

XÁC ĐỊNH ĐỘC LỰC CỦA VIRUS GÂY BỆNH TIÊU CHẢY CẤP TRÊN LỢN CHỨNG KTY-PED01 ĐƯỢC PHÂN LẬP TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM

*Trương Quang Lâm, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Hữu Nam,
Nguyễn Thị Ngọc, Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Thị Yên, Ngô Thị Hạnh
Khoa Thú y, Học Viện Nông nghiệp Việt Nam*

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu độc lực của chủng virus KTY-PED01 trên lợn 5 ngày tuổi. Lợn thí nghiệm âm tính với kháng thể kháng virus PED được gây nhiễm chủng virus KTY-PED01 với liều 2 ml/con qua đường uống với hiệu giá $2 \times 10^3 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Sau gây nhiễm, lợn thí nghiệm được theo dõi về triệu chứng lâm sàng và các tổn thương đại thể và vi thể ở một số cơ quan trong 15 ngày kể từ ngày gây nhiễm. Kết quả nghiên cứu triệu chứng lâm sàng đã chỉ ra rằng lợn sau gây nhiễm có triệu chứng sốt, nôn mửa, mất nước, gầy còm và đặc biệt là tiêu chảy phân lỏng, màu vàng. Kết quả xét nghiệm mẫu phân lợn bằng kỹ thuật RT-PCR cho thấy sự hiện diện của chủng virus KTY-PED01 trong phân sau 1 ngày gây nhiễm. Tổn thương đại thể chủ yếu ở lợn được gây nhiễm với chủng virus KTY-PED01 là ruột non căng phồng, thành ruột mỏng, xuất huyết, bên trong ruột chứa dịch lỏng màu vàng. Dạ dày căng phồng, chứa thức ăn không tiêu. Các hạch lympho có biểu hiện sưng, xuất huyết. Bệnh tích vi thể cho thấy sự bong tróc, đứt nát các lông nhung ruột, sự xuất huyết, thâm nhiễm tế bào viêm, hạch lympho xuất huyết.

Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng virus KTY-PED01 có khả năng gây bệnh cho lợn thí nghiệm với biểu hiện về triệu chứng lâm sàng, biến đổi bệnh tích đại thể và vi thể giống với lợn mắc chủng virus PED độc lực cao gây bệnh tự nhiên được ghi nhận tại miền Bắc Việt Nam.

Từ khóa: Chủng virus KTY-PED01, độc lực.

Determination of virulence of KTY-PED01 virus strain isolated in the North, Viet Nam

*Trương Quang Lâm, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Hữu Nam,
Nguyễn Thị Ngọc, Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Thị Yên, Ngô Thị Hạnh*

SUMMARY

In this study, we investigated the virulence of KTY-PED01 virus strain in the piglet at 5-days old. The experimental pigs (negative with PEDV antibody) were infected with PED virus strain. Each experimental pig was orally inoculated with a dose: 2 ml of $2 \times 10^3 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ (2ml/pig). After inoculation, the experimental pigs were recorded for the clinical signs, gross and histological lesions of some tissues in 15 days post inoculation. The studied results demonstrated that the infected pigs with PED virus strain presented the clinical signs and symptoms of fever, vomiting, dehydration, rough hair, thin flanks and diarrhea. The result of testing fecal samples through RT-PCR technique indicated that the KTY-PED01 virus strain was presented in the feces of the infected pigs at 1 day post inoculation. The gross lesions were consistently observed, including intestine inflammation, hemorrhage, thin wall and bloating stomach, containing undigested food, and kidneys with spotting hemorrhage, lung inflammation. The lymph nodes were characterized by swelling and hemorrhage of the pigs infected with KTY-PED01 virus strain. The histological lesions included villous atrophy and lymphocytic inflammation in the intestine, hemorrhage, inflammatory cell infiltration, haemorrhagic lymph nodes. The results of our study showed that the KTY-PED01 virus strain is capable in causing severe disease in pigs with clinical signs, symptoms, gross lesions and histological lesions were similar to those of highly pathogenic PED virus strain identified previously in the North, Viet Nam.

Keywords: KTY-PED01 virus strain, virulence.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh tiêu chảy cấp trên lợn do virus PED (Porcine Epidemic Diarrhea Virus) thuộc giống Coronavirus, họ Coronaviridae bùng phát đầu tiên tại Bỉ và Anh năm 1971 (Oldham J, 1972), sau đó nhanh chóng lây lan và xảy ra phổ biến ở các quốc gia châu Âu khác như Đức, Pháp, Hà Lan... và ở châu Á như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Thái Lan với tỷ lệ chết lên đến 50 - 90% ở lợn con nhỏ hơn 2- 3 tuần tuổi (Chen *et al.*, 2014; Song và Park, 2012). Năm 2013, dịch PED bùng phát tại Mỹ (Stevenson *et al.*, 2013), gây thiệt hại trên 7 triệu lợn trong năm đầu tiên có dịch (Cima, 2014). Đây là bệnh truyền nhiễm, lây lan nhanh, gây thiệt hại lớn với đặc điểm xảy ra trên lợn ở tất cả các lứa tuổi với triệu chứng lâm sàng chủ yếu gồm: chán ăn, nôn và tiêu chảy. Tỷ lệ lây lan và tử vong ở lợn con dưới 7 ngày tuổi rất cao, có thể lên tới 100% bởi tiêu chảy và mất nước nặng.

Ở Việt Nam, bệnh tiêu chảy cấp ở lợn lần đầu tiên được phát hiện vào năm 2008 tại tỉnh Đồng Nai (Toan *et al.*, 2011) và báo cáo tại miền Bắc lần đầu tiên vào năm 2012 (Nguyễn Văn Điệp, 2012). Theo các nghiên cứu đã công bố, bệnh tiêu chảy cấp xảy ra trên lợn mọi lứa tuổi. Bệnh nhanh chóng lan rộng, gây ảnh hưởng lớn đến kinh tế chăn nuôi lợn do làm tăng tỷ lệ bệnh, tỷ lệ chết cao, đặc biệt trên lợn con theo mẹ từ 50 - 100%. Hiện nay, việc điều trị cho đàn lợn bị mắc PED gặp rất nhiều khó khăn do chưa có chế phẩm điều trị đặc hiệu; để ngăn chặn và tiến tới không chế dịch bệnh thì việc dùng vaccin từ chính chủng virus phân lập tại Việt Nam cho đàn lợn được xem là giải pháp tối ưu. Các nghiên cứu trước đó tại Viện Thú y, Trung tâm chẩn đoán Thú y Trung ương, và phòng thí nghiệm trọng điểm CNSH thú y - Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã xác định được các ca nhiễm PED trên lợn ở phía Bắc Việt Nam, tuy nhiên cho tới nay chưa có bất kỳ công bố rộng rãi nào về khả năng gây bệnh của chủng virus PED phân lập. Để phục vụ cho công tác sản xuất vaccin thì việc xác định khả năng gây bệnh của chủng virus PED phân lập là việc làm rất cần thiết. Do

đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài “*Xác định độc lực của virus gây bệnh tiêu chảy cấp trên lợn chủng virus KTY-PED01 được phân lập tại miền Bắc Việt Nam*”.

II. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

Xác định được khả năng gây bệnh của chủng virus KTY-PED01 trên lợn con theo mẹ.

Xác định triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đại thể, bệnh tích vi thể của lợn con theo mẹ được gây nhiễm thực nghiệm bằng chủng virus KTY-PED01.

2.2. Nguyên vật liệu

Động vật: Nghiên cứu được tiến hành trên 2 lô lợn: lô thí nghiệm (5 lợn: TN1, TN2, TN3, TN4, TN5) và lô đối chứng (5 lợn: ĐC1, ĐC2, ĐC3, ĐC4, ĐC5), tất cả là lợn con theo mẹ (4 - 5 ngày tuổi) thuộc giống Yorkshire. Trước khi tiến hành gây nhiễm, toàn bộ lợn thí nghiệm được lấy máu kiểm tra kháng thể kháng PEDV bằng phương pháp ELISA và kiểm tra virus PED bằng phương pháp RT-PCR. Lợn được chọn làm thí nghiệm phải có kết quả âm tính với kháng thể kháng virus PED, âm tính với virus PED và một số virus khác như: TGE, Rotavirus, Circo virus type 2 (PCV2), hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS), dịch tả lợn (CSF) và Porcine Deltacoronavirus (PDCoV).

Chủng giống virus KTY-PED01 được phân lập từ ruột non của lợn con theo mẹ có triệu chứng lâm sàng và bệnh tích điển hình của lợn mắc PED ở tỉnh Hưng Yên năm 2017. Hiệu giá của chủng virus KTY- PED01 đạt 10^7 TCID₅₀/ml. Chủng virus đang được lưu giữ và bảo quản tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ sinh học Thú y, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp RT-PCR

Bao gồm các bước tách chiết RNA của virus

và các bước thực hiện kỹ thuật RT-PCR. RNA của virus được tách chiết bằng kit QIAamp của hãng Qiagen (Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng RT-PCR được thực hiện theo quy trình của bộ kit.

Cặp mồi được sử dụng là: Cặp mồi PM1 (mồi xuôi: 5' CCC CAG TAC TGT TAT TGA CGT ATA AAC 3', mồi ngược: 5' GTT TAG ACT AAA TGA AGC ACT TTC 3') (Song *et al.*, 2006), cặp mồi này cho phép xác định một phần thuộc đoạn gen M của virus PED có kích thước 751 bp. Tiến hành khuếch đại sản phẩm trong máy PCR với chu kỳ nhiệt: 50°C: 30 phút, 95°C: 2 phút; 35 chu kỳ (95°C: 30 giây, 53°C: 60 giây, 72°C: 1 phút); 72°C: 10 phút, 4°C: kết thúc. Điện di kiểm tra kết quả RT-PCR ở hiệu điện thế 100 V trong 30 phút. Quan sát và chụp ảnh kết quả điện di sản phẩm RT-PCR trên máy chụp ảnh gel.

2.3.2. Gây bệnh thực nghiệm

Bố trí thí nghiệm: Lợn thí nghiệm được chia thành 2 lô: Lô thí nghiệm (Lô TN) gồm 5 lợn (ký hiệu từ TN1 đến TN5) và lô đối chứng 5 lợn (ký hiệu ĐC1 đến ĐC5).

Thí nghiệm: Khu thí nghiệm được đảm bảo có độ an toàn sinh học cấp II: Vệ sinh sạch sẽ, thường xuyên phun thuốc sát trùng và vô trùng, các dụng cụ sử dụng đúng quy định, có màng lọc không khí ngăn chặn mầm bệnh từ bên ngoài vào và từ phòng gây nhiễm sang phòng đối chứng. Nhiệt độ phòng duy trì ở 30 - 32°C, độ ẩm không quá 90%, lợn được cho ăn 3 bữa/ngày (sáng, trưa, tối) theo khẩu phần của lợn con theo mẹ.

Gây nhiễm cho lợn: Nhóm lợn thí nghiệm được gây nhiễm chủng virus KTY-PED01 qua đường uống bằng syringe với liều 2 ml/con, hiệu giá 2×10^3 TCID₅₀/ml.

Theo dõi lợn sau khi gây nhiễm: thể trạng, tình hình sức khỏe, tình trạng ăn uống bằng quan sát và ghi chép hàng ngày. Theo dõi thân nhiệt của lợn thí nghiệm bằng cách đo bằng nhiệt kế ở hậu môn của lợn 2 lần/ngày vào 9 giờ và 17

giờ. Tiến hành lấy mẫu phân hàng ngày (ngày 1 đến ngày 15 sau gây nhiễm) để kiểm tra sự có mặt của virus trong cơ thể lợn thí nghiệm. Mẫu phân được bảo quản lạnh trong thùng đá và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong ngày.

2.3.3. Xác định bệnh tích đại thể và vi thể

Quy trình mổ khám: Lợn được mổ khám theo tiêu chuẩn TCVN 8402:2010 (Bộ Khoa học và công nghệ, 2010).

Lợn thí nghiệm sẽ được mổ khám khi chết trong quá trình theo dõi hoặc khi kết thúc theo dõi (15 ngày), ghi chép, chụp ảnh để thu thập thông tin về bệnh tích đại thể. Các mẫu cơ quan từ những lợn mổ khám như dạ dày, ruột non, ruột già, hạch lympho, gan, phổi, thận... sẽ cố định trong formol 10% để làm tiêu bản xác định biến đổi vi thể.

Làm tiêu bản vi thể: Bệnh phẩm được cố định bằng formol 10%, đúc parafin bằng hệ thống chuyên đúc mô tự động STP 120. Tiêu bản được cắt ở độ dày 2 - 7 μ m, sau đó nhuộm bằng phương pháp HE (Haematoxylin Eosin).

2.3.4. Phương pháp nuôi cấy tế bào Vero

Môi trường đầy đủ DMEM có 10% FBS được làm ấm trong tủ ấm 37°C trong 30 phút trước khi lấy tế bào ra nuôi cấy. Giải đông tế bào ở nhiệt độ phòng. Ly tâm 3000 vòng/5 phút để loại bỏ dung dịch bảo quản và giữ lại cặn tế bào. Hòa tan cặn tế bào trong 1ml môi trường đã chuẩn bị ở trên. Chuyển tế bào vào bình nuôi cấy chứa 5ml môi trường đầy đủ. Giữ tế bào ở 37°C với 5% CO₂, hàng ngày theo dõi sự phát triển của tế bào. Cây chuyển tế bào khi tế bào mọc một lớp ở bình nuôi cấy.

2.2.5. Phương pháp phân lập virus

Bước một, chuẩn bị tế bào phân lập: Tế bào Vero 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) nuôi tế bào ở 37°C với 5% CO₂, khi tế bào mọc vừa kín đáy bình thì tiến hành gây nhiễm virus.

Bước hai, chuẩn bị mẫu phân lập: Mẫu bệnh phẩm là ruột non của lợn được gây nhiễm PED được xử lý theo quy trình sau: ruột nghiền bằng chày cối vô trùng pha loãng trong DMEM theo tỷ lệ 1:5, phá vỡ tế bào bằng máy phát sóng siêu âm, ly tâm 10.000 vòng/10 phút/4°C loại bỏ cặn, xử lý kháng sinh rồi lọc qua màng lọc 0,22 μm , sau đó gây nhiễm lên môi trường tế bào Vero.

Bước ba, gây nhiễm virus và quan sát kết quả: Từ các tế bào đã chuẩn bị ở bước một, hút bỏ môi trường nuôi cấy và bổ sung 100 μl mẫu phân lập đã chuẩn bị ở bước hai, ủ trong thời gian 60 phút ở 37°C, sau đó bổ sung 5 ml môi trường phân lập gồm (DMEM có chứa tryptose phosphate Broth (0,3%), dịch chiết nấm men (0,02%), và trypsin để ở 37°C với 5% CO_2). Hàng ngày theo dõi sự phá hủy tế bào bằng kính hiển vi soi ngược. Nếu xuất hiện bệnh tích tế bào thì thu lại virus khi tế bào bị phá hủy đạt 80% - 90% diện tích đáy của bình nuôi. Nếu 5 ngày không thấy xuất hiện bệnh tích thì thu lại tế bào và môi trường nuôi cấy, đông tan 3 lần và tiếp tục cấy chuyển cho đến khi xuất hiện bệnh tích tế bào. Nếu cấy chuyển 9 lần liên tiếp mà không thấy xuất hiện bệnh tích tế bào thì coi như âm tính phân lập.

2.3.6. Xử lý số liệu

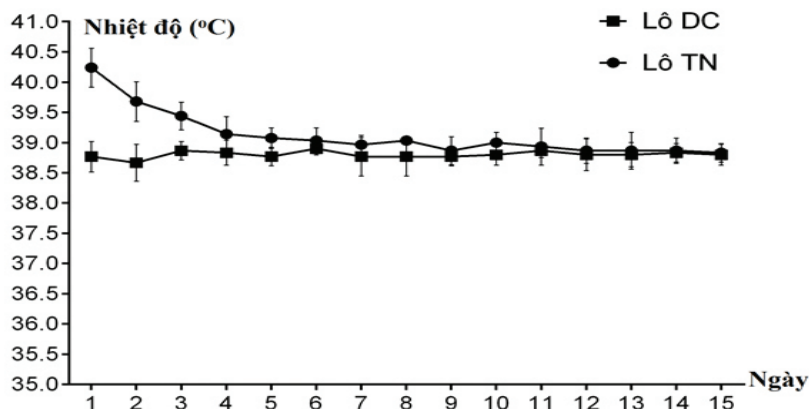
Số liệu được xử lý bằng phần mềm GraphPad Prism version 7.03.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả triệu chứng lâm sàng chủ yếu của lợn được gây nhiễm

3.1.1. Thân nhiệt của lợn được gây bệnh thực nghiệm với chủng KTY-PED01

Sau khi gây bệnh, chúng tôi tiến hành đo thân nhiệt hằng ngày của lợn vào thời điểm cố định là 9 giờ và 17 giờ. Sau đó ghi chép lại, xử lý số liệu qua phần mềm và được thể hiện ở hình 1. Lợn sốt nếu thân nhiệt lớn hơn 39,5°C. Qua hình 1 thể hiện nhiệt độ trung bình của lợn ở lô thí nghiệm và lô đối chứng, có thể thấy lợn thí nghiệm đều có biểu hiện sốt trên 40°C sau 1 ngày gây nhiễm và thân nhiệt vẫn giữ ở mức sốt trên 39,5°C nhưng có xu hướng giảm dần trong 3 ngày đầu sau gây nhiễm. Từ ngày thứ 4 đến ngày 15 sau gây nhiễm, thân nhiệt của tất cả các lợn thí nghiệm đều dao động ở mức sinh lý bình thường. Ngày thứ 5 sau gây nhiễm, có 1 lợn (TN2) ở lô thí nghiệm bị chết và ngày thứ 6 có 1 lợn thí nghiệm (TN4) bị chết, các lợn bị chết khi thân nhiệt ở mức nhiệt sinh lý bình thường khoảng 39,2°C. Lợn có hiện tượng sốt là do virus tấn công vào cơ thể, phá hủy tế bào và sản sinh các chất độc, kích thích vào trung khu điều hoà nhiệt, làm rối loạn trung khu điều hoà nhiệt, gây hiện tượng sốt cao, kèm theo đó là hiện tượng mệt mỏi, giảm ăn hoặc bỏ ăn. Lợn đối chứng có thân nhiệt dao động trong phạm vi sinh lý bình thường.



Hình 1. Thân nhiệt trung bình của lợn sau khi gây bệnh thực nghiệm với chủng virus KTY-PED01 (°C)

3.1.2. Triệu chứng lâm sàng chủ yếu của lợn được gây nhiễm với chủng virus KTY-PED01

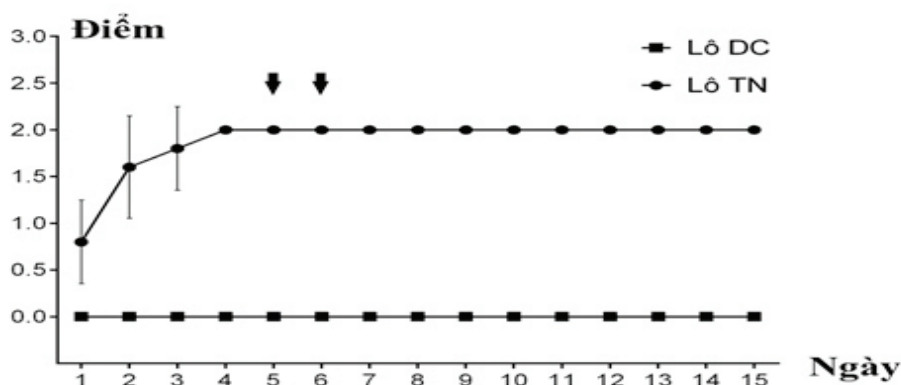
Lợn thí nghiệm và lợn đối chứng đều được theo dõi triệu chứng lâm sàng trong vòng 15 ngày, kết quả theo dõi được ghi chép lại theo từng ngày. Kết quả cho thấy các lợn ở lô thí nghiệm đều có biểu hiện triệu chứng ủ rũ, nôn, tiêu chảy, mất nước của lợn mắc virus PED. Ở lô thí nghiệm trong thời gian nghiên cứu có 2 lợn chết vào ngày thứ 5 và ngày thứ 6 sau gây nhiễm, chiếm tỷ lệ 40% tổng số động vật ở lô thí nghiệm. Triệu chứng lâm sàng chủ yếu của lợn được gây nhiễm với chủng virus KTY-PED01 là: Sốt trong 3 ngày đầu tiên sau gây nhiễm, ủ rũ, mệt mỏi, bỏ ăn, nôn, tiêu chảy phân lỏng vàng, da khô, lông xơ xác, phân vàng dính bết vào hậu môn, gầy còm. Mức độ nặng nhẹ của các triệu chứng gần như giống nhau ở các lợn thí nghiệm. Riêng triệu chứng da khô, lông xơ xác, mất trung sâu, bụng hóp, gầy còm được quan sát thấy sau 5 ngày gây nhiễm, do lợn tiêu chảy liên tục dẫn đến hiện tượng mất nước và chất điện giải nên cơ thể bị suy kiệt. Trong khi đó lợn đối chứng vẫn ăn uống và khỏe mạnh bình thường.

Trong nghiên cứu gây bệnh thực nghiệm 4 chủng IN19338/2013, NC35140/2013, NC49469/2013 và

IL2097/2014 cho lợn con theo mẹ 5 ngày tuổi, tác giả Chen *et al.* (2016) đã mô tả một số triệu chứng của lợn được gây nhiễm các chủng virus trên như sau:

Ở các lô lợn được gây nhiễm chủng IN19338/2013, NC35140/2013 và NC49469/2013 đều có hiện tượng ủ rũ, tiêu chảy, bỏ ăn, mất nước, các triệu chứng này nghiêm trọng nhất khoảng 4 ngày sau gây nhiễm và kéo dài đến hết thời gian theo dõi. Kết quả nghiên cứu triệu chứng lâm sàng của chúng tôi tương tự với kết quả nghiên cứu triệu chứng lâm sàng của tác giả Chen *et al.* (2016) khi tiến hành gây nhiễm 3 chủng virus trên, nhưng khác với kết quả lâm sàng của lợn thí nghiệm được gây nhiễm chủng IL2097/2014. Chủng virus này chỉ gây ra những triệu chứng có biểu hiện nhẹ trong khoảng 1-2 ngày sau gây nhiễm trên lợn thí nghiệm: chỉ có 1 lợn thí nghiệm bị tiêu chảy nhẹ ở ngày đầu tiên sau gây nhiễm, lợn không mất tính thèm ăn, không bị mất nước và lợn phục hồi sau 4 ngày gây nhiễm IL2097/2014.

Nhóm nghiên cứu tập trung trình bày một số triệu chứng chính của lợn được gây nhiễm chủng KTY-PED01 như: tiêu chảy, nôn bằng phương pháp chấm điểm. Kết quả được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Biểu đồ thể hiện giá trị điểm trung bình triệu chứng tiêu chảy của lợn được gây nhiễm với chủng virus KTY-PED01

Ghi chú: 0: Không tiêu chảy; 1: Tiêu chảy ít (dạng phân mềm, lỏng); 2: Tiêu chảy mạnh (phân dạng nước)

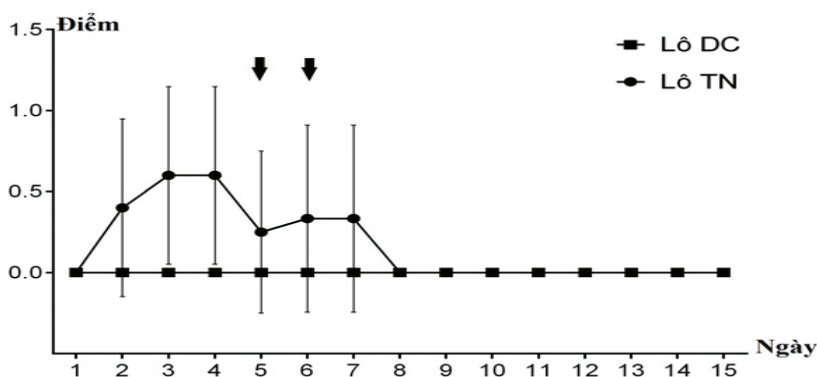
Ngày thứ 5: Lợn TN2 chết; ngày thứ 6: Lợn TN4 chết.

Kết quả cho thấy ở lô thí nghiệm, lợn xuất hiện triệu chứng tiêu chảy vào ngày đầu tiên sau gây nhiễm với mức độ nhẹ, chiếm khoảng 80% số động vật thí nghiệm. Mức độ tiêu chảy tăng dần từ ngày thứ 2 sau gây nhiễm, tất cả các lợn đều tiêu chảy, trong đó có 60% số lợn có biểu hiện tiêu chảy mạnh ở mức 2 điểm và 40% lợn tiêu chảy nhẹ ở mức 1 điểm, xu hướng tiêu chảy tiếp tục tăng cho đến ngày thứ 4, tất cả các lợn ở lô thí nghiệm đều tiêu chảy mạnh ở mức 2 điểm và giữ ở mức này cho đến hết thời gian theo dõi thí nghiệm (15 ngày). Khi so sánh về thời gian xuất hiện triệu chứng tiêu chảy và mức độ tiêu chảy thì kết quả của chúng tôi tương tự với kết quả nghiên cứu 3 chủng IN19338/2013, NC35140/2013, NC49469/2013 của Chen *et*

al. (2016) và kết quả của Chang *et al.* (2017) khi gây nhiễm chủng PEDVPT-P5 cho lợn 5 tuần tuổi. Tuy nhiên, có sự khác biệt về thời gian kéo dài của triệu chứng tiêu chảy giữa chủng KTY-PED01 và các chủng này. Chủng IN19338/2013 gây triệu chứng tiêu chảy trong 7 ngày, chủng NC35140/2013 sau 7 ngày gây nhiễm chỉ gây tiêu chảy ở mức nhẹ, riêng chủng NC49469/2013 sau 7 ngày gây nhiễm vẫn gây tiêu chảy ở mức độ mạnh. Đối với nghiên cứu của Chang *et al.* (2017), mức độ tiêu chảy giảm dần sau 9 ngày gây nhiễm PEDVPT-P5.

Ở lô lợn đối chứng, không có bất kỳ lợn nào có biểu hiện tiêu chảy.

Bên cạnh triệu chứng tiêu chảy, triệu chứng nôn cũng được quan sát thấy ở các lợn trong lô thí nghiệm. Kết quả được thể hiện ở hình 3.



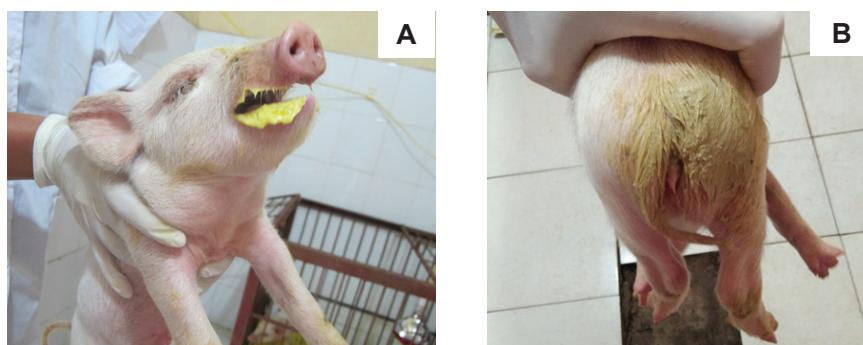
Hình 3. Biểu đồ thể hiện giá trị điểm trung bình triệu chứng nôn của lợn được gây nhiễm với chủng virus KTY-PED01

Ghi chú: 1 điểm: có nôn; 0 điểm: không nôn

Kết quả cho thấy ở lô thí nghiệm lợn được gây nhiễm chủng virus KTY-PED01 có biểu hiện nôn vào ngày thứ 2 sau gây nhiễm, chiếm khoảng 40% số lợn thí nghiệm, trình trạng nôn mạnh nhất được quan sát vào ngày thứ 3 và thứ 4 sau gây nhiễm khi có 3/5 lợn có biểu hiện (chiếm 60%), sau đó mức độ triệu chứng nôn giảm dần ở lợn thí nghiệm, từ ngày thứ 8

đến hết thời gian thí nghiệm, không ghi nhận thêm lợn có biểu hiện nôn. Ở lô đối chứng, không quan sát thấy triệu chứng nôn ở bất kỳ lợn nào.

Kết quả này của chúng tôi khác với kết quả của Chen *et al.* (2016) khi nghiên cứu độc lực của 4 chủng phân lập tại Mỹ, không quan sát thấy triệu chứng nôn ở lợn thí nghiệm.

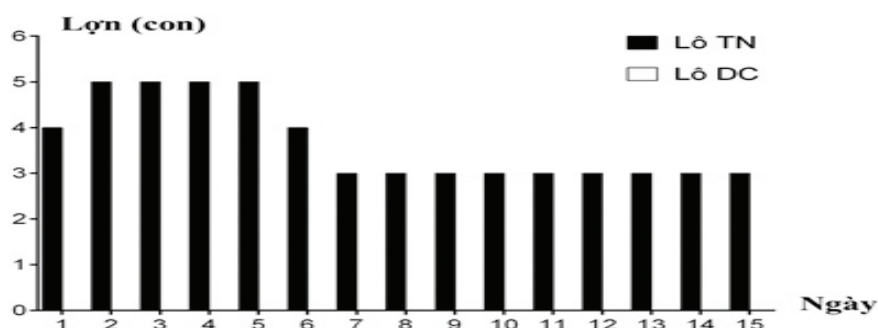


Hình 4. Triệu chứng lâm sàng ở lợn thí nghiệm. (A) Triệu chứng nôn. (B) Lợn tiêu chảy

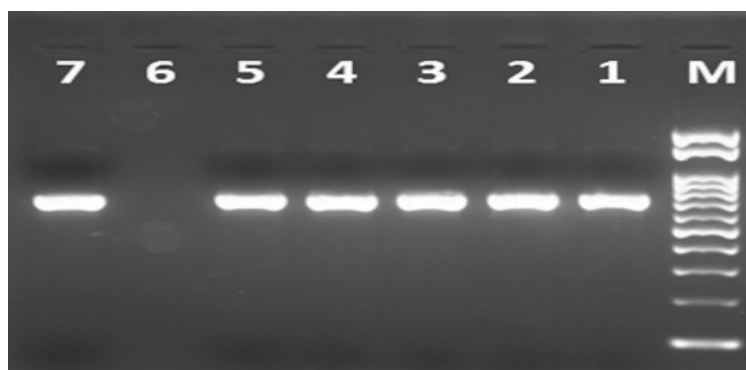
3.2. Kết quả kiểm tra sự bài thải của virus PED qua phân lợn thí nghiệm

Lợn thí nghiệm sau khi được gây nhiễm chủng virus KTY-PED01 có biểu hiện tiêu chảy sẽ được

lấy mẫu và kiểm tra bằng phương pháp RT-PCR để kiểm tra sự có mặt của virus PED và một số virus gây tiêu chảy khác như: Rotavirus, TGEV, CSFV, PDCoV. Kết quả được trình bày ở hình 5 và hình 6.



Hình 5. Kết quả xác định lợn dương tính với virus PED sau 15 ngày gây nhiễm



Hình 6. Kết quả phản ứng RT-PCR với mỗi khuếch đại một phần gen M sau 3 ngày gây nhiễm chủng virus KTY-PED01

Ghi chú: Thang chuẩn M 100 bp; giếng từ 1 - 5 là mẫu phân của 5 lợn gây nhiễm chủng KTY-PED01 sau 3 ngày, giếng 6 là đối chứng âm (nước tinh khiết không chứa RNA và DNA); giếng 7 là đối chứng dương (RNA của vaccin PED). Với kích thước vạch DNA là 715 bp.

Qua kết quả RT-PCR, chúng tôi thấy 4/5 lợn ở lô thí nghiệm được gây nhiễm chủng virus KTY-PED01 phát hiện được virus PED trong mẫu phân vào ngày thứ 1 sau gây nhiễm (chiếm 80%). Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu độc lực của 3 chủng virus PED nguyên gốc US phân lập tại Mỹ của Chen *et al.* (2016) và kết quả của Chang *et al.* (2017) khi nghiên cứu độc lực của chủng PEDVPT-P5. Từ ngày thứ 2 sau gây nhiễm đến hết thời gian nghiên cứu ghi nhận thấy tất cả lợn trong lô thí nghiệm đều dương tính với virus PED trong mẫu phân tiêu chảy, đạt 100%. Do đến ngày thứ 5 sau gây nhiễm có 1 lợn (TN2) ở lô thí nghiệm bị chết và ngày thứ 6 sau gây nhiễm có 1 lợn (TN4) chết, những lợn này đều được mổ khám kiểm tra bệnh tích đại thể, kiểm tra virus bằng phương pháp RT-PCR. Kết quả phân lập và RT-PCR đều dương tính với virus PED, và âm tính với các virus gây tiêu chảy khác (Rotavirus, TGEV, CSFV, PDoV), chứng tỏ lợn thí nghiệm bị chết

đều do virus PED gây ra. Từ ngày thứ 7 cho đến hết thời gian thí nghiệm, không ghi nhận thêm ca lợn thí nghiệm nào bị chết, kết luận số lợn chết chiếm 40% tổng số lợn thí nghiệm. Ở lô đối chứng, 5/5 lợn đều khỏe mạnh, không có biểu hiện triệu chứng của lợn mắc PED và kết quả RT-PCR đều âm tính với virus PED, điều này chứng tỏ nhóm nghiên cứu đã gây nhiễm thành công virus PED cho lợn thí nghiệm.

3.3. Nghiên cứu biến đổi bệnh lý của lợn thực nghiệm

3.3.1. Kết quả bệnh tích đại thể của lợn được gây nhiễm chủng virus KTY-PED01

Sau khi gây nhiễm virus KTY-PED01, các lợn bị chết sẽ được mổ khám ngay để quan sát bệnh tích và những lợn còn lại cũng được mổ khám ở ngày 15 (sau khi kết thúc thí nghiệm) để quan sát, ghi chép lại bệnh tích đại thể. Bệnh tích đại thể trên các cơ quan của lợn thí nghiệm được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Bệnh tích đại thể của lợn được gây nhiễm chủng virus KTY-PED01

	Bệnh tích tại một số cơ quan				
	Ruột căng phồng, thành mỏng, chứa dịch vàng. Xuất huyết	Dạ dày căng, chứa thức ăn không tiêu	Hạch lâm ba sưng to, xuất huyết, bầm tím	Phổi viêm	Cơ quan khác Thận sưng, xuất huyết; lách sưng
Lô TN (con)	5/5	5/5	5/5	1/5	2/5
Lô ĐC (con)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

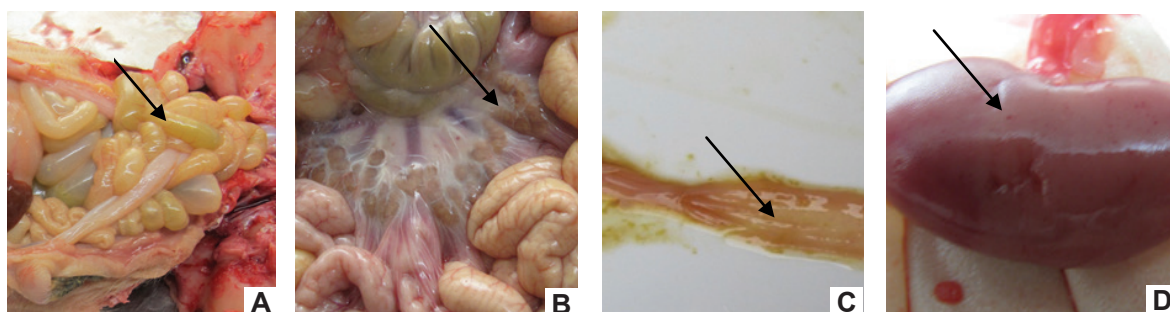
Kết quả cho thấy, lợn được gây nhiễm chủng virus KTY-PED01 có các bệnh tích chủ yếu như: ruột non căng phồng, thành ruột mỏng, có thể nhìn thấy được bên trong. Chất chứa trong ruột là dịch lỏng màu vàng, lợn cợn. Ống đường chấp căng, màu đỏ, nổi rất rõ. Bộc lộ niêm mạc phía trong ruột thấy có hiện tượng xuất huyết lan tràn. Dạ dày căng phồng, chứa thức ăn không tiêu, xuất huyết. Hầu hết các hạch đều sưng, đặc biệt là hạch màng treo ruột sưng rất lớn, và có hiện tượng xuất huyết. Đây là bệnh tích điển hình nhất của lợn được gây nhiễm

chủng virus KTY-PED01. Ngoài ra còn có các bệnh tích khác như phổi sung huyết nhẹ, thận xuất huyết điểm, lách sưng, gan sung huyết, mật căng. Đây là những bệnh tích không đặc trưng vì không phải mổ khám lợn nào cũng thấy xuất hiện. Không quan sát thấy bệnh tích đại thể bất thường nào ở lô lợn đối chứng.

Như vậy cho thấy trên lợn mà chúng tôi nghiên cứu đều cho kết quả bệnh tích đại thể phù hợp với các nghiên cứu của các tác giả Nguyễn Văn Điệp và Nguyễn Thị Lan (2013), lợn mắc PED có tổn thương đại thể giống với lợn mắc

TGE: dạ dày trống rỗng do lợn nôn, ống dưỡng chấp không chứa nhiều dịch dưỡng do sự kém hấp thu ở ruột. Các đoạn ruột non chứa đầy dịch, căng phồng, thành ruột mỏng

tới mức có thể nhìn thấy bên trong do sự teo lại của tầng niêm mạc, chất chứa bên trong ruột lợn cợn, hạch màng treo ruột sưng to thành dải rõ rệt.



Hình 7. Bệnh tích đại thể của lợn thí nghiệm được gây nhiễm virus PED

(A) Dạ dày, ruột căng, thành mỏng. (B) Hạch màng treo ruột sưng.
(C) Thành ruột mỏng, xuất huyết. (D) Thận xuất huyết điểm

3.3.2. Kết quả bệnh tích vi thể của lợn được gây nhiễm chủng virus KTY-PED01

Chúng tôi nhận thấy rằng bệnh tích vi thể

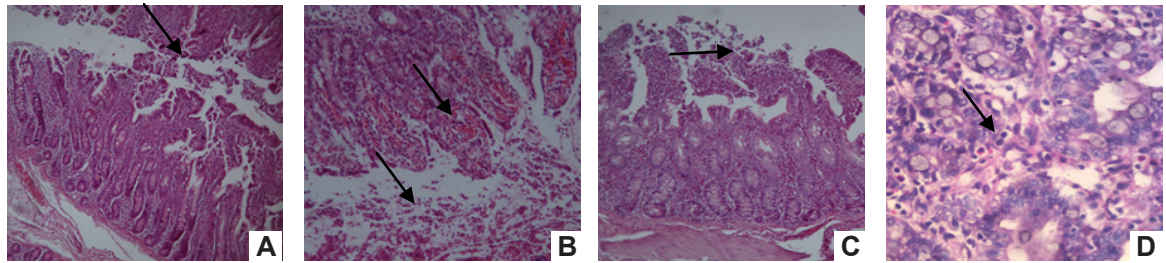
chủ yếu nhất của cả 5 lợn là những biến đổi ở dạ dày, ruột và hạch lympho. Cụ thể được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Bệnh tích vi thể của lợn được gây nhiễm chủng virus KTY-PED01

	Bệnh tích tại một số cơ quan				
	Ruột Niêm mạc bong tróc. Lông nhung đứt nát. Thâm nhiễm tế bào viêm. Xuất huyết	Dạ dày Biểu mô bị đứt nát. Xuất huyết	Hạch lympho Các nang lympho thoái hóa. Hồng cầu lan tràn. Thâm nhiễm tế bào viêm	Phổi Thâm nhiễm các tế bào viêm	Cơ quan khác Thận, lách thâm nhiễm tế bào viêm, xuất huyết
Lô TN (con)	5/5	5/5	5/5	2/5	3/5
Lô ĐC (con)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Kết quả cho thấy, bệnh tích vi thể chủ yếu của 5 lợn thí nghiệm là: Hiện tượng xuất huyết, bong tróc, đứt nát lông nhung ruột và niêm mạc dạ dày, thâm nhiễm tế bào viêm ở các cơ quan với tỷ lệ cao. Ngoài ra còn thấy hoại tử tế bào và thoái hóa tế bào. Trong đó có 5/5 mẫu ruột đều có các tổn thương như: Niêm mạc bong tróc, lông nhung đứt nát và thâm nhiễm các tế bào

viêm, sung huyết, xuất huyết. Dạ dày ở cả 5 mẫu nghiên cứu đều có biểu hiện bong tróc niêm mạc, xuất huyết và sung huyết. Hạch lympho có biểu hiện chủ yếu là xuất huyết và thoái hóa các nang lympho. Phổi trong các mẫu nghiên cứu chủ yếu có biểu hiện xuất huyết, tăng sinh tổ chức kẽ, thâm nhiễm tế bào viêm. Các bệnh tích này đều không xuất hiện ở lô đối chứng.



Hình 8. Bệnh tích vi thể của lợn thí nghiệm được gây nhiễm virus PED
 (A) Biểu mô ruột đứt nát (HEx10). (B) Ruột non sung huyết, xuất huyết (HEx10).
 (C) Biểu mô dạ dày đứt nát (HEx10). (D) Thâm nhiễm tế bào viêm ở ruột (HEx40)

3.4. Kết quả phân lập lại chủng virus KTY-PED01 trên môi trường tế bào vero

Sau khi mổ khám tất cả lợn ở lô thí nghiệm,

chúng tôi tiến hành thu mẫu và phân lập lại chủng virus KTY-PED01 trên môi trường tế bào Vero. Kết quả thể hiện ở bảng 3.

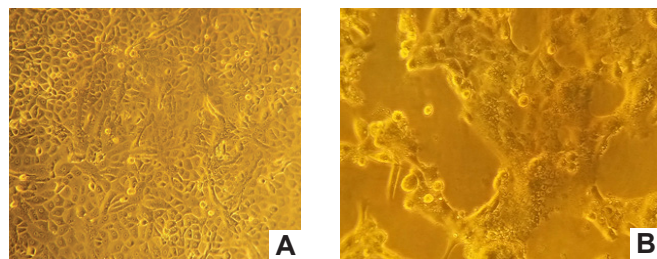
Bảng 3. Kết quả phân lập lại chủng virus KTY-PED01 trên môi trường tế bào Vero

STT	Lợn thí nghiệm	P0	P1	P2	P3	RT-PCR sau phân lập (P3)
1	TN1	0	1	1	1	+
2	TN2	0	1	1	1	+
3	TN3	0	0	1	1	+
4	TN4	0	1	1	1	+
5	TN5	0	1	1	1	+

Ghi chú: P_n : Đời cấy chuyển virus thứ n ; 0: Không xuất hiện bệnh tích tế bào; 1: Xuất hiện bệnh tích tế bào; + : Kết quả dương tính với virus PED

Qua bảng kết quả có thể thấy chủng virus KTY-PED01 không gây bệnh tích trên tế bào Vero ngay trong đời đầu tiên gây nhiễm (P0). Đến đời cấy chuyển thứ 1, có 4/5 mẫu gây bệnh tích trên tế bào, chiếm 80% tổng số mẫu thí nghiệm. Từ đời cấy chuyển thứ 2, quan sát thấy tất cả các mẫu gây nhiễm đều xuất hiện bệnh tích trên tế bào. Với bệnh tích đặc trưng là các tế bào

dung giải màng tạo thành tế bào khổng lồ chứa nhiều nhân bên trong (thể hợp bào - syncytium). Khi xuất hiện bệnh tích tế bào, dịch nuôi cấy được thu để kiểm tra sự có mặt của virus PED bằng phương pháp RT-PCR. Kết quả cho thấy 100% các mẫu đều dương tính với virus PED, và bệnh tích xuất hiện trên tế bào chính là do chủng virus KTY-PED01 gây ra.



Hình 9. (A) Tế bào Vero không được gây nhiễm virus PED. (B) Bệnh tích của PEDV trên tế bào Vero đời P1

IV. KẾT LUẬN

Chủng virus KTY-PED01 có khả năng gây bệnh trên lợn thí nghiệm tương đương với chủng virus cường độc, với triệu chứng và bệnh tích rất điển hình của lợn mắc PED. Triệu chứng lâm sàng chủ yếu của lợn được gây nhiễm là: bỏ ăn, sốt, nôn mửa, gây còm và đặc biệt là tiêu chảy phân màu vàng, dính kết ở hậu môn.

Bệnh tích đại thể chủ yếu của lợn được gây nhiễm chủng KTY-PED01 là ruột non căng phồng, thành ruột mỏng, xuất huyết, bên trong ruột chứa dịch lỏng màu vàng. Dạ dày căng phồng, chứa thức ăn không tiêu, xuất huyết. Các hạch lympho, đặc biệt là hạch màng treo ruột có biểu hiện sưng to, xuất huyết.

Bệnh tích vi thể của lợn được gây nhiễm chủng KTY-PED01 là: niêm mạc ruột bong tróc, lông nhung đứt nát và hoại tử, có biểu hiện sung huyết, xuất huyết và sự thâm nhiễm các tế bào viêm ở hạ niêm mạc, ngoài ra còn hình thành các không bào nằm ở đầu lông nhung. Biểu mô dạ dày bị bong tróc, đứt nát, phân tuyến bị phá hủy, xuất huyết. Các hạch lâm ba có biểu hiện sung huyết, xuất huyết, các nang lympho bị thoái hóa. Ngoài ra còn có sự thoái hóa, hoại tử xuất huyết ở một số cơ quan khác như: gan, lách, thận, phổi.

Dựa vào các kết quả trên, chủng virus KTY-PED01 có thể được lựa chọn để tiến hành nghiên cứu sâu hơn phục vụ cho các nghiên cứu chọn chủng virus tiềm năng để sản xuất vacxin, thử hiệu lực của vacxin hoặc sản xuất các chế phẩm sinh học phục vụ cho chẩn đoán, phòng và trị bệnh PED.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chang, Y.-C., Kao, C.-F., Chang, C.-Y., Jeng, C.-R., Tsai, P.-S., Pang, V., Chang, H.-W., 2017. Evaluation and Comparison of the Pathogenicity and Host Immune Responses Induced by a G2b Taiwan Porcine Epidemic Diarrhea Virus (Strain Pintung 52) and Its Highly Cell-Culture Passaged Strain in Conventional 5-Week-Old Pigs. *Viruses*, 9(5), 121.
- Chen, Q., Li, G., Stasko, J., Thomas, J. T., Stensland, W. R., Pillatzki, A. E., Gauger, P. C., Schwartz, K. J., Madson, D. & other authors, 2014. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *J. Clin Microbiol* 52, 234–243.
- Chen Qi., Phillip C. Gauger, Molly R. Stafne, Joseph T. Thomas, Darin M. Madson, Haiyan Huang, Ying Zheng, Ganwu Li and Jianqiang Zhang, 2016. Pathogenesis comparison between the United States porcine epidemic diarrhoea virus prototype and S-INDEL-variant strains in conventional neonatal piglets. *Journal of General Virology*, 97, 1107–1121.
- Cima, G., 2014. PED virus reinfecting U.S. herds. Virus estimated to have killed 7 million-plus pigs. *J Am Vet Med Assoc* 245, 166–167.
- Nguyễn Văn Điệp, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Thị Hoa, Yamaguchi, 2014. Một số đặc điểm dịch tễ và bệnh lý của bệnh tiêu chảy thành dịch trên lợn ở một số tỉnh phía bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, tập XXI., số 2, tr43-tr56.
- Oldham, J., 1972. Epidemic diarrhoea: How it all began. Letter to the editor. *Pig farming* (Suppl.), 72–73.
- Song, D. S., Kang, B. K., Oh, J. S., Ha, G. W., Yang, J. S., Moon, H. J., Park, B. K., 2006. Multiplex Reverse Transcription-PCR for Rapid Differential Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus, Transmissible Gastroenteritis Virus, and Porcine Group A Rotavirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(3), 278–281.
- Song, D. & Park, B., 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44, 167–175.
- Stevenson, G. W., Hoang, H., Schwartz, K. J., Burrough, E. R., Sun, D., Madson, D., Cooper, V. L., Pillatzki, A., Gauger, P. & other authors, 2013. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest* 25, 649–654.
- Toan, N.T., Puranaveja, S., Thanawongnuwech, R., 2011. Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates from southern Vietnam during 2009-2010 outbreaks. *The Thai Journal of Veterinary Medicine* 41, 55.

Ngày nhận 5-12-2018

Ngày phản biện 29-1-2019

Ngày đăng 1-9-2019