

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP CANINE PARVOVIRUS Ở MỘT SỐ TỈNH PHÍA BẮC VIỆT NAM

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

TÓM TẮT

56 mẫu swab trực tràng thu thập tại các phòng khám thú y chó, mèo ở các tỉnh Thái Bình, Hà Nam, Hải Dương trong thời gian từ 8/2019 đến 2/2020 có kết quả xét nghiệm dương tính với CPV bằng phương pháp PCR đã được sử dụng để phân lập các chủng CPV trên 2 dòng tế bào CRFK và MDCK. Kết quả là đã lựa chọn được 4 chủng CPV gây bệnh tích tế bào trên môi trường tế bào CRFK, đây là dòng tế bào đặc hiệu cho sự nhân lên của CPV. Kết quả xác định các đặc tính sinh học của CPV trên dòng tế bào CRFK cho thấy bệnh tích tế bào do CPV đời thứ 7 xuất hiện ở thời điểm từ 36 giờ đến 48 giờ sau khi gây nhiễm, bệnh tích tế bào đạt cao nhất ở thời điểm 60 giờ đến 72 giờ và tế bào bị phá hủy hoàn toàn sau 84 giờ; 4 chủng virus có hiệu giá cao; dao động từ $1,69 \times 10^6$ đến $2,73 \times 10^7$ TCID₅₀/ml.

Từ khóa: Phân lập, Canine Parvovirus, tế bào CRFK.

Study on isolating Canine Parvovirus in northern provinces, Viet Nam

Trương Quang Lâm, Đào Lê Anh, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Thị Yến

SUMMARY

56 rectal swab samples collected at veterinary clinics in Thai Binh, Ha Nam, Hai Duong provinces, Viet Nam from August 2019 to February 2020 having the positive test result with CPV by PCR method was used for isolating CPV on CRFK and MDCK cell lines. As a result, 4 CPV strains causing cyto-pathogenic on CRFK cells were selected, this was the specific cell line to CPV isolation. The results of determining biological characteristics of CPV isolates on CRFK cell lines showed that cyto-pathogenic effect (CPE) caused by CPV of the 7th generation, appeared from 36 hours to 48 hours, post-infection, CPE reached the highest peak from 60 hours to 72 hours, post-infection, and the cells were totally destroyed after 84 hours, post-infection. The titers of 4 CPV strains were high, reaching from 1.69×10^6 to 2.73×10^7 TCID₅₀/ml.

Keywords: Isolation, Canine Parvovirus, CRFK cells.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh viêm ruột tiêu chảy do Canine Parvovirus (CPV) là bệnh truyền nhiễm và thường gây tử vong cao ở chó, đặc biệt chó con dưới 1 năm tuổi. Bệnh viêm ruột tiêu chảy do CPV được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1978, nhưng chỉ trong vòng hai năm sau đó đã trở thành bệnh mới ở chó trên toàn thế giới. CPV là những virus nhỏ, không vỏ, nhân lên bằng cách phân chia tế bào rất nhanh. CPV có 3 chủng: CPV 2a (phân lập 1984), 2b (phân lập 1984), 2c (phân lập 2000). Qua phân lập từ năm 1979 đến 1984, các nhà khoa học đã xác định phần lớn chó nhiễm hai chủng CPV2a và CPV2b. Hiện tại, CPV2a là chủng gây bệnh chủ yếu tại Ý và Đức, trong khi CPV2b phổ biến ở Mỹ, Đài Loan và Nhật Bản (Battilani và

cs., 2001; Martella và cs., 2004). Chủng CPV2c có sự thay đổi (Asp426Glu) trên protein VP2, đây là protein chịu trách nhiệm về tính kháng nguyên của chủng CPV2b, đã được phát hiện ở Việt Nam, Ý, Tây Ban Nha, Đức, Anh và Nam Mỹ (Nakamura và cs., 2004; Decaro và cs., 2007).

Bệnh lây trực tiếp từ chó sang chó hoặc qua phân có virus phát tán trong môi trường qua các nhân tố trung gian truyền lây: dụng cụ chăn nuôi, chuồng nuôi, chim, loài gặm nhấm, côn trùng, ruồi nhặng mang mầm bệnh gây nhiễm cho chó khỏe. Khi nhiễm virus, ở giai đoạn ủ bệnh trên 80% chó không có triệu chứng lâm sàng. Giai đoạn phát bệnh (sau 3-10 ngày nhiễm virus), chó có các dấu hiệu: mệt mỏi, ủ rũ, nôn khan ra bọt dãi nhớt, sốt và tiêu chảy thường có máu. Tại Việt

Nam, tỷ lệ nhiễm bệnh cao, khoảng 45% (Trần Ngọc Bích và cs., 2013). Chó bị nhiễm bệnh, không được điều trị kịp thời, tỷ lệ tử vong rất cao (trên 80%). Hiện nay chưa có chế phẩm sinh học hay thuốc đặc trị cho chó bị nhiễm CPV. Để phòng chống bệnh do CPV, người nuôi cần thực hiện tiêm vaccin cho chó.

Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu phân lập CPV trên môi trường tế bào MDCK (Madin darby canine kidney), tế bào dòng CRFK (J. W. Frost *et al.*, 1984; Mohan Raj J., 2010) và xác định đặc tính sinh học của CPV. Kumar và cs. (2003) đã phân lập CPV từ 25 mẫu bệnh phẩm trên môi trường tế bào dòng MDCK và kết quả cho thấy 9 mẫu có bệnh tích tế bào (Cytopathogenic effect - CPE). Trong một nghiên cứu khác, Nandi và cs. (2010) báo cáo rằng trong số 13 mẫu thu thập có 5 mẫu dương tính với CPV bằng PCR, nhưng chỉ có hai mẫu xuất hiện CPE ở môi trường tế bào dòng MDCK. Trong những nghiên cứu gần đây, có tác giả cũng sử dụng môi trường tế bào dòng này để phân lập nuôi cấy CPV cho nhiều mục đích sản xuất chế phẩm sinh học để phòng và trị bệnh (Shikun Ge., 2020).

Tại Việt Nam, những nghiên cứu về CPV gây bệnh trên chó còn rất hạn chế, cho đến thời điểm hiện tại chưa có nghiên cứu nào về phân lập các chủng CPV gây bệnh tại thực địa trên môi trường tế bào dòng. Nhận thấy sự cần thiết nghiên cứu phát triển chế phẩm điều trị và vaccin phòng bệnh do CPV trên chó từ chính các chủng virus thực địa, chúng tôi đặt vấn đề thực hiện nghiên cứu phân lập Canine Parvovirus (CPV) trên môi trường tế bào dòng nhằm lựa chọn được môi trường phân lập virus đạt hiệu quả cao; đồng thời làm rõ đặc tính sinh học của các chủng CPV gây bệnh tại thực địa trên môi trường tế bào thích hợp. Kết quả nghiên cứu sẽ góp phần làm cơ sở cho việc chọn chủng CPV có đặc tính sinh học phù hợp dùng để chế tạo kit chẩn đoán, chế tạo kháng nguyên dùng trong chẩn đoán, chế phẩm sinh học ứng dụng trong điều trị và phát triển vaccin phòng bệnh hiệu quả.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập CPV môi trường tế bào dòng MDCK và CRFK.

- Khả năng gây bệnh tích tế bào (CPE) của

CPV trên môi trường tế bào.

- Xác định hiệu giá của các chủng CPV trên môi trường tế bào.

2.2. Vật liệu

- Dụng cụ: pank, kéo, kẹp, bông cotton, sering, ống đựng mẫu, ống eppendorff, quần áo bảo hộ, khẩu trang, dao mổ, bình nuôi cấy tế bào, khay nuôi cấy tế bào 24 giếng...

- Trang thiết bị: tủ lạnh -20°C và -80°C, cân phân tích, máy spin, vortex, máy lắc ấm, máy PCR, máy điện di, máy chụp ảnh gel, tủ ấm CO₂,...

- Hoá chất sử dụng tách chiết DNA tổng số kit QIAamp (Qiagen, Đức); kit chạy phản ứng PCR Promega (M-7212). Cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu để nhân đoạn gen VP2 bao gồm mồi xuôi (Forward primer) for^c: 5'- AAAGAGAGC-CAGGAGAGGTA -3' và mồi ngược (Reverse primer) rev^c: 5'- TTCTGACAGCAGGTTGAC-CA -3', DW2, TBE, Ethidium bromide, agarose, DNA marker (Bionexus – Mỹ).

- Hóa chất phân lập virus: Dòng tế bào MDCK, CRFK, DMEM, FBS, kháng sinh, kháng nấm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thu thập mẫu

Swab trực tràng (n = 56) được lấy trong dung dịch PBS (pH = 7,2) từ chó có triệu chứng lâm sàng: sốt, tiêu chảy, nôn và được kiểm tra dương tính với CPV bằng phương pháp PCR từ các phòng khám thú y chó mèo tại tỉnh Thái Bình, Hà Nam, Hải Dương từ tháng 8 năm 2019 đến tháng 2 năm 2020.

2.3.2. Phân lập CPV

- Chuẩn bị tế bào phân lập: Tế bào dòng CRFK và MDCK được đưa vào nuôi cấy trong môi trường và điều kiện thích hợp, môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) có bổ sung 10% FBS (Fetal bovine serum) làm ấm trong tủ 37°C trong 30 phút trước tiến hành thí nghiệm. Khi tế bào mọc vừa kín đáy giếng khay 24 thì tiến hành gây nhiễm virus.

- Chuẩn bị mẫu phân lập: Mẫu swab trực tràng được vortex đồng nhất trong dung dịch PBS, ly tâm tốc độ cao, thu dịch nổi. Hỗn dịch đồng nhất qua lọc được lấy để gây nhiễm vào tế bào.

- Gây nhiễm virus và quan sát kết quả: Từ các khay 24 giếng tế bào đã chuẩn bị ở bước một hút bỏ môi trường nuôi cấy và bổ sung 100µl mẫu phân lập (MOI = 0,1) đã chuẩn bị ở bước hai vào trong thời gian 60 phút/37°C/5%CO₂ sau đó loại bỏ dung dịch và bổ sung 1ml môi trường phân lập gồm (DMEM có chứa 2% FBS, 2% kháng sinh) vào mỗi giếng và nuôi ở 37°C với 5% CO₂. Hàng ngày theo dõi sự phá hủy tế bào bằng kính hiển vi soi nổi và thu lại virus khi tế bào bị phá hủy đạt 80% - 90%. Nếu không thấy xuất hiện bệnh tích thì thu lại virus sau 96 giờ gây nhiễm và gây nhiễm lại lần nữa để kiểm tra bệnh tích.

2.3.3. Xác định hiệu giá virus

Trong nghiên cứu về đặc tính sinh học của virus, TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infective Dose) có vai trò quan trọng trong việc xác định lượng virus cần dùng để gây nhiễm tại MOI thích hợp, đảm bảo việc so sánh đặc tính sinh trưởng của các virus khác nhau một cách khách quan và chính xác.

LgTCID₅₀ là một biến số được sử dụng phổ biến để định lượng virus, là số virus cần thiết để gây ra 50% CPE (bệnh tích tế bào) cho môi trường tế bào gây nhiễm virus. Khảo nghiệm về TCID₅₀ được ứng dụng phổ biến trong các nghiên cứu lâm sàng phải xác định liều gây chết của virus. Khi sử dụng cho nuôi cấy tế bào, các tế bào được ủ với virus để virus gây nhiễm và nhân lên thêm. Sau đó, căn cứ vào tỷ lệ chết của tế bào bị nhiễm virus ở những giếng có độ pha loãng virus khác nhau mà tính ra lgTCID₅₀. Tế bào CRFK được chuẩn bị trên khay 96 giếng (2,0×10⁶ tế bào/giếng). Dịch nuôi tế bào được hút bỏ, huyền phù virus được pha loãng theo cơ số 10 đem ủ trên bề mặt tế bào một lớp của các giếng theo thứ tự đánh dấu trước (25µl/giếng), mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần. Sau 1 giờ ủ, dung dịch duy trì DMEM có chứa 2% FBS được bổ sung vào (100µl/giếng), CPE được quan sát hàng ngày cho đến ngày thứ 4 sau khi gây nhiễm. TCID₅₀ được xác định theo phương pháp của Reed-Muench.

2.3.4. Phản ứng PCR

Tách chiết DNA tổng số theo quy trình của bộ kit Qiagen (Dneasy Blood&Tissue Kit-69506.250).

Phản ứng PCR: Mẫu DNA sau khi tách chiết sẽ được tiến hành phản ứng PCR theo bộ kit nêu ở phần vật liệu.

Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR như sau: 94°C-2 phút, 35 chu kỳ (94°C - 40 giây, 57°C - 40 giây, 72°C - 50 giây), 72°C - 5 phút và cuối cùng giữ sản phẩm ở 4°C.

Đọc kết quả PCR: Sản phẩm PCR được điện di trên bản thạch 1,2% trong dung dịch đệm TBE 1x trong thời gian 35 phút ở hiệu điện thế 100V. Đọc kết quả điện di bằng tia UV ở bước sóng 254nm.

2.3.5. Giải trình tự gen và xây dựng cây sinh học phân tử

Sản phẩm phản ứng PCR được tinh sạch bằng bộ kit QIAquick Extraction (Qiagen, Đức), chạy phản ứng PCR sequence, sau đó giải trình tự trực tiếp sản phẩm phản ứng PCR sequence trên máy giải trình tự gen tự động CEQ-8000 (Beckman coulter, Mỹ). Dữ liệu trình tự gen thu được từ máy giải trình tự gen được xử lý bằng phần mềm MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 10). Cây sinh học phân tử được xây dựng bằng phần mềm MEGA, sử dụng phương pháp test Maximum likelihood với giá trị bootstrap là 1.000 đơn vị. Các chủng CPV tham chiếu sử dụng để xây dựng cây sinh học phân tử được thu thập từ dữ liệu trên Ngân hàng Gen (NCBI).

2.3.6. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm GraphPad Prism 6.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập CPV trên môi trường tế bào dòng MDCK và CRFK

Để lựa chọn môi trường tế bào phân lập CPV thích hợp, nghiên cứu đã sử dụng hai môi trường tế bào là MDCK và CRFK. Kết quả phân lập CPV trên hai môi trường này thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân lập CPV trên hai môi trường tế bào MDCK và CRFK

Môi trường phân lập	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu có bệnh tích tế bào	Tỷ lệ (%)	Kết quả PCR kiểm tra sự có mặt CPV	Kết quả PCR kiểm tra sự có mặt virus khác
MDCK	56	7	12,50	7/7 mẫu dương tính	2/7 mẫu dương tính
CRFK	56	4	7,14	4/4 mẫu dương tính	4/4 mẫu âm tính

Bảng 1 cho thấy, gây nhiễm 56 mẫu kiểm tra CPV thu thập từ các tỉnh Thái Bình, Hà Nam, Hải Dương vào 2 môi trường tế bào CRFK và MDCK đều có mẫu xuất hiện bệnh tích tế bào, chứng tỏ CPV đều có thể phát triển trên hai dòng tế bào dòng MDCK và CRFK. Trên môi trường MDCK, số mẫu virus nhân lên và gây bệnh tích tế bào (7/56 mẫu kiểm tra; chiếm tỷ lệ 12,5%) cao hơn so với trên môi trường CRFK (4/56 mẫu kiểm tra; chiếm tỷ lệ 7,14%).

Tuy nhiên, khi kiểm tra lại bằng phản ứng PCR thì thấy chỉ có mặt duy nhất CPV trong môi trường tế bào CRFK, còn trong môi trường tế bào MDCK ngoài sự có mặt của CPV thì còn phát hiện của virus khác (Coronavirus) trong 2 mẫu phân lập. Điều này cho thấy môi trường MDCK phù hợp với sự nhân lên của nhiều loại virus khác, nguy cơ tạp nhiễm vào môi trường nuôi cấy cao, do đó không phù hợp để phân lập CPV.

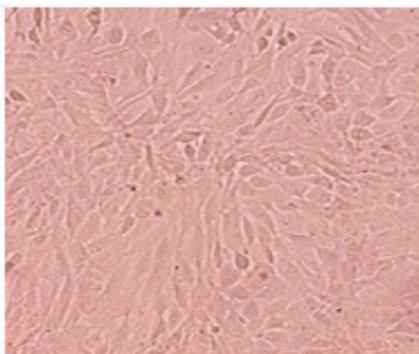
Theo một số nghiên cứu trước đây, CPV khó phân lập trên môi trường tế bào đơn lớp. Sự nhân lên của CPV phụ thuộc vào tế bào chủ và diễn ra trong các tế bào pha S, pha phân chia tại DNA

polymerase của tế bào (Berns, K., 1990; Tattersall, P., 1972). Mohan Raj và cs. (2010) đã sàng lọc 77 mẫu thu thập và báo cáo 51 mẫu dương tính với CPV bằng phương pháp PCR nhưng chỉ có 16 mẫu CPV cho bệnh tích tế bào khi phân lập trên môi trường tế bào dòng CRFK. Những nghiên cứu phân lập CPV trên môi trường tại châu Á rất hạn chế, nghiên cứu này của chúng tôi lần đầu tiên được công bố.

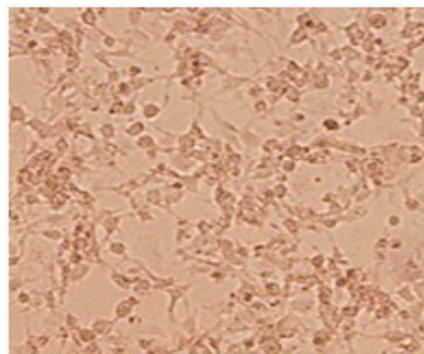
Dòng tế bào CRFK phù hợp cho sự nhân lên và là dòng tế bào đặc hiệu cho việc phân lập CPV. Chính vì vậy, chúng tôi lựa chọn dòng tế bào CRFK cho nghiên cứu đặc tính sinh học của các chủng CPV. Mẫu dương tính với CPV được gây nhiễm vào tế bào CRFK, sau đó quan sát bệnh tích trong vòng 96h. Kết quả tại đời gây nhiễm thứ nhất không thấy xuất hiện bệnh tích tế bào. Hình ảnh tế bào sau gây nhiễm ở đời thứ nhất được thể hiện ở hình 1. Gây nhiễm đời thứ hai vào khay tế bào CRFK và quan sát bệnh tích trong vòng 96h. Kết quả sau khi gây nhiễm đời thứ 2 có 4 mẫu virus đã gây bệnh tích tế bào. Thông tin 4 chủng virus CPV thu được ở đời thứ hai được trình bày tại bảng 2.

Bảng 2. Thông tin các chủng Canine Parvovirus

STT	Ký hiệu mẫu	Giống chó	Tháng tuổi	Tính biệt	Địa điểm thu thập	Ký hiệu chủng virus
1	TB017	Berger lai	5	Cái	Thái Bình	VNUA CPV TB017
2	HD005	Poodle	4	Đực	Hải Dương	VNUA CPV HD005
3	HD101	Vàng	4	Đực	Hải Dương	VNUA CPV HD101
4	HD119	Poodle	9	Đực	Hải Dương	VNUA CPV HD119

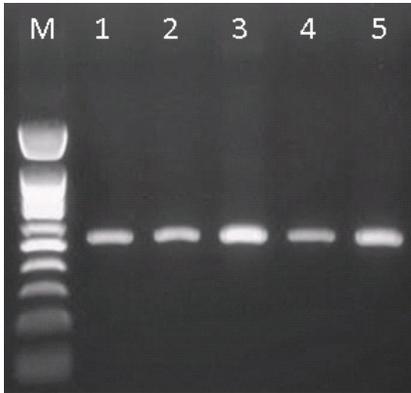


Hình 1. Tế bào dòng CRFK bình thường



Hình 2. Bệnh tích tế bào do CPV gây ra trên môi trường tế bào dòng CRFK

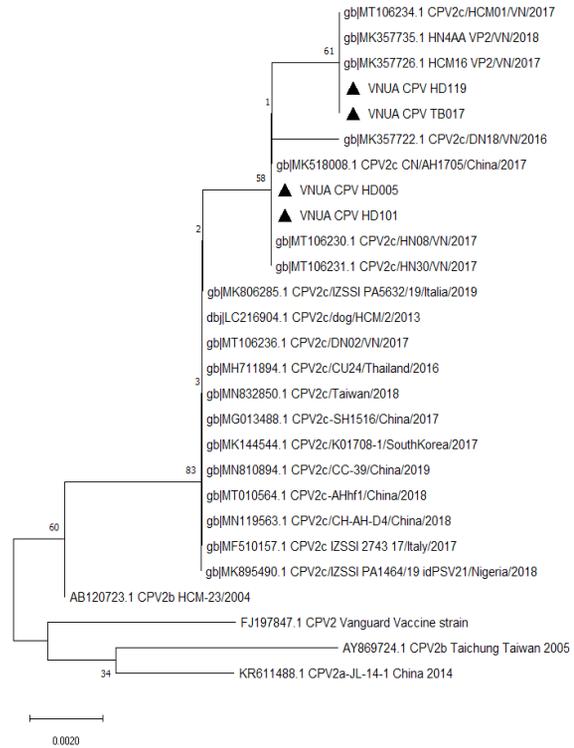
Cả 4 chủng virus đều gây bệnh tích trên tế bào CRFK với bệnh tích đặc trưng ở thể rounding: tế bào co tròn, bong ra khỏi đáy chai và nổi lên trên. Sau khi thu được 4 chủng virus Parvo gây bệnh tích tế bào đặc trưng trên môi trường tế bào CRFK và sau đó dịch virus ở đời thứ 3 được lựa chọn để kiểm tra sự có mặt của virus Parvo. Dịch virus được thu lại và kiểm tra bằng phương pháp PCR một lần nữa để giám định lại sự phát triển và nhân lên của virus và khẳng định sự biến đổi của tế bào CRFK quan sát được là do virus Parvo gây nên, mà không phải do nguyên nhân khác như sai sót trong khâu chuẩn bị, hoặc bệnh tích được gây ra bởi 1 virus khác. Như vậy có thể khẳng định bệnh tích trên tế bào CRFK và virus phân lập được là CPV.



Hình 3. Kết quả chạy điện di sản phẩm PCR

Các chủng CPV được phát hiện bằng phản ứng PCR với độ dài của gen là 583 bp; giếng M: 100 bp DNA Marker; giếng 1-4: Chủng virus phân lập; giếng 5: Đối chứng dương CPV vacxin

Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR tương ứng với một phần đoạn gen VP2 của các chủng phân lập CPV cho thấy các chủng phân lập VNUA CPV TB017, VNUA CPV HD005, VNUA CPV HD101 và VNUA CPV HD119 thuộc genotype CPV2c, và tương đồng 100% nucleotide với các chủng CPV2c được công bố trước đây tại Việt Nam (2013-2017), Trung Quốc năm 2017 (CN/AH1705 strain) và các chủng tham chiếu trên thế giới (hình 4).



Hình 4. Cây phả hệ của các chủng CPV trong nghiên cứu này và các chủng tham chiếu dựa trên phân tích chuỗi nucleotide đoạn gen VP2

Ký hiệu (▲) chỉ các mẫu trong nghiên cứu này.

3.2. Khả năng gây bệnh tích tế bào của CPV

Để xác định khả năng gây bệnh tích tế bào (CPE) của CPV, nghiên cứu tiến hành cấy truyền đời 4 chủng virus đến đời P#7. Thời điểm thu virus khi bệnh tích tế bào đạt 80-90%. Kết quả theo dõi khả năng gây bệnh tích tế bào của các chủng CPV được trình bày ở bảng 3.

Số liệu bảng 3 chỉ ra rằng CPV bắt đầu gây bệnh tích tế bào từ 36 đến 48 giờ sau khi gây nhiễm và phá hủy hoàn toàn tế bào sau 72 đến 84 giờ. Bệnh tích tế bào do CPV trên tế bào CRFK với bệnh tích đặc trưng ở thể rounding: tế bào co tròn, bong ra khỏi đáy chai và nổi lên trên. Tuy nhiên thời gian phá hủy tế bào sớm hay muộn tùy thuộc vào từng chủng virus, điều này phụ thuộc vào khả năng gây bệnh tích của từng chủng virus khác nhau. Bên cạnh đó công tác lấy mẫu được chuẩn bị và tiến hành tốt cũng có ý nghĩa quan trọng trong việc giữ cho virus sống sót và bảo toàn độc lực, ngược lại

thu thập và bảo quản mẫu không đúng quy trình sẽ làm virus giảm độc lực hoặc chết, điều này ảnh hưởng trực tiếp tới việc phân lập giữ giống virus.

Sau 36h gây nhiễm, 2 chủng virus VNUA – CPV HD005 và VNUA – CPV HD119 xuất hiện bệnh tích tế bào (10% tế bào bị phá hủy so với tổng diện tích

bề mặt nuôi cấy), sau 84h tế bào đã bị phá hủy gần như hoàn toàn. Trong khi đó, 2 chủng virus VNUA – CPV HD017 và VNUA – CPV HD101 xuất hiện bệnh tích tế bào sau 48h gây nhiễm (10% tế bào bị phá hủy so với tổng diện tích bề mặt nuôi cấy), sau 84h gây nhiễm thì 100% tế bào bị phá hủy so với tổng diện tích bề mặt nuôi cấy.

Bảng 3. Kết quả xác định khả năng gây bệnh tích tế bào của các chủng CPV
(tính theo % diện tích tế bào bị phá hủy so với tổng số diện tích đáy bình nuôi cấy)

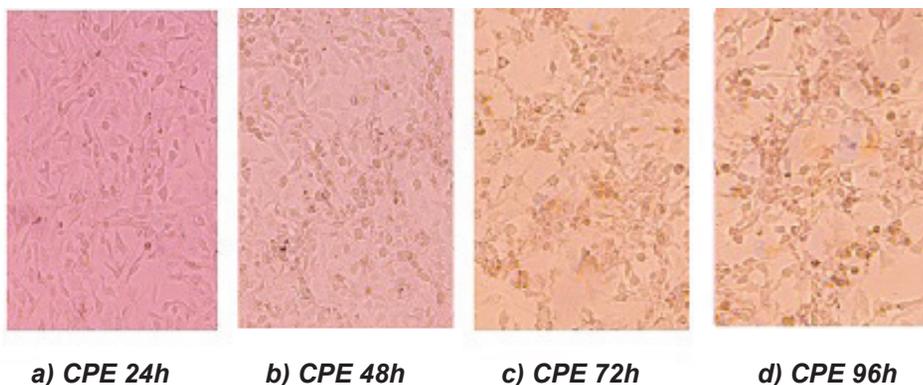
Chủng virus	CPE theo thời gian sau khi gây nhiễm virus (%)						
	24hpi	36hpi	48hpi	60hpi	72hpi	84hpi	96hpi
VNUA CPV TB017	-	*	20	50	80	100	B
VNUA CPV HD005	-	10	50	70	90	B	
VNUA CPV HD101	-	*	30	50	80	100	B
VNUA CPV HD119	-	10	40	65	85	B	

*: CPE dưới 5%

10%: số % 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

hpi: hour post inoculation (giờ sau gây nhiễm virus)



Hình 5. Hình ảnh bệnh tích tế bào do CPV gây ra trên tế bào CRFK tại các thời điểm khác nhau

Tại thời điểm 72h sau gây nhiễm, bệnh tích tế bào của tất cả 4 chủng virus đều đạt cao nhất, 80-90% tế bào bị phá hủy so với tổng diện tích bề mặt nuôi cấy. Kết quả này khẳng định thời điểm thu hoạch virus thích hợp nhất là 72h sau gây nhiễm.

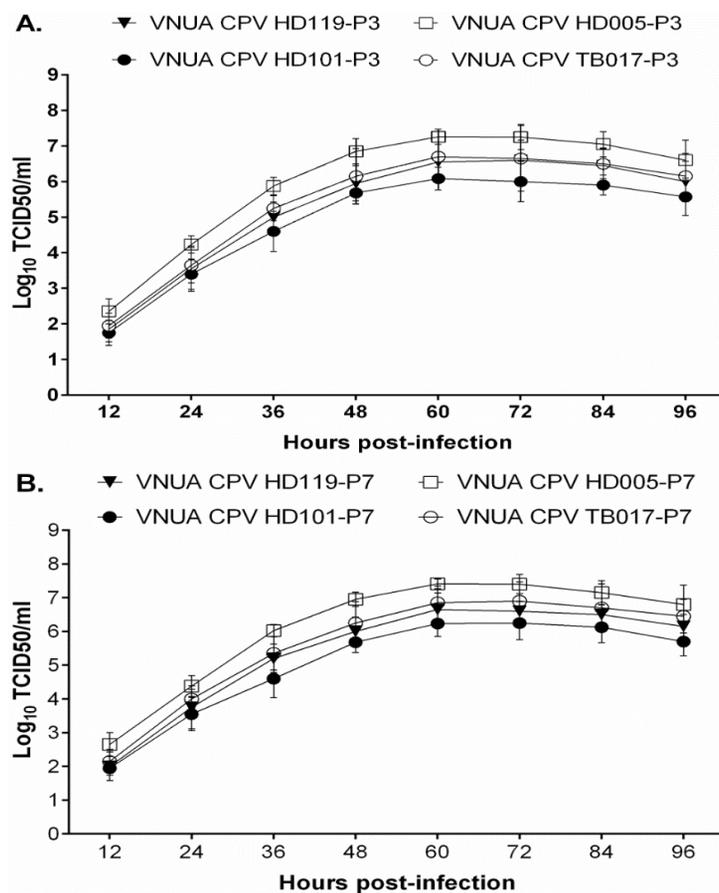
Bệnh tích tế bào co tròn và thoái hóa là những thay đổi tế bào, những thay đổi quan sát được sau 72 giờ lây nhiễm tại đời P#3 là đặc điểm của CPV trên dòng tế bào CRFK (Desario C., 2005). Trong nghiên cứu của S. Parthiban và cs. (2011), 3 mẫu

(16,66%) trong tổng số 18 mẫu CPV thu thập tại Ấn Độ cũng cho thấy bệnh tích tế bào ở dạng co tròn, tăng độ hạt và các tế bào tách rời nhau ở thời điểm 3-4 ngày sau gây nhiễm tại đời cấy chuyển thứ ba. Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi cho kết quả phân lập CPV trên môi trường tế bào CRFK tương tự với nhiều nghiên cứu khác trên thế giới.

3.3. Kết quả hiệu giá của các chủng CPV nghiên cứu

Bốn chủng phân lập CPV ở tỉnh Thái Bình và Hải Dương được cấy chuyển 7 đời và xác định

hiệu giá virus, kết quả xác định hiệu giá TCID₅₀ được trình bày ở hình 6.



Hình 6. Đồ thị sinh trưởng của các chủng CPV2 phân lập ở đời cấy chuyển 3 (A) và 7 (B)

Hình 6 cho thấy sự tương đồng về quy luật sinh trưởng ở đời cấy chuyển P3 và P7 của các chủng phân lập CPV2c. Các chủng virus cả ở đời P3 và P7 đều có hiệu giá TCID₅₀ tăng dần từ 12 h - 48 h sau gây nhiễm và đạt mức cao nhất ở thời điểm 60 h - 72 h sau gây nhiễm. Ở đời cấy chuyển P7, hiệu giá virus cao nhất được xác định là chủng VNUA CPV HD005 với $2,73 \times 10^7$ TCID₅₀/ml, tiếp theo là chủng VNUA CPV HD119 với $8,32 \times 10^6$ TCID₅₀/ml, VNUA CPV TB017 với $5,87 \times 10^6$ TCID₅₀/ml, và hiệu giá thấp nhất là chủng VNUA CPV HD101 với $1,69 \times 10^6$ TCID₅₀/ml. Như vậy, các chủng CPV đều có hiệu giá tương đối cao, có khả năng phát triển và nhân lên tốt trên môi trường tế bào CRFK. Hiệu giá chung của 4 chủng CPV dao động từ $1,69 \times 10^6$ đến $2,73 \times 10^7$ TCID₅₀/ml. S. Parthiban và cs. (2011), phân lập thành công 3 chủng CPV thu thập tại phía

Nam, Ấn Độ. Tác giả tính toán hiệu giá virus theo đơn vị HA, hiệu giá tại đời passage thứ 3 là $1:2^8$, $1:2^{11}$ and $1:2^6$ HA (S. Parthiban và cs., 2011).

Những thông tin về phân lập thành công CPV trong nghiên cứu này lần đầu được công bố tại Việt Nam. Việc phân lập được CPV sẽ là tiền đề quan trọng để phát triển bộ sinh phẩm chẩn đoán và phát triển vaccin. Ngoài ra, việc phân lập CPV sẽ biết được đặc tính sinh học, độc lực của chúng như thế nào để góp phần trong công tác phòng và điều trị chó nhiễm CPV.

IV. KẾT LUẬN

Phân lập thành công 4 chủng CPV trên dòng tế bào CRFK, đây là dòng tế bào phù hợp với nuôi cấy virus CPV gây bệnh tại 3 tỉnh phía Bắc Việt

Nam. Kết quả đời thứ 2 có 4 mẫu virus đã gây bệnh tích tế bào. Khi gây nhiễm virus Parvo từ đời thứ 5 đến thứ 7, thấy virus gây bệnh tích tế bào từ 36 giờ đến 48 giờ sau khi gây nhiễm và phá hủy hoàn toàn tế bào sau 72 giờ đến 84 giờ. Kết quả 4 chủng virus Parvo có hiệu giá cao ($6,67 \times 10^5$ - $3,16 \times 10^7$ TCID₅₀/25 μ l), chứng tỏ virus Parvo có khả năng phát triển và nhân lên tốt trên môi trường tế bào CRFK.

Lời cảm ơn: Bài báo này được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài: “Nghiên cứu chế tạo kháng huyết thanh để điều trị bệnh viêm ruột tiêu chảy do Canine parvo virus gây ra trên chó” do dự án WordBank tài trợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Berns, K.I., 1990. Parvoviridae and their replication. *Virology*, 2: 1743-1763.
- Buonavoglia, D., Cavalli, A., Pratelli, A., Martella, V., Greco, G., Tempesta, M., & Buonavoglia, C., 2000. Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. *The new microbiologica*, 23(1), 93-96.
- Desario C, Decaro N, Campolo M, Cavalli A, Cirone F, Gabriella E, Martella V, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia C, 2005. Canine parvovirus infection: which diagnostic test for the virus. *J Virol Methods* 126:179–185
- J. W. Frost, G. Klünker, 1984. The use of tissue culture for routine diagnosis of Canine Parvovirus infection. *Zentralbl Veterinarmed B*. 31(8):623-6
- Mohan Raj, J., Mukhopadhyay, H.K., Thanissal, J., Antony P.X. and Pillai R.M., 2010. Isolation, molecular characterization and phylogenetic analysis of *Canine parvovirus*. *Infect. Genet. Evol.*, 10(8): 1237-1241.
- Nandi, S., Anbazhagan, R. and Kumar, M., 2010. Molecular characterisation and nucleotide sequence analysis of *Canine Parvovirus* strains in vaccines in India. *Vet. Ital.*, 46(1):69-81.
- Hoelzer, K., Shackelton, L.A., Holmes, E.C. and Parrish, C.R., 2008. Within-host genetic diversity of endemic and emerging parvoviruses of dogs and cats. *J. Virol.*, 82(22): 11096-11105.
- Kumar, M., Chidri, S. and Nandi, S., 2011. A sensitive method to detect canine parvoviral DNA in faecal samples by nested polymerase chain reaction. *Indian J. Biotechnol.*, 10: 183-187.
- Kumar P, Garg SK, Gupta PK, 2003. Detection of canine parvovirus DNA by polymerase chain reaction. *Indian J Anim Sci.*;73:573-575.
- Mochizuki M., Ohshima T, Une Y., 2008. Recombination between vaccine and field strains of canine parvovirus is revealed by isolation of virus in canine and feline cell cultures. *J Vet Med Sci.*;70(12):1305-1314.
- Mochizuki, M., San Gabriel, M.C., Nakatani, H. and Yoshida, M., 1993. Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of *Canine parvoviruses* in faecal specimens. *Res. Vet. Sci.*, 55: 60-63.
- Panneer D, Mukhopadhyay HK, Antony PX., 2009. Isolation and antigenic typing of canine parvovirus. *J Interacad.*;13:178-183.
- Parthiban S., D. Panneer, Hirak Kumar Mukhopadhyay, P. X. Antony, R. M. Pillai, 2011. Isolation and Typing of Canine Parvovirus in CRFK Cell Line in Puducherry, South India. *Indian J Microbiol* 51(4):456–460.
- Rai A, Gupta AA, Raut U, 2004. Isolation of canine parvovirus in CRFK cell line. *Indian J Comp Microbiol Immunol Inf Dis.*; 25:51-52.
- Schunck, B., Kraft, W. and Truyen, U., 1995. A simple touchdown polymerase chain reaction for detection of *Canine Parvovirus* and feline panleukopenia virus in faeces. *J. Virol. Methods*, 55:427-432.
- Shikun Ge, Long Xu, Ben Li, Fagang Zhong, Xiang Liu, and Xiaoying Zhang, 2020. Canine Parvovirus is diagnosed and neutralized by chicken IgY-scFv generated against the virus capsid protein. *Veterinary Research* 51:110.
- Tattersall, P., 1972. Replication of parvovirus minute virus of mice. Dependence of virus multiplication and plaque formation on cell growth. *J. Virol.*, 10: 586-590.
- Trần Ngọc Bích, Trần Thị Thảo, Nguyễn Thị Yến Mai và Nguyễn Quốc Việt, 2013. Khảo sát tỷ lệ bệnh do parvo trên chó từ 1 đến 6 tháng tuổi ở thành phố Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. Số 28, trang 15-20.

Ngày nhận 20-12-2020

Ngày phản biện 5-1-2021

Ngày đăng 1-6-2021