)

Kết quả bảng 1 cho thấy: chủng KTY-PRRS-04 có khả năng phát triển, nhân lên

trên môi trường tế bào MARC-145 giống với quá trình xâm nhập, nhân lên của chủng virus

vacxin. Các tế bào bị nhiễm chủng virus PRRS phân lập bị co cụm lại với nhau chồi lên khỏi đáy bình nuôi cấy và khi tế bào bị virus phá hủy hoàn toàn thì bong khỏi đáy bình, có thể quan sát rất rõ hình thái bệnh tích này qua kính hiển vi soi ngược (hình 1). Bệnh tích tế bào (CPE) xuất hiện sớm ở thời điểm 24 giờ sau khi gây nhiễm (khoảng 5%); trong đó chủng virus vacxin ở thời điểm tương tự, CPE cũng chỉ đạt khoảng 5%. Quan sát ở các giờ tiếp theo sau khi xuất hiện CPE, chúng tôi nhận thấy CPE đạt

xấp xỉ 60% ở thời điểm 48 giờ sau gây nhiễm, trong khi chủng virus vacxin, CPE đạt 50%; ở 60 giờ sau gây nhiễm, CPE của cả 2 chủng virus đều đạt 100%. Đến 72 giờ sau gây nhiễm, các tế bào đều bong tróc khỏi bề mặt nuôi cấy. Từ các kết quả nghiên cứu về khả năng gây bệnh tích trên môi trường tế bào MARC-145 cho thấy: Virus PRRS chủng KTY-PRRS-04 có khả năng thích ứng và nhân lên một cách mạnh mẽ; gây bệnh tích tế bào trong thời gian ngắn sau khi gây nhiễm và hủy hoại tế bào nhanh chóng.



Hình 1. Khả năng gây bệnh tích tế bào (CPE) của chủng KTY-PRRS-04 trên môi trường tế bào MARC-145

3.2. Kết quả nghiên cứu đặc tính sinh học của chủng virus KTY-PRRS-04 sau khi cấy truyền 40 đời trên môi trường tế bào MARC-145

Bảng 2. Kết quả cấy truyền chủng virus KTY-PRRS-04 phân lập được trên môi trường tế bào MARC-145 qua 40 đời

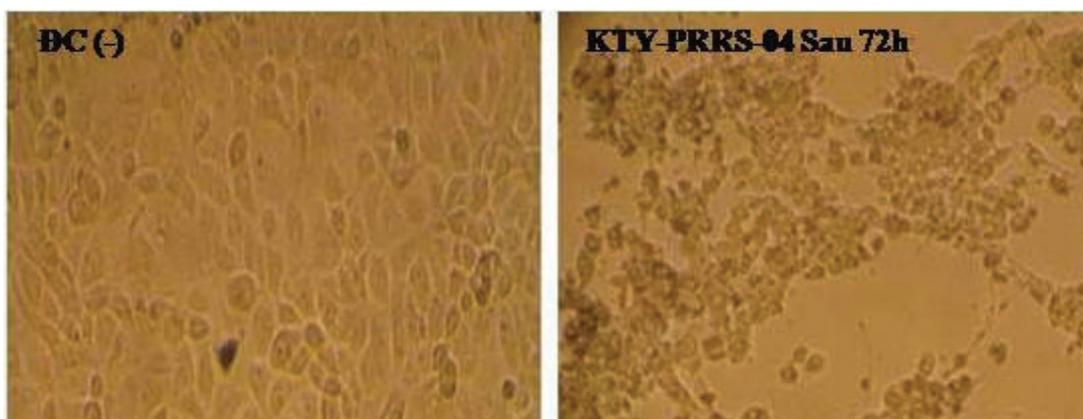
Đời	CPE theo thời gian sau khi gây nhiễm virus (%)				
	24	36	48	60	72
1	10*	40	65	100	B
10	15	45	70	100	B
20	20	50	80	100	B
30	25	60	90	100	B
40	25	75	100		B

Chú thích: B: Toàn bộ tế bào bong tróc khỏi bề mặt nuôi cấy

**: % tế bào bị phá hủy so với tổng diện tích đáy bình nuôi cấy (ước lượng khi soi trên kính hiển vi soi nổi)*

Kết quả bảng 2 cho thấy: Khả năng gây bệnh tích tế bào của chủng virus KTY-PRRS-04 tăng dần ở từng thời điểm qua các đời cấy truyền, ở thời điểm 24 giờ sau gây nhiễm, tác động hủy hoại tế bào chưa rõ rệt, chỉ biến động trong khoảng 10-25% diện tích tế bào nuôi. Đến thời điểm 36 giờ, tác động hủy hoại tế bào khá rõ, và ở các đời cấy truyền sau (đời 30 và 40), tỷ lệ diện tích tế bào bị hủy hoại đã tăng rõ rệt, ở đời cấy truyền thứ 40, ở 36 giờ sau gây nhiễm đã có 75% diện tích tế bào bị tác động, trong khi đó đời cấy truyền thứ nhất chỉ đạt 40%. Ở đời cấy

truyền thứ 40, tại thời điểm 48 giờ đã có 100% tế bào bị hủy hoại, các đời trước đó chỉ biến động từ 65 đến 90% và phải đến 60 giờ, virus mới tác động hủy hoại 100% diện tích tế bào; nhưng sau 72 giờ gây nhiễm, ở tất cả các đời cấy truyền, toàn bộ tế bào bị phá hủy và bong tróc khỏi bề mặt bình nuôi cấy (hình 2). Điều này một lần nữa chứng minh rằng chủng virus KTY-PRRS-04 mà chúng tôi lựa chọn, thích ứng rất tốt trên môi trường tế bào MARC-145. Tính thích ứng này tăng lên qua các đời cấy truyền.



Hình 2. Khả năng gây bệnh tích tế bào (CPE) của chủng virus KTY-PRRS-04 trên môi trường tế bào MARC-145 qua 40 đời cấy truyền

3.3. Kết quả xác định hiệu giá virus (TCID₅₀/25 μ l) của chủng virus KTY-PRRS-04 qua 40 đời cấy truyền

Chúng tôi đã tiến hành xác định hiệu giá

virus (TCID₅₀/25 μ l) của chủng virus KTY-PRRS-04 phân lập được qua 40 đời cấy truyền khác nhau, ở mỗi đời cấy truyền, tiến hành 3 lần chuẩn độ rồi lấy chỉ số TCID₅₀ trung bình. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xác định hiệu giá virus KTY-PRRS-04 phân lập được qua 40 đời cấy truyền

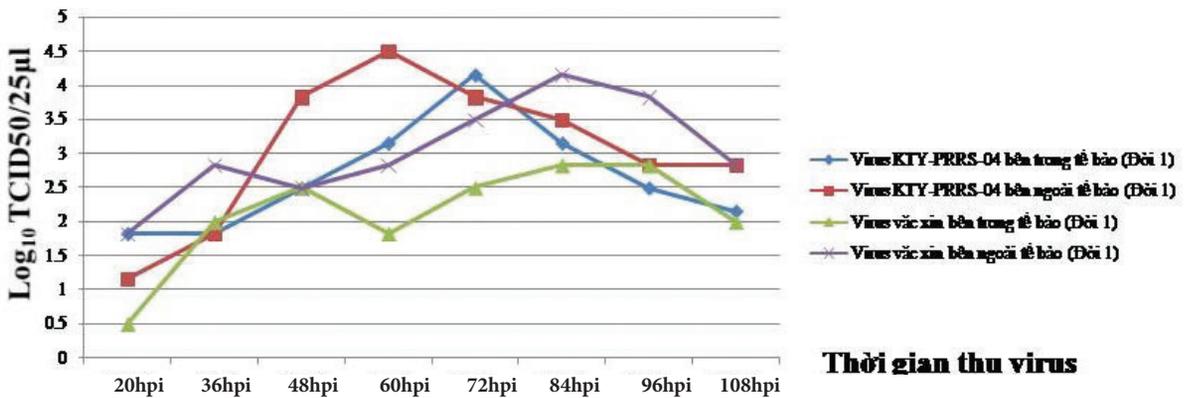
STT	Virus	Hiệu giá virus (TCID ₅₀ /25 μ l)				
		Đời 1	Đời 10	Đời 20	Đời 30	Đời 40
1	KTY-PRRS-04	1,74x10 ⁵	4,16x10 ⁵	4,16x10 ⁶	5,56x10 ⁶	5,56x10 ⁶
4	Vacxin	2,44x10 ⁶	2,16x10 ⁶	2,83x10 ⁶	2,83x10 ⁶	2,16x10 ⁶

Kết quả bảng 3 cho thấy: hiệu giá virus qua 40 đời cấy truyền có xu hướng tăng nhẹ và ổn định, giá trị TCID₅₀/25μl tại đời thứ nhất đạt 1,74x10⁵; đến đời thứ 10, giá trị này đạt 4,16x10⁵. Tuy nhiên, đến đời cấy truyền thứ 20, giá trị TCID₅₀/25μl này tăng khoảng 10 lần và đạt 4,56x10⁶. Giá trị này ổn định đến đời cấy truyền thứ 40 và tính ổn định này cũng tương đồng so với chủng virus vaccin (TCID₅₀/25μl luôn duy trì ở trị số >2,0x10⁶ qua 40 đời cấy truyền). Như vậy, so với chủng virus vaccin đối chứng, chủng virus KTY-PRRS-04 có hiệu giá cao gấp khoảng 2 lần và khá ổn định qua các

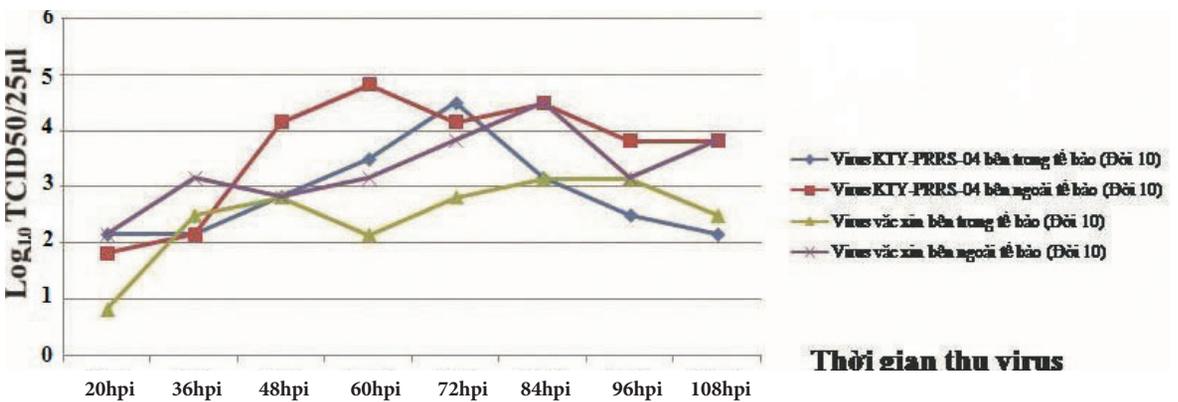
đời cấy truyền, có thể được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo (sản xuất các chế phẩm sinh học, vaccin phòng bệnh, kit chẩn đoán nhanh ...).

3.4. Kết quả xác định quá trình phát triển, nhân lên của chủng virus KTY-PRRS-04 phân lập được trên môi trường tế bào MARC-145

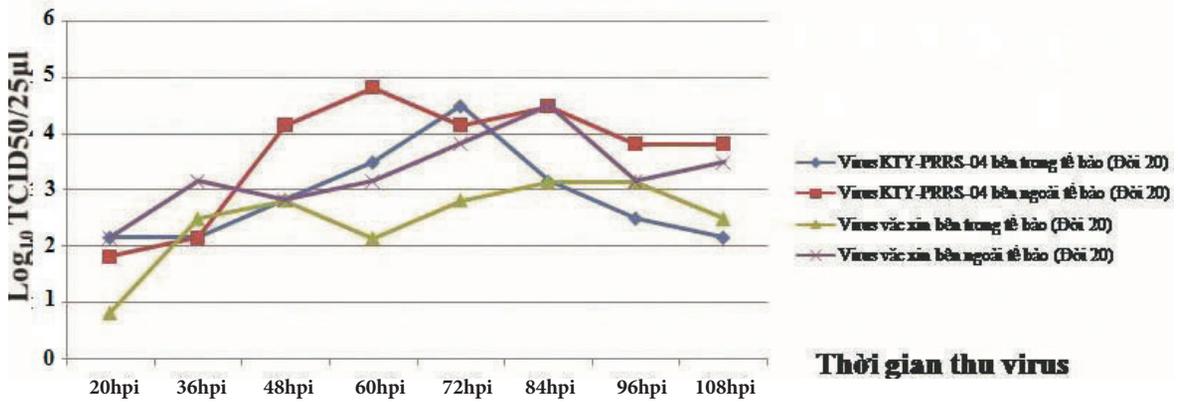
Kết quả xác định quá trình phát triển, nhân lên của chủng virus KTY-PRRS-04 ở các thời điểm qua các đời cấy truyền được trình bày ở biểu đồ 1, 2, 3, 4 và 5.



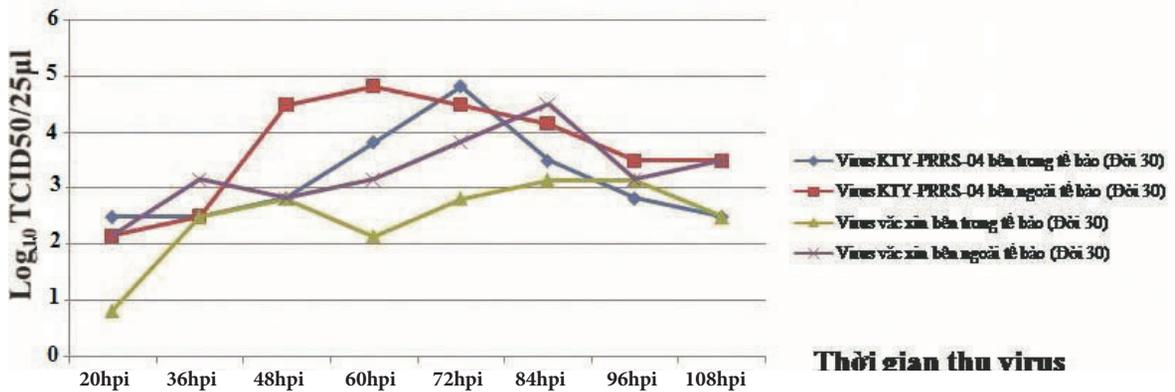
Biểu đồ 1. Đường cong sinh trưởng của chủng virus KTY-PRRS-04 ở đời cấy truyền thứ nhất



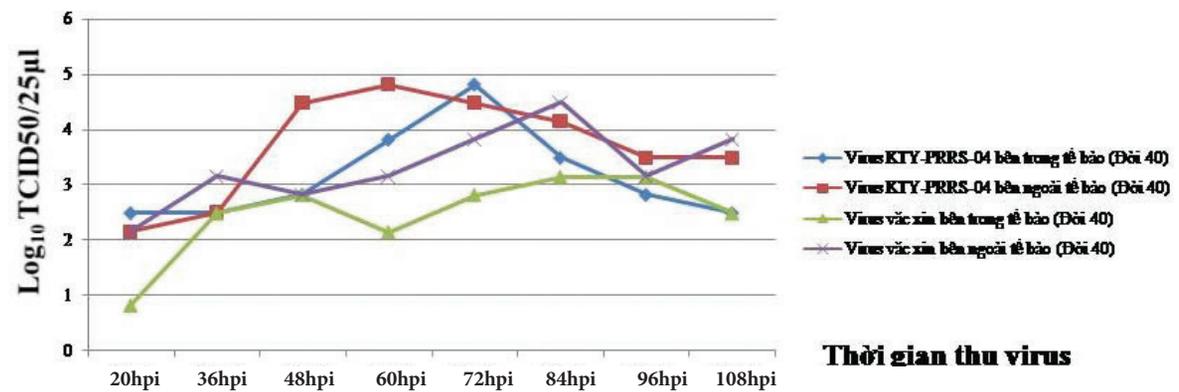
Biểu đồ 2. Đường cong sinh trưởng của chủng virus KTY-PRRS-04 ở đời cấy truyền thứ 10



Biểu đồ 3. Đường cong sinh trưởng của chủng virus KTY-PRRS-04 ở đời cấy truyền thứ 20



Biểu đồ 4. Đường cong sinh trưởng của chủng virus KTY-PRRS-04 ở đời cấy truyền thứ 30



Biểu đồ 5. Đường cong sinh trưởng của chủng virus KTY-PRRS-04 ở đời cấy truyền thứ 40

Qua biểu đồ 1, 2, 3, 4 và 5 cho thấy: thời gian virus xâm nhập vào trong tế bào MARC-145 tương đối nhanh (ở các đời cây truyền). Ở đời cây truyền thứ nhất, lượng virus bên trong tế bào xác định là thấp nhất, thể hiện ở giá trị \log_{10} TCID50/25 μ l trung bình đạt khoảng 2,66 (đối với chủng virus vaccin, giá trị này đạt 2,12). Đến đời thứ 10, lượng virus xâm nhập vào bên trong tế bào có xu hướng tăng nhẹ, giá trị \log_{10} TCID50/25 μ l trung bình đạt khoảng 2,87 so với 2,66 ở đời cây truyền thứ nhất (đối với chủng virus vaccin, giá trị này đạt 2,49) và ổn định đến đời cây truyền thứ 20. Tuy nhiên, đến đời cây truyền thứ 30 thì lượng virus bên trong tế bào tiếp tục tăng, \log_{10} TCID50/25 μ l trung bình đạt khoảng 3,16 so với 2,87 ở đời cây truyền thứ 10 và 20 (đối với chủng virus vaccin, giá trị này đạt 2,50) rồi có xu hướng ổn định đến đời cây truyền thứ 40. Đó là vì ở đời nuôi cấy thứ nhất do khả năng thích nghi của chủng virus với môi trường tế bào MARC-145 chưa cao; tại các đời cây truyền tiếp theo, khả năng thích ứng của chủng virus trên môi trường tế bào MARC-145 ngày càng tăng và ổn định.

Ở các đời cây truyền, tại các thời điểm khác nhau, chúng tôi tiến hành theo dõi và thu mẫu để nghiên cứu quá trình giải phóng virus qua các đời. Kết quả thể hiện trên biểu đồ 1, 2, 3, 4 và 5 cho thấy: khả năng phá vỡ tế bào, giải phóng virus tại các đời cây truyền khác nhau thì khác nhau. Tại đời cây truyền thứ nhất, khả năng giải phóng virus khỏi tế bào là thấp nhất, giá trị \log_{10} TCID50/25 μ l trung bình đạt khoảng 3,04 (đối với chủng virus vaccin, giá trị này đạt 3,04). Tuy nhiên, đến đời thứ 10, khả năng giải phóng virus khỏi tế bào tăng nhẹ, giá trị \log_{10} TCID50/25 μ l trung bình đạt khoảng 3,66 so với 3,04 ở đời thứ nhất (đối với chủng virus vaccin, giá trị này đạt 3,33) và có xu hướng ổn định đến đời thứ 20. Tại đời cây truyền thứ 30 trở lên, giá trị này tiếp tục tăng và ổn định đến đời cây truyền thứ 40, \log_{10} TCID50/25 μ l trung bình đạt khoảng 3,71 so với 3,66 ở đời cây truyền thứ 10 và 20 (đối với chủng virus vaccin, giá trị này đạt 3,28). Mặc dù vậy, lượng virus được giải phóng khỏi tế bào luôn cao hơn lượng

virus bên trong tế bào (ở các đời cây truyền trong nghiên cứu).

Như vậy sự xâm nhập và phát triển của virus PRRS chủng KTY-PRRS-04 trên môi trường tế bào MARC-145 qua 40 đời cây truyền không phải là một quá trình liên tục. Ở mỗi đời cây truyền khác nhau thì khả năng nhân lên và giải phóng virus khỏi tế bào MARC-145 là khác nhau (phù hợp với quy luật nhân lên của chủng virus vaccin nhược độc). Tuy nhiên, giá trị \log_{10} TCID50/25 μ l có xu hướng ổn định từ đời cây truyền thứ 20. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đây cho rằng: Hàm lượng virus giải phóng tự do nhiều hơn hàm lượng virus ở trong tế bào. Lượng virus phân lập được trong tế bào liên tục tăng mạnh sau 48 giờ gây nhiễm, đạt mức độ cao nhất sau 72h gây nhiễm với giá trị \log_{10} TCID50 là 4,83 (đời thứ nhất) (Nguyễn Thị Lan và cs, 2012). Như vậy có thể khẳng định, chủng virus KTY-PRRS-04 mà chúng tôi phân lập được thích ứng, ổn định và phát triển tốt trên môi trường nuôi tế bào MARC-145.

IV. KẾT LUẬN

Khả năng gây bệnh tích tế bào của virus PRRS chủng KTY-PRRS-04 là nhanh, mạnh và ổn định qua 40 đời cây truyền; bệnh tích tế bào xuất hiện sớm sau 24 giờ gây nhiễm. Đến thời điểm 72 giờ, toàn bộ tế bào nuôi bị phá hủy và bong tróc khỏi bề mặt bình nuôi cấy. Hiệu giá virus (TCID50/25 μ l) có xu hướng tăng và ổn định từ đời cây truyền thứ 20 đến đời thứ 40 (TCID50/25 μ l luôn giữ được ở giá trị $>4,0-5,6 \times 10^6$). Đường cong sinh trưởng của chủng virus này qua các đời cây truyền khác nhau có khác nhau, nhưng ổn định ở đời thứ 30 và 40. Tại những thời điểm khác nhau sau khi gây nhiễm thì khả năng nhân lên và giải phóng virus khỏi tế bào MARC-145 là khác nhau (ở các đời cây truyền). Nghiên cứu này có thể được ứng dụng trong việc lựa chọn chủng virus PRRS có tiềm năng sản xuất các chế phẩm sinh học hoặc sản xuất vaccin. Chủng virus mà chúng tôi phân lập, lựa chọn, chủng KTY-PRRS-04 hoàn toàn có triển vọng để sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Quang Anh, Hoàng Văn Năm, Văn Đăng Kỳ, Nguyễn Văn Long, Nguyễn Ngọc Tiên, 2008. Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS), NXB Nông nghiệp, trang 7- 21.
2. Nguyễn Thị Lan, Lương Quốc Hưng, 2012. Nghiên cứu một số đặc tính sinh học của virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (PRRS) phân lập được trên đàn lợn nuôi tại một số tỉnh phía Bắc, Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Phát triển Nông thôn*, kỳ 2, tháng 2 năm 2012, trang 82-87.
3. Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Thị Hoa, 2012. Chẩn đoán Hội chứng Rối loạn sinh sản và hô hấp (PRRS) ở lợn con cai sữa bằng kỹ thuật Bệnh lý và kỹ thuật RT-PCR. *Tạp chí Khoa học và Phát triển Nông thôn*, tập 10, số 2, 301-306.
4. Nguyễn Bá Hiên, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, 2013. Bệnh truyền nhiễm của động vật nuôi và biện pháp khống chế, NXB NN, Hà Nội
5. Allende, R., Laegreid, W.W., Kutish, G.F., Galeota, J.A., Wills, R.W., Osorio, F.A., 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J. Virol.* 74:10834-10837.
6. Chang, C.C., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Harmon, K.M., Dixon, P.M., Dvorak, C.M., Murtaugh, M.P., 2002. Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. *J. Virol.* 76:4750-4763.
7. Chen, J., Liu, T., Zhu, C.G., Jin, Y.F., Zhang, Y.Z., 2006. Genetic variation of Chinese PRRSV strains based on ORF5 sequence. *Biochemical Genetics* 44:425-435.
8. Gao, Z.Q., Guo, X., Yang, H.C., 2004. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Archives of Virology* 149:1341-1351.
9. Kapur, V., Elam, M.R., Pawlovich, T.M., Murtaugh, M.P., 1996. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the Midwestern United States. *J. Gen. Virol.* 77:1271-1276.
10. Key, K.F., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Swenson, S.L., Toth, T.E., Meng, X.J., 2001. Genetic variation and phylogenetic analyses of the ORF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Veterinary Microbiology*, 83:249-263.
11. Le Gall, A., Legeay, O., Bourhy, H., Arnould, C., Albina, E., Jestin, A., 1998. Molecular variation in the nucleoprotein gene (ORF 7) of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Res.* 54, 9-21.
12. Meulenber, J.J. 2000. *PRRSV*, the virus. *Vet. Res.*, 31:11-21.
13. Neumann EJ., 2005. "Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome swine production in the United States", *J.Am.Vet.Med. Asso*, 227:385- 392.
14. Ropp, S.L., Wees, C.E., Fang, Y., Nelson, E.A., Rossow, K.D., Bien, M., Arndt, B., Preszler, S., Steen, P., Christopher-Hennings, J., Collins, J.E., Benfield, D.A., Faaberg, K.S., 2004. Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *Journal of Virology*, 78:3684-3703.
15. Rowland, R.R., Steffen, M., Ackerman, T., Benfield, D.A., 1999. The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. *Virology*, 259:262-266.

Nhận ngày 15-6-2016

Phản biện ngày 30-6-2016