

Nghiên cứu khoa học

PHÂN LẬP VIRUS GÂY BỆNH VIÊM DA NỔI CỤC (LUMPY SKIN DISEASE – LSD) Ở BÒ TRÊN TẾ BÀO DÒNG MADIN – DARBY BOVINE KIDNEY (MDBK)

*Trần Thị Thanh Hà¹, Trương Anh Đức¹, Lý Đức Việt¹,
Hoàng Văn Tuấn¹, Nguyễn Thị Chính¹, Đặng Thị Kiều Anh¹,
Nguyễn Thế Vinh², Hoàng Thị Nhung³, Nông Đại Thế⁴,
Đỗ Tiến Đạt⁴, Dương Doãn Doanh⁴, Nguyễn Nam Hùng⁴, Đặng Vũ Hoàng¹*

TÓM TẮT

Mẫu bệnh phẩm bao gồm dịch mũi, dịch mắt và u cục trên da bò nghi nhiễm virus lumpy skin disease (LSDV) tại huyện Hữu Lũng (tỉnh Lạng Sơn) đã được thu thập (theo tiêu chuẩn của OIE) để xác định LSDV bằng phương pháp PCR truyền thống sử dụng cặp mồi đặc hiệu theo hướng dẫn của OIE [6] kết hợp realtime-PCR theo công bố của Alexander và cs. [3]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, mẫu bệnh phẩm thu thập trên bò tại thực địa dương tính với LSDV gây bệnh viêm da nổi cục. Kết quả phân lập LSDV ở ngày thứ 3 sau khi gây nhiễm virus ghi nhận thâm tế bào đã bắt đầu xuất hiện bệnh tích tế bào (CPE) đặc trưng. Các bệnh tích tế bào tăng dần ở ngày thứ 5 và đạt đỉnh ở ngày thứ 7. Kết quả phân lập LSDV được giám định lại bằng phương pháp realtime-PCR và PCR chẩn đoán theo khuyến cáo của OIE, kết hợp với phát hiện 4 gen chỉ báo gồm p32, RP030, ORF103 và thymidine kinase (TK) của LSDV gây bệnh viêm da nổi cục. Trình tự nucleotide của 4 gen chỉ báo đã được gửi đến Ngân hàng Gen (GenBank) với các mã truy cập như sau: MW326768 (gen p32), MW326766 (gen RP030), MW326769 (gen TK) và MW326767 (gen ORF103). Kết quả nghiên cứu cho thấy LSDV gây bệnh viêm da nổi cục ở bò tại Việt Nam đã được phân lập thành công.

Từ khóa: Virus gây viêm da nổi cục (LSDV), tế bào dòng MDBK, phân lập virus, realtime-PCR.

Isolation of Lumpy skin disease virus in Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cell line

*Tran Thi Thanh Ha, Truong Anh Duc, Ly Duc Viet,
Hoang Van Tuan, Nguyen Thi Chinh, Dang Thi Kieu Anh,
Nguyen The Vinh, Hoang Thi Nhung, Nong Dai The,
Do Tien Dat, Duong Doan Doanh, Nguyen Nam Hung, Dang Vu Hoang*

SUMMARY

The nasal, eye fluid samples and lump samples on the skin of the cattle suspecting LSDV infection with the clinical signs, such as fever, nodules on the skin, mucous membranes and oedema of the skin were collected to identify LSDV by the conventional PCR method using the

¹ Bộ môn Hóa sinh miễn dịch - Viện Thú y

² Bộ môn Virus - Viện Thú y

³ TT Dịch vụ nông nghiệp huyện Hữu Lũng, Lạng Sơn

⁴ Chi cục Chăn nuôi và Thú y Lạng Sơn

specific primers according to the guideline of OIE [6] in combination with realtime-PCR method as described previously by Alexander *et al.* [3]. The studied results showed that these field samples were positive with LSDV. The Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cell line system was used for LSDV isolation according to the guideline of OIE. The result of LSDV isolation showed that after 3 days of LSDV infection, the cytopathogenic effect (CPE) in the MDBK cell line was appeared in cell culture. The CPE caused by LSDV infection in MDBK cell line was increased at the day 5th and reached to the maximum at the day 7th. These results were re-inspected by realtime-PCR and conventional PCR for LSDV diagnosis recommended by OIE in combination with the detection of 4 well-known genetic markers, such as p32, RP030, ORF103 and thymidine kinase (TK) genes of LSDV. All sequences of 4 genetic markers generated in this study were submitted to GenBank under accession Nos. MW326768, MW326766, MW326769 and MW326767 for p32, RP030, thymidine kinase and ORF103 genes, respectively. The studied results indicated that LSDV has been successfully isolated in MDBK cell line for the first time in Viet Nam.

Keywords: LSDV, MDBK cell line, virus isolation, realtime-PCR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh viêm da nổi cục (Lumpy skin disease - LSD) còn được gọi là bệnh da sần, là bệnh truyền nhiễm do virus LSD gây ra ở trâu, bò. Virus LSD thuộc họ *Poxviridae*, chi *Capripoxvirus* và cùng chi với virus gây bệnh đậu trên dê, cừu [6, 12]. Động vật mẫn cảm đối với virus LSD gồm trâu, bò. Bệnh viêm da nổi cục không lây sang người và không gây bệnh trên người. Tỷ lệ trâu, bò mắc bệnh khoảng 10 - 20% và tỷ lệ chết khoảng 1 - 5% [4, 11, 15]. Thời gian ủ bệnh trung bình 4 - 14 ngày. Con đường truyền lây của virus LSD chủ yếu qua côn trùng đốt như muỗi, ruồi, ve; bệnh cũng có thể lây truyền do vận chuyển trâu, bò mang mầm bệnh, sử dụng chung máng uống, khu vực cho ăn, sữa, tinh dịch và qua tiếp xúc trực tiếp [4, 17, 18]. Bệnh thường xảy ra theo mùa, chủ yếu vào những tháng có thời tiết ẩm, khi côn trùng hoạt động mạnh. Bệnh gây thiệt hại về kinh tế đáng kể cho người chăn nuôi như sản lượng sữa giảm mạnh, giảm khả năng sinh sản, sảy thai, tổn thương da, giảm tăng trọng, gia súc có thể chết [13, 18, 19].

Bệnh viêm da nổi cục lần đầu tiên được phát hiện và mô tả tại Zambia vào năm 1929, sau đó dịch bệnh đã lây lan và lưu hành ở hầu khắp các châu lục [1, 12, 16]. Đến nay, bệnh viêm da nổi cục là dịch bệnh địa phương tại hầu hết các nước châu Phi. Từ năm 2012, bệnh viêm da nổi cục đã lây lan nhanh sang khu vực Trung Đông, Đông Nam châu Âu, biên giới Á - Âu, Nga và Kazakhstan [4,

9, 12, 14, 16]. Bệnh viêm da nổi cục đã và đang xảy ra trên diện rộng tại Thổ Nhĩ Kỳ, khi có tới 131 ổ dịch được ghi nhận trong năm 2019. Ở khu vực Tây Á và Trung Á, bệnh được ghi nhận lần đầu tiên vào tháng 8/2019 tại Ấn Độ, sau đó bệnh được ghi nhận tại Bangladesh vào tháng 9/2019, Đài Loan và Nepal tháng 6/2020 [2, 5, 8-10, 12, 20]. Ở Trung Quốc, ổ dịch đầu tiên được ghi nhận vào tháng 8/2019 tại khu vực Tân Cương, đặc biệt vào tháng 7/2020 tại tỉnh Quảng Tây đã ghi nhận 5 ổ dịch bệnh viêm da nổi cục (cách tỉnh Cao Bằng khoảng 200 km), tính đến ngày 13/9/2020 đã phát hiện 14 ổ dịch bệnh LSD tại nước này [5].

Theo báo cáo dịch bệnh viêm da nổi cục ở bò của Cục Thú y gửi Tổ chức Thú y thế giới, bệnh viêm da nổi cục được phát hiện vào ngày 13/10/2020 tại xã Quyết Thắng, huyện Hữu Lũng, tỉnh Lạng Sơn và được công bố lần đầu tiên tại Việt Nam vào 1/11/2020. Cho đến nay đã có 2 tỉnh (thuộc vùng Đông Bắc, tiếp giáp với Trung Quốc) công bố dịch bệnh viêm da nổi cục trên trâu bò, gồm tỉnh Lạng Sơn (ở các huyện Hữu Lũng, Chi Lăng và Vân Quan) và tỉnh Cao Bằng (ở các huyện Hạ Lang, Hòa An và Nguyên Bình) (https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=36831).

Hiện tại, Việt Nam chưa có phòng thí nghiệm nào thiết lập thành công được hệ thống phân lập virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục ở bò. Để phục vụ công tác chẩn đoán bệnh và nghiên cứu sản xuất

vaccine nhằm khống chế và kiểm soát bệnh, chúng tôi tiến hành thiết lập quy trình phân lập virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục trên trâu, bò sử dụng tế bào dòng Madin-Darby bovine kidney (MDBK).

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là dịch mũi, dịch mắt và u cục trên da bò nghi nhiễm virus LSD được thu thập tại huyện Hữu Lũng, tỉnh Lạng Sơn theo tiêu chuẩn của OIE. Mẫu bệnh phẩm được bảo quản trong môi trường MEM 1x bổ sung kháng sinh như thường quy. Bệnh phẩm là u cục được nghiền trong cối chày sứ, tạo huyền dịch 10% trong MEM 1x có bổ sung kháng sinh, bảo quản ở -70°C cho đến khi xét nghiệm.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Xác định sự có mặt của virus gây bệnh viêm da nổi cục từ mẫu bệnh phẩm thu thập tại thực địa bằng phương pháp PCR truyền thống theo hướng dẫn của OIE [6].

- Xác định sự có mặt của virus gây bệnh viêm da nổi cục từ mẫu bệnh phẩm thu thập tại thực địa bằng phương pháp realtime-PCR theo như công bố trước đây của Alexander và cs. [3].

- Thiết lập hệ thống nuôi cấy tế bào MDBK dùng trong phân lập virus gây bệnh viêm da nổi cục theo khuyến cáo của OIE [6].

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- *Phương pháp PCR truyền thống phát hiện DNA virus gây bệnh viêm da nổi cục trên bò:*

Mẫu DNA được tách từ huyền dịch bệnh phẩm 10% trong MEM 1x sử dụng kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, thu DNA trong 50 μl nước (nuclease free water).

PCR nhân gen sử dụng bộ kit GoTaq Green 2X Master Mix (Promega, Hoa Kỳ) và cặp mồi LSDV đặc hiệu theo hướng dẫn của OIE [6] cho virus LSD. Kích thước của sản phẩm PCR được khuếch đại bởi cặp mồi LSDV-F/R là 192 bp.

LSDV-F 5'-TCC-GAG-CTC-TTT-CCT-GAT-TTT-TCT-TAC-TAT-3'
LSDV-R 5'-TAT-GGT-ACC-TAA-ATT-ATA-TAC-GTA-AAT-AAC-3'

Chu trình nhiệt bao gồm 95°C trong 2 phút; 40 chu kỳ của 95°C trong 45 giây, 50°C trong 50 giây và 72°C trong 60 giây; và sau cùng 72°C trong 2 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên agarose 2% và hiển thị dưới đèn UV.

- *Phương pháp realtime-PCR xác định virus gây bệnh viêm da nổi cục trên bò:*

- Sử dụng cặp mồi và mẫu dò theo công bố trước đây của Alexander và cs. [3]; và bộ kit thương mại Master mix (Quantabio, Mỹ), cài đặt chu trình nhiệt theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Trình tự primer và probe theo như công bố trước đây của Alexander và cs. [3]:

LSDV- F1 5'-CAA AAA CAA TCG TAA CTA ATC CA -3'
LSDV-R1 5'-TGG AGT TTT TAT GTC ATC GTC -3'
Probe 5'-FAM-TCG TCG TCG TTT AAA ACT GA-BHQ1-3'

Chu trình nhiệt bao gồm 95°C trong 5 phút; 40 chu kỳ của 95°C trong 15 giây, 60°C trong 60 giây. Mẫu bệnh phẩm có giá trị C_q (Cycle of quantification) < 40 được coi là dương tính với virus LSD.

- *Phương pháp PCR truyền thống sử dụng các gen chỉ báo phát hiện DNA virus gây bệnh viêm da nổi cục:*

PCR nhân gen sử dụng bộ kit GoTaq Green 2X Master Mix (Promega, Hoa Kỳ) với cặp mồi nhân các gen chỉ báo (genetics marker) P32, RP030, ORF103 và thymidine kinase (TK) cho virus LSD. Kích thước của sản phẩm PCR lần lượt là 390 bp; 1,3Kb; 570bp và 434bp.

Bảng 1. Cặp mồi các gen chỉ báo dùng trong phản ứng PCR nhân gen

Gen	F/R	Trình tự các cặp mồi (5'-3')	Kích thước sản phẩm	Tài liệu tham khảo
P32	F	CTA AAA TTA GAG AGC TAT ACT TCT T	390bp	[7]
	R	CGA TTT CCA TAA ACT AAA GTA		
RP030	F	CTC TGT TCC AAA CTAA AT CAT	1,3Kb	[11]
	R	TTT TTG TAT TAC CAA TTT CTG		
TK	F	GCC GAT AAC ATA TAT AGA CCC	570bp	[10]
	R	GTG CTA TCT AGT GCA GCT AT		
ORF103	F	ATg TCT gAT AAA AAA TTA TCT Cg	434bp	[20]
	R	ATC CAT ACC ATC gTC gAT Ag		

Ghi chú: F: Mồi xuôi, R: Mồi ngược

Chu trình nhiệt được thực hiện theo các công bố trước đây [7, 10, 11, 20]. Sản phẩm PCR được điện di trên agarose 2% và hiển thị dưới đèn UV.

- *Phương pháp nuôi cấy tế bào MDBK và phân lập virus gây bệnh viêm da nổi cục theo khuyến cáo của OIE:*

Tế bào MDBK được nuôi cấy trong môi trường Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher, Hoa Kỳ) được bổ sung streptomycin, ampicillin (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) và huyết thanh bào thai bê 5% (FCS, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) với nồng độ tế bào cuối cùng là 1×10^6 tế bào/ml. Virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục được phân lập trên đĩa nuôi cấy tế bào 6 giếng/đĩa (Thermo Fisher, Hoa Kỳ), chứa 2 ml huyền dịch tế bào và 30 μ l huyền dịch 10% bệnh phẩm. Đĩa phân lập được nuôi cấy trong 5 ngày ở 37°C, có 5% CO₂. Thu hoạch virus LSD bằng cách đóng băng và giải đông tan. Sau đó virus được tiếp đời lần 2, 30 μ l huyền dịch tế bào-virus phân lập lần 1 được nuôi cấy trong 2ml môi trường tế bào dòng MDBK (1×10^6 tế bào/ml), nuôi cấy và thu hoạch như lần phân lập đầu tiên. Virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục tiếp đời lần 3 tương tự như lần tiếp đời thứ 2. Đĩa tế bào được nuôi trong tủ ẩm 37°C và 5% CO₂, theo dõi bệnh tích tế bào (CPE) hàng ngày trên kính hiển vi.

Mẫu bệnh phẩm phân lập được đánh giá là dương tính khi xuất hiện CPE là các cụm tế bào

co lại tạo thành các cục tế bào gồm rất nhiều tế bào chồng đống lên nhau.

Mẫu đối chứng tế bào: âm tính khi lớp tế bào MDBK mọc đều thành thảm mịn, không có tế bào chết hay co cụm.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Triệu chứng bò nghi mắc bệnh viêm da nổi cục

Việc xác định các triệu chứng lâm sàng và các tổn thương bệnh lý trên da là bước quan trọng để chẩn đoán bệnh viêm da nổi cục trên bò. Như thể hiện trong hình 1, bò nghi mắc bệnh viêm da nổi cục tại một số ổ dịch thuộc tỉnh Lạng Sơn xuất hiện các triệu chứng lâm sàng điển hình như vùng da xuất hiện các u cục, nhiều dịch mũi do viêm mũi, tiết nước bọt nhiều và hoại tử các nốt u cục trên da.

Theo OIE, triệu chứng lâm sàng điển hình của trâu, bò nhiễm virus LSD là sốt cao (có thể trên 41°C), hình thành các nốt sần có đường kính từ 2–5 cm, đặc biệt là ở da đầu, cổ, chân, bầu vú, cơ quan sinh dục, các nốt sần lớn có thể bị hoại tử và cuối cùng là xơ hóa và tồn tại trong vài tháng, để lại các vết sẹo có thể tồn tại vĩnh viễn và các mụn nước, vết hoại tử và vết loét có thể xuất hiện ở màng nhầy của miệng. Những dấu hiệu lâm sàng điển hình này cho thấy nguy cơ bò bị nhiễm virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục là rất cao [6].

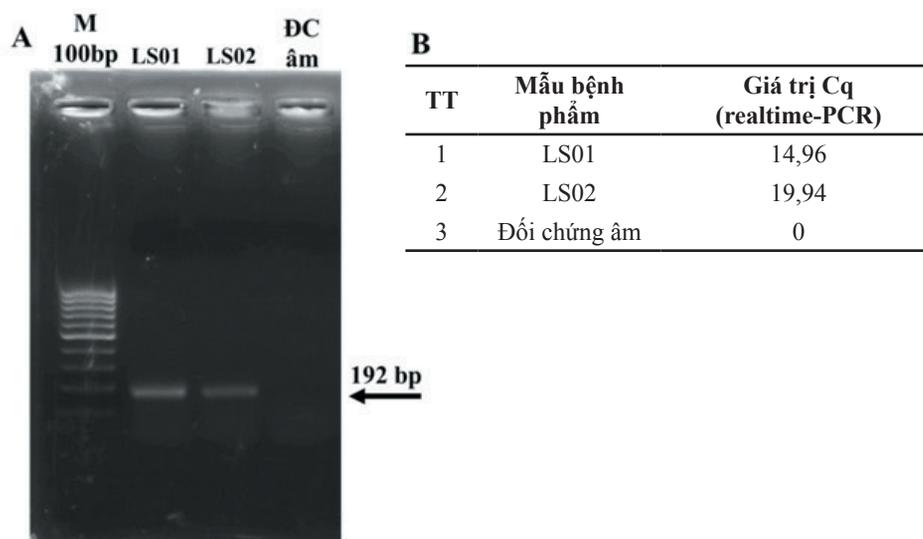


Hình 1. Triệu chứng bò nghi nhiễm virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục

3.2. Chẩn đoán phát hiện virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục bằng PCR truyền thống và realtime-PCR

Để xác định sự có mặt của virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục trong mẫu bệnh phẩm, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR truyền

thống theo hướng dẫn của OIE, sử dụng cặp mồi đặc hiệu LSDVF/R [6, 7] và phương pháp realtime-PCR được công bố bởi Alexander và cs. [3]. Kết quả chẩn đoán phát hiện virus LSD bằng PCR và realtime-PCR được trình bày ở hình 2.



Hình 2. (A) Kết quả phản ứng PCR truyền thống chẩn đoán mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục sử dụng cặp mồi theo khuyến cáo OIE [6]. M: DNA marker 100bp DNA ladder, LS01, LS02: mẫu bệnh phẩm thu thập tại thực địa của bò nghi nhiễm virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục, ĐC âm: đối chứng âm. (B) Kết quả phản ứng realtime-PCR chẩn đoán mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục sử dụng cặp mồi và mẫu dò theo công bố trước đây của Alexander và cs. [3]

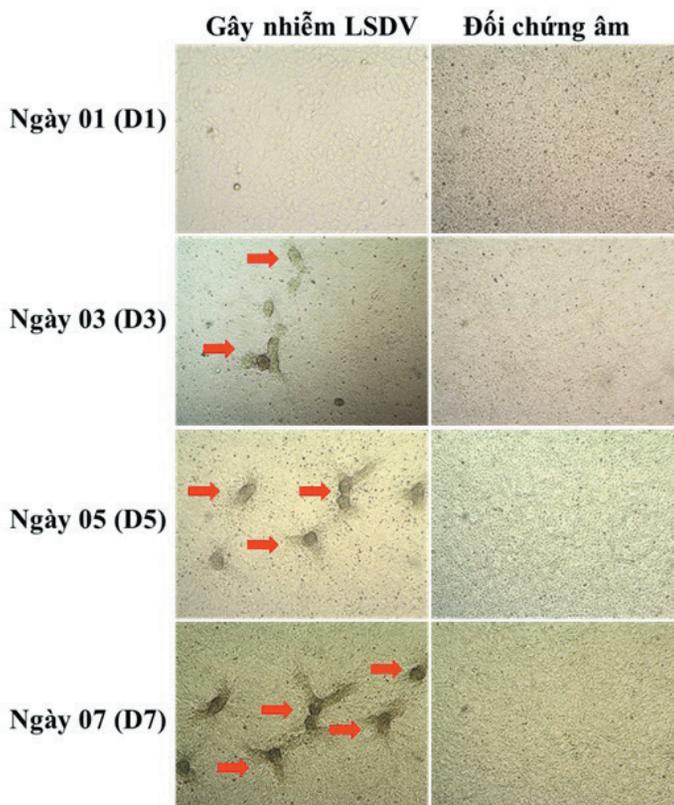
Kết quả ở hình 2A, mẫu đối chứng âm tính là mẫu máu bò không nhiễm virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục hồi cứu từ nghiên cứu trước đây có nguồn gốc từ Nghệ An (2018). Đối với 2 mẫu xét nghiệm là huyền dịch u cục nghiên cứu của bò nghi nhiễm virus LSD thì cả 2 mẫu đều xuất hiện sản phẩm PCR có kích thước khoảng 200 bp (192 bp theo thiết kế của mỗi đặc hiệu), chứng tỏ mẫu xét nghiệm có chứa DNA của virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục.

Để khẳng định lại chắc chắn mẫu bệnh phẩm chứa DNA virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục, chúng tôi tiếp tục thực hiện phản ứng realtime-PCR theo công bố trước đây của Alexander và cs. [3]. Kết quả phản ứng realtime-PCR được thể hiện qua hình 2B cho thấy đối chứng âm không có giá trị Cq, trong khi đó giá trị Cq của mẫu LS01 là 14,96 và

mẫu LS02 là 19,94; chứng tỏ cả 2 mẫu xét nghiệm có chứa DNA của virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục.

Từ các kết quả trên, chúng tôi kết luận: Bò nghi mắc bệnh viêm da nổi cục dương tính với virus LSD dựa trên các kết quả xét nghiệm PCR và realtime-PCR. Để khẳng định lại, chúng tôi tiến hành phân lập virus LSD trên tế bào dòng MDBK theo hướng dẫn của OIE. Phân lập virus là phương pháp “vàng” để khẳng định sự có mặt của virus LSD “sống” trong mẫu bệnh phẩm thực địa. Mẫu bệnh phẩm LS01 được lựa chọn để tiến hành phân lập virus LSD dựa trên giá trị Cq cao hơn so với mẫu bệnh phẩm LS02.

3.3. Phân lập virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục trên tế bào dòng Madin-Darby bovine kidney (MDBK)

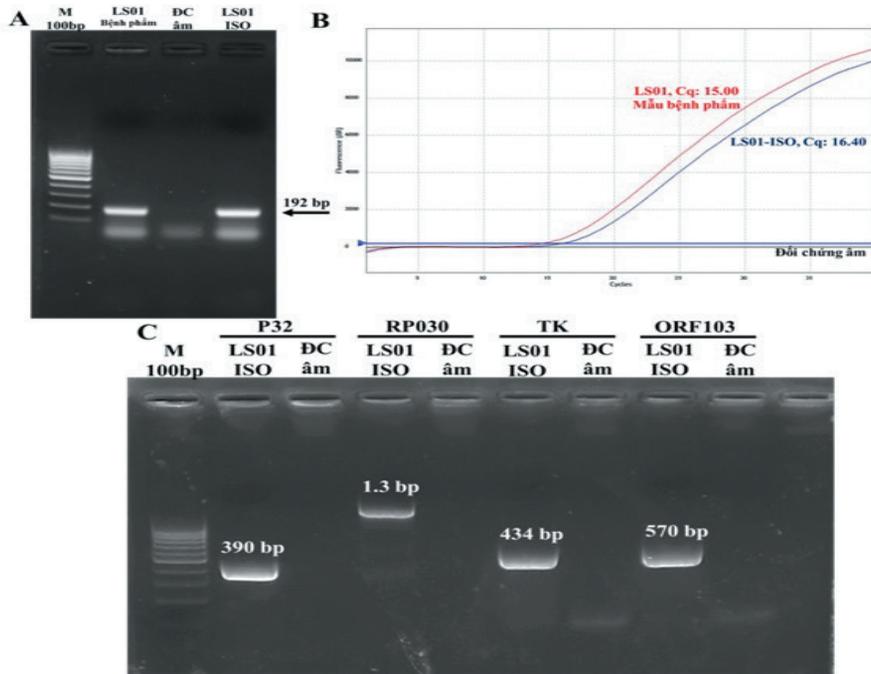


Hình 3. Kết quả phân lập virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục trên bò sử dụng tế bào MDBK (độ phóng đại 10X)

Theo khuyến cáo của OIE, virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục có thể phát triển tốt trên các loại tế bào dòng (cell lines) và các loại tế bào sơ cấp (primary cells) như lamb testis (LT), Madin - Darby bovine kidney (MDBK), bovine testis (tế bào tinh hoàn bê), hoặc một số tế bào cảm biến khác như tế bào African green monkey kidney (Vero cells), Ovine testis secondary cell line (OA3.Ts) [6]. Ngoài ra, virus LSD cũng phát triển tốt trên trứng gà có phôi 11 ngày tuổi [6]. Tùy từng loại tế bào mà biểu hiện bệnh tích (CPE) nhanh hay chậm, một số tế bào dòng hoặc xơ phôi có thể biểu hiện bệnh tích tế bào sau 2-6 ngày, một số lâu hơn kéo dài đến 14 ngày mới có bệnh tích tế bào. Thông thường nếu sau 14 ngày gây nhiễm chưa có bệnh tích tế bào, tế bào gây nhiễm sẽ được thu lại và tiếp tục tiếp đời trên tế bào lần 2. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng tế bào dòng MDBK, là dòng tế bào cảm nhiễm với virus LSD được sản xuất từ thận bê. Mẫu bệnh phẩm LS01 được sử dụng để phân lập virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục trên tế bào MDBK.

Kết quả phân lập virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục từ mẫu bệnh phẩm thực địa được thể hiện qua hình 3. Kết quả tại hình 3 cho thấy, các tế bào MDBK nhiễm virus LSD bám thành các cụm sau 3 ngày gây nhiễm (D3). Bệnh tích tế bào (CPE) tăng dần theo thời gian gây nhiễm và đến ngày thứ 7 (D7) biểu hiện nhiều và rõ ràng nhất. Ngược lại ở các giếng đối chứng không gây nhiễm (đối chứng âm), tế bào bám đáy một lớp phẳng mịn và không có tế bào chết hay co cụm.

Những giếng có kết quả CPE dương tính, chúng tôi tiến hành tách chiết DNA virus, và thực hiện kiểm tra bằng phản ứng realtime-PCR và PCR chẩn đoán theo khuyến cáo của OIE kết hợp phát hiện 4 gen chỉ báo là p32, RP030, thymidine kinase và ORF103. Kết quả kiểm tra mẫu phân lập bằng phương pháp realtime-PCR và PCR chẩn đoán theo OIE kết hợp phát hiện 4 gen chỉ báo được thể hiện qua hình 4.



Hình 4. A: Chứng virus LSD phân lập trên tế bào MDBK (LS01-ISO) được khẳng định lại bằng phương pháp PCR truyền thống theo hướng dẫn của OIE, B: Realtime-PCR theo công bố của Alexander và cs., C: 4 gen chỉ báo là p32, RP030, ORF103 và thymidine kinase.

Kết quả hình 4 cho thấy: (1) realtime-PCR xác định sự có mặt của virus LSD trong mẫu phân lập có giá trị Cq là 16,40; mẫu đối chứng âm không có giá trị Cq và mẫu đối chứng dương là DNA từ mẫu bệnh phẩm thực địa cho giá trị Cq là 15,00; (2) PCR chẩn đoán theo OIE và phát hiện 4 gen chỉ báo của virus LSD cho kích thước sản phẩm PCR lần lượt là 192 bp; 390 bp; 1,3Kb; 434bp và 570bp tương ứng với các gen p32, RP030, thymidine kinase và ORF103. Trình tự nucleotide của 4 gen chỉ báo từ mẫu phân lập LS01-ISO đã được nhóm nghiên cứu gửi lên Ngân hàng Gen (GenBank) với các mã truy cập (accession numbers) như sau: MW326768 (gen p32), MW326766 (gen RP030), MW326769 (gen TK) và MW326767 (gen ORF103). Việc giải trình tự thành công 4 gen chỉ báo có ý nghĩa đặc biệt quan trọng và là tiền đề cho những nghiên cứu sâu hơn đặc tính di truyền của các chủng virus LSD đang lưu hành tại Việt Nam.

IV. KẾT LUẬN

Từ những kết quả trên chúng tôi kết luận: Đã phân lập thành công virus LSD gây bệnh viêm da nổi cục tại Việt Nam trên tế bào dòng MDBK. Đây là nguồn virus quan trọng phục vụ cho các nghiên cứu sâu hơn về bệnh LSD và virus LSD, trong đó có nghiên cứu phát triển sản xuất vacxin trong tương lai, phục vụ công tác phòng và kiểm soát bệnh LSD tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdalla, M. A. and Gawad, S. M., 1992. Characterization of serum lysosomal enzymatic activities. II. Effect of lumpy skin disease in Egyptian cows. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 99(8), pp. 347-9.
2. Acharya, K. P. and Subedi, D., 2020. First outbreak of lumpy skin disease in Nepal. *Transbound Emerg Dis*, 2020;00:1-2.
3. Alexander, S. *et al.*, 2019. A real-time PCR screening assay for the universal detection of lumpy skin disease virus DNA. *BMC Res Notes.* 12(1), p. 371.
4. Beard, P. M., 2016. Lumpy skin disease: a direct threat to Europe. *Vet Rec.* 178(22), pp. 557-8.
5. Lu, G. *et al.*, 2020. Lumpy skin disease outbreaks in China, since 3 August 2019. *Transbound Emerg Dis.*
6. OIE, 2017. Chapter 2.4.13. Lumpy skin disease. *OIE*

Terrestrial Manual 2017.

7. Rashid, M. *et al.*, 2017. Molecular characterisation of lumpy skin disease virus and sheeppox virus based on P32 gene. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine.* 20(2), pp. 131-140.
8. Rouby, S. R. *et al.*, 2019. Capripoxviruses: Exploring the genetic relatedness between field and vaccine strains from Egypt. *Vet World.* 12(12), pp. 1924-1930.
9. Sameea Yousefi, P. *et al.*, 2017. Epidemiological study of Lumpy skin disease outbreaks in North-western Iran. *Transbound Emerg Dis.* 64(6), pp. 1782-1789.
10. Sameea Yousefi, P. *et al.*, 2018. Phylogenetic analysis of the lumpy skin disease viruses in northwest of Iran. *Trop Anim Health Prod.* 50(8), pp. 1851-1858.
11. Santhamani, R. *et al.*, 2014. Molecular characterization of Indian sheeppox and goatpox viruses based on RPO30 and GPCR genes. *Virus Genes.* 49(2), pp. 286-91.
12. Sprygin, A. *et al.*, 2018. Epidemiological characterization of lumpy skin disease outbreaks in Russia in 2016. *Transbound Emerg Dis.* 65(6), pp. 1514-1521.
13. Sprygin, A. *et al.*, 2020. Evidence of recombination of vaccine strains of lumpy skin disease virus with field strains, causing disease. *PLoS One.* 15(5), p. e0232584.
14. Tasioudi, K. E. *et al.*, 2016. Emergence of Lumpy skin disease in Greece, 2015. *Transbound Emerg Dis.* 63(3), pp. 260-5.
15. Tulman, E. R. *et al.*, 2001. Genome of lumpy skin disease virus. *J Virol.* 75(15), pp. 7122-30.
16. Tuppurainen, E. S. and Oura, C. A., 2012. Review: lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transbound Emerg Dis.* 59(1), pp. 40-8.
17. Tuppurainen, E. S. *et al.*, 2015. Lumpy skin disease: attempted propagation in tick cell lines and presence of viral DNA in field ticks collected from naturally-infected cattle. *Ticks Tick Borne Dis.* 6(2), pp. 134-40.
18. Woods, J. A., 1988. Lumpy skin disease-a review. *Trop Anim Health Prod.* 20(1), pp. 11-7.
19. Zeynalova, S. *et al.*, 2016. Epizootology and molecular diagnosis of Lumpy skin disease among livestock in Azerbaijan. *Front Microbiol.* 7, p. 1022.
20. Zhu, X. L. *et al.*, 2013. Identification and phylogenetic analysis of a sheep pox virus isolated from the Ningxia Hui autonomous region of China. *Genet Mol Res.* 12(2), pp. 1670-8.

Ngày nhận 21-12-2020

Ngày phản biện 22-1-2021

Ngày đăng 1-3-2021