

# Nghiên cứu khoa học

## NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VIRUS GÂY BỆNH CA-RÊ PHÂN LẬP Ở PHÍA BẮC VIỆT NAM

Lê Thị Hạnh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Lan<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Hoa<sup>2</sup>, Nguyễn Văn Thắng<sup>2</sup>

### TÓM TẮT

Bệnh Ca-rê gây ra bởi Canine distemper virus (CDV) là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, thường gây tử vong và là bệnh đa hệ thống ảnh hưởng đến hệ hô hấp, đường tiêu hóa và hệ thần kinh trung ương của chó. Trong nghiên cứu này đã phân lập được 12 chủng virus Ca-rê trên môi trường tế bào Vero-DST. Bệnh tích tế bào quan sát được sau 24 giờ đến 36 giờ sau khi gây nhiễm virus, tế bào đạt mức phá hủy cao ở 48 giờ đến 60 giờ sau gây nhiễm và tế bào Vero-DST bị phá hủy hoàn toàn sau 96 giờ. Virus Ca-rê phân lập được có hiệu giá từ  $6,67 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml đến  $3,16 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml. Trong 60 giờ đầu sau gây nhiễm, hiệu giá virus trong tế bào thường lớn hơn hiệu giá virus ngoài tế bào. Sự tăng trưởng của virus trên môi trường nuôi cấy tế bào Vero-DST là một quá trình liên tục, trong đó hiệu giá virus cao nhất ở thời điểm 48 giờ đến 60 giờ sau gây nhiễm.

*Từ khóa:* Chó, Virus Ca-rê, phân lập, đặc tính sinh học

### Study on some biological characteristics of Canine distemper virus isolated in the North, Viet Nam

Le Thi Hanh, Nguyen Thi Lan, Nguyen Thi Hoa, Nguyen Van Thang

### SUMMARY

Canine distemper caused by canine distemper virus (CDV) is a contagious, often fatal, multi-systemic viral disease, affecting the respiratory, gastrointestinal and central nervous systems of dogs. In this study, 12 canine distemper virus strains were isolated on Vero - DST cell. Cytopathic effects of CDV infection were observed at 24 hours to 36 hours after infection, reaching a high level of destruction at 48 hours to 60 hours after infection and Vero-DST cells were completely destroyed after 96 hours. The titer of isolated canine distemper virus ranged from  $6.67 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml to  $3.16 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml. Virus titer in the cells were greater than the extracellular virus titer. Virus growth in Vero-DST cell culture was a continuous process in which the viral titer was highest at 48 hours to 60 hours after infection.

*Keywords:* Canine distemper virus, isolation of canine distemper virus

<sup>1</sup> Khoa CNTY, Trường Cao Đẳng Công Nghệ và Môi Trường Hà Nội

<sup>2</sup> Học viện Nông nghiệp Việt Nam

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Ca-rê hay bệnh sài sót ở chó là một bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm thường xảy ra ở chó con, lây lan nhanh và tỷ lệ chết rất cao. Nguyên nhân gây bệnh Ca-rê trên chó là do virus Ca-rê (Canine distemper virus - CDV). CDV là một thành viên của giống Morbillivirus, thuộc họ Paramixoviridae. Bệnh Ca-rê là một bệnh lây nhiễm cao ở chó, gây tổn thương lớn ở hệ tiêu hóa, hệ thần kinh trung ương và hệ hô hấp (theo Hồ Đình Chúc (1993), Nguyễn Hữu Nam (2011)). Ở Việt Nam, bệnh Ca-rê được phát hiện từ năm 1920. Chó phát bệnh thường chết với tỷ lệ chết 50-80%, có thể lên đến 100% nếu không được điều trị kịp thời (Hồ Đình Chúc, 1993). Cho đến nay, bệnh Ca-rê xảy ra ở hầu hết các tỉnh và gây thiệt hại lớn cho đàn chó nuôi trong nước do tỷ lệ tử vong của bệnh rất cao (Lê Thị Tài, 2006). Thế giới đã có rất nhiều công trình nghiên cứu về virus Ca-rê kể từ khi nó xuất hiện đến nay và các vaccin mới không ngừng được sản xuất để tăng hiệu quả phòng bệnh. Tuy nhiên dịch bệnh vẫn xảy ra, điều này cho thấy virus không ngừng biến đổi, ngoài ra những nghiên cứu đầy đủ về đặc tính sinh học của virus Ca-rê ở trong nước còn hạn chế. Xuất phát từ thực tiễn đó, trong đề tài này chúng tôi tiến hành “Nghiên cứu một số đặc tính sinh học của virus Ca-rê phân lập ở phía Bắc Việt Nam”. Kết quả nghiên cứu có ý nghĩa rất quan trọng trong việc xác định thời điểm nhằm thu hoạch virus với hiệu giá virus

cao nhất là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo như nghiên cứu đặc điểm sinh học phân tử của virus Ca-rê, chế tạo kit chẩn đoán, chế tạo kháng nguyên dùng trong chẩn đoán và lựa chọn được nguồn mẫu bệnh phẩm phục vụ cho việc chọn chủng virus chế vaccin phòng bệnh hiệu quả, góp phần giảm thiểu thiệt hại kinh tế do bệnh Ca-rê gây ra cho đàn chó nuôi ở trong nước.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

- Chó mắc bệnh Ca-rê, chưa tiêm phòng vaccin được thu thập từ 5 tỉnh phía Bắc Việt Nam: Thái Bình, Hải Dương, Hưng Yên, Hà Nội, Hà Giang.

- Hóa chất, dụng cụ, trang thiết bị phục vụ nghiên cứu bao gồm: Dòng tế bào Vero-DST, DMEM, FBS, dung dịch EDTA-PBS, Kit tách chiết RNA tổng số (kit QIAampViralRNA Minikit), kit chạy phản ứng RT-PCR (Kit Invitrogen RT-PCR), cặp môi sử dụng trong chẩn đoán bệnh Ca-rê (Bảng 1), DW2, TBE, Red gel, agarose, DNA Marker (Bionexus-Mỹ), bình T25, bình T75, khay 96 giếng, pipet, đầu tip tương ứng với micropipet, bể ổn nhiệt, tủ ẩm nuôi cấy tế bào (5%CO<sub>2</sub>), kính hiển vi soi ngược, buồng cấy vô trùng, tủ lạnh -20°C và -80°C, cân phân tích, máy ly tâm lạnh, máy spin, vortex, máy lắc, máy gia nhiệt PCR, máy điện di, máy chụp ảnh gel.

**Bảng 1. Trình tự môi sử dụng cho phản ứng RT-PCR phát hiện virus Ca-rê**

| Gene | Cặp môi | Trình tự môi (5'-3')   | Vị trí    | Sản phẩm |
|------|---------|------------------------|-----------|----------|
| P    | Upp1    | ATGTTTATGATCACAGCGCGGT | 2132-2149 | 409bp    |
| P    | Upp2    | ATTGGGTTGCACCACTTGTC   | 2560-2541 |          |

Nguồn: Lan et al. (2005c)

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phương pháp RT-PCR

Từ các mẫu bệnh phẩm thu được của các chó nghi mắc bệnh Ca-rê, được bảo quản

trong điều kiện  $-80^{\circ}\text{C}$ , tiến hành tách chiết RNA của virus để chẩn đoán các chó mắc bệnh. Quy trình tách chiết RNA tổng số được thực hiện theo hướng dẫn đi kèm của bộ Kit QIAamp Viral RNA Minikit (Qiagen, Hilden, Đức). Mẫu RNA sau khi tách chiết sẽ được hỗn hợp với các thành phần phản ứng của Kit Invitrogen bao gồm: 12,5  $\mu\text{l}$  2X reaction; 0,5  $\mu\text{l}$  Upp1; 0,5  $\mu\text{l}$  Upp2; 0,5  $\mu\text{l}$  enzyme; 6,0  $\mu\text{l}$  nước tinh khiết phân tử; 5,0  $\mu\text{l}$

RNA mẫu. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng RT-PCR là 1 chu kỳ:  $50^{\circ}\text{C}/30$  phút,  $95^{\circ}\text{C}/2$  phút, 35 chu kỳ:  $95^{\circ}\text{C}/30$  giây,  $50^{\circ}\text{C}/60$  giây,  $72^{\circ}\text{C}/1$  phút, 1 chu kỳ:  $72^{\circ}\text{C}/10$  phút và giữ sản phẩm ở  $10^{\circ}\text{C}$ . Sản phẩm phản ứng RT-PCR được điện di trên thạch 1,2% ở hiệu điện thế 100V cường độ 100mA, thời gian chạy điện di trong 30 phút. Kết thúc điện di, bản thạch được lấy ra nhuộm Red gel trong khoảng 5-7 phút. Sau khi nhuộm, bản thạch được chuyển vào máy phát tia UV để quan sát kết quả điện di. Vị trí các đoạn DNA được phát hiện bằng những vệt sáng tương ứng của thuốc nhuộm, chụp ảnh và đọc kết quả. Kết quả dương tính khi mẫu cho kích thước sản phẩm DNA theo đúng thiết kế mỗi mẫu âm tính khi không có sản phẩm DNA.

## 2.2. Phương pháp phân lập virus Ca-rê trên môi trường tế bào Vero-DST

Bước 1 chuẩn bị tế bào phân lập: Tế bào Vero – DST được đưa vào nuôi cấy trong môi trường và điều kiện thích hợp, môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) có bổ sung 5% FCS (fetal calf serum) làm ấm trong tủ  $37^{\circ}\text{C}$  trong 30 phút trước khi gây nhiễm virus.

Bước 2 chuẩn bị mẫu phân lập: Mẫu bệnh phẩm được nghiền nát bằng chày và cối vô trùng sau đó được đồng nhất trong dung dịch MEM. Tiến hành ly tâm tốc độ cao và lọc hỗn dịch, sau đó gây nhiễm vào tế bào Vero – DST.

Bước 3 gây nhiễm virus và quan sát kết quả: Từ các đĩa lòng tế bào đã chuẩn bị ở bước 1, hút bỏ môi trường nuôi cấy và bổ sung 100  $\mu\text{l}$  mẫu đã chuẩn bị ở bước 2. Tế bào gây

nhiễm virus được ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$  với 5%  $\text{CO}_2$  trong 30 phút. Bổ sung 1,5 ml môi trường DMEM có chứa 10% TPB (Tryptose Phosphate Broth) vào đĩa lòng và để ở  $37^{\circ}\text{C}$  với 5%  $\text{CO}_2$ . Hàng ngày theo dõi sự phá hủy tế bào bằng kính hiển vi soi ngược và thu virus khi tế bào bị phá hủy đạt 80% - 90% diện tích đáy của đĩa lòng.

### 2.2.3. Phương pháp xác định hiệu giá virus (TCID<sub>50</sub>/ml)

Tế bào Vero-DST được chuẩn bị trên khay 96 giếng ( $2,0 \times 10^4$  tế bào/giếng). Huyền dịch virus được pha loãng theo cơ số 10 rồi đem ủ trên bề mặt tế bào một lớp các giếng theo thứ tự đánh dấu trước (25  $\mu\text{l}$ /giếng), mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần. Sau khi ủ 1 giờ, dung dịch duy trì DMEM (10% TBP) được bổ sung vào (100  $\mu\text{l}$ /giếng). CPE được quan sát hàng ngày cho đến ngày thứ 5 sau khi gây nhiễm. Giá trị TCID<sub>50</sub>/ml được xác định theo phương pháp của Behrens-Karber (Lan *et al.*, 2005a).

### 2.2.4. Phương pháp xác định đường biểu diễn sự nhân lên của virus

Chuẩn bị các khay 96 giếng nuôi cấy tế bào Vero-DST với số lượng đảm bảo  $5 \times 10^4$  tế bào/giếng. Virus Ca-rê phân lập được và chủng virus vaccin được gây nhiễm lên tế bào với giá trị MOI = 0,01. Sau một giờ ủ, tiến hành rửa bằng 0.5 ml dung dịch PBS. Sau đó, bổ sung vào môi trường nuôi cấy (100  $\mu\text{l}$ /giếng) môi trường dinh dưỡng thiết yếu. Virus giải phóng ngoài tế bào và virus trong tế bào được thu riêng từ dịch nổi và phần tế bào còn lại ở các bình gây nhiễm tại các thời điểm 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 giờ sau gây nhiễm virus. Tiến hành xác định hiệu giá những ống virus đã thu để định lượng virus. Đường biểu diễn sự nhân lên của virus được xây dựng có biến là log10 của TCID<sub>50</sub> tại mỗi thời điểm thu virus.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả thu thập mẫu chó mắc bệnh Ca-rê và chẩn đoán bằng kỹ thuật RT-PCR

Phản ứng RT-PCR được coi là phương pháp nhanh, độ nhạy cao trong việc chẩn đoán chó

mắc Ca-rê (Shin *et al.*, 1995, Shin *et al.*, 2004). Các mẫu bệnh phẩm dùng chẩn đoán bằng phân

ứng RT-PCR gồm có: bệnh phẩm, dịch tiết mũi và nước bọt. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

**Bảng 2. Kết quả chẩn đoán chó mắc Ca-rê bằng phương pháp RT-PCR**

| Nội dung                        | Số mẫu | Tỷ lệ dương tính CDV chẩn đoán bằng RT-PCR | Tỷ lệ âm tính CDV |
|---------------------------------|--------|--------------------------------------------|-------------------|
| Mẫu chó thu thập nghi mắc Ca-rê | 46     | 37                                         | 9                 |
| Tỷ lệ                           | 100%   | 80,43%                                     | 18,37%            |

Theo nghiên cứu của Prittie (2004), Pollock và Coyne (1993); Hoskins (1997), bệnh viêm ruột cấp tính do Parvovirus gây ra hay mắc ở các giống chó khác nhau, chó đực và cái từ 6 tuần tới 6 tháng tuổi. Nghiên cứu của Lamm và Rezabek (2008), Prittie (2004) cũng chỉ ra viêm ruột cấp tính do Parvovirus gây ra thường gặp ở chó con tới 6 tháng tuổi với biểu hiện triệu chứng lâm sàng như: chán ăn, ủ rũ, mệt mỏi và sốt; ở giai đoạn cuối chó nôn mửa và tiêu chảy với phân chứa dịch nhầy hoặc có máu.

Như vậy, nếu chỉ căn cứ vào bệnh tích lâm sàng thấy viêm ruột cấp tính do Parvovirus và CDV có nhiều triệu chứng giống nhau. Để xác định các mẫu nghiên cứu chỉ mắc bệnh Ca-rê, không mắc Parvovirus nhằm phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi tiếp tục lấy dịch swab từ 37 chó dương tính với CDV bằng phương pháp RT-PCR được chúng tôi chẩn đoán tiếp bằng PCR với bệnh Parvovirus.

Kết quả chẩn đoán bằng phương pháp RT-PCR và PCR được trình bày ở bảng 3.

**Bảng 3. Kết quả chẩn đoán bằng phương pháp RT-PCR và PCR**

|                   | Parvovirus | CDV       |
|-------------------|------------|-----------|
| Mẫu bệnh phẩm     | Dịch swab  | Dịch swab |
| Số mẫu dương tính | 0/37       | 37/37     |
| Tỷ lệ dương tính  | 0,0        | 100,0     |

*\*Ghi chú: Dịch swab là dịch tiết được lấy từ hầu, họng, mắt và mũi của chó bệnh*

Kết quả ở bảng 3 cho thấy 37 mẫu bệnh phẩm của chó mắc bệnh Ca-rê không đồng nhiễm với Parvovirus.

### 3.2. Kết quả nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của những chủng virus Ca-rê phân lập được

#### 3.2.1. Thông tin của những chủng virus Ca-rê phân lập được sử dụng trong nghiên cứu

Sau khi thu được 37 chó nghiên cứu dương tính với virus gây bệnh Ca-rê, tiến hành phân

lập trên môi trường tế bào Vero-DST thu được 37 mẫu virus tương ứng từ 37 chó nghiên cứu. Chúng tôi đã tiến hành sàng lọc các mẫu virus phân lập được để chọn ra 12 chủng virus đại diện cho 5 địa phương nghiên cứu với tiêu chí lựa chọn như mẫu bệnh phẩm được phân lập từ chó có triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đại thể điển hình của bệnh, kết quả phân lập trên môi trường tế bào có thời gian gây bệnh tích tế bào (CPE) sớm với bệnh tích rõ ràng, 12 chủng virus Ca-rê được lựa chọn trong nghiên cứu này có thông tin chi tiết về nguồn gốc được trình bày ở bảng 4.

**Bảng 4. Thông tin chủng virus Ca-rê sử dụng trong nghiên cứu**

| STT | Chủng Virus Ca-rê | Ký hiệu chó nghiên cứu | Cơ quan phân lập | Năm phân lập |
|-----|-------------------|------------------------|------------------|--------------|
| 1   | CDV1-PHN          | BK-HN05                | Phổi             | 2018         |
| 2   | CDV2-HHN          | PQ- HN07               | Hạch phổi        | 2018         |
| 3   | CDV3-PHN          | MC-HD08                | Ruột             | 2018         |
| 4   | CDV5-RHN          | Ph- HD14               | Ruột             | 2018         |
| 5   | CDV6-HHN          | Ps-TB16                | Hạch phổi        | 2018         |
| 6   | CDV10-PHN         | R- TB18                | Phổi             | 2018         |
| 7   | CDV19-RHN         | BH-HG19                | Ruột             | 2019         |
| 8   | CDV28-HHN         | Ps- HY21               | Phổi             | 2019         |
| 9   | CDV30-RHN         | BK-HY24                | Ruột             | 2019         |
| 10  | CDV31-PHN         | BH- HG26               | Phổi             | 2019         |
| 11  | CDV36-HHN         | BH-HG28                | Hạch phổi        | 2019         |
| 12  | CDV37-RHN         | Phs- HG35              | Ruột             | 2019         |

Thông tin chi tiết của 12 chủng virus Ca-rê nghiên cứu được lựa chọn từ 37 chó mắc bệnh Ca-rê phân lập được từ thực địa. Các mẫu bệnh phẩm dùng để phân lập virus đã được chẩn đoán dương tính với virus Ca-rê bằng phương pháp RT-PCR ngoài ra bệnh phẩm được lựa chọn từ những chó có đặc điểm bệnh tích điển hình của bệnh Ca-rê.

#### **4.2.2. Khả năng gây bệnh tích tế bào (CPE) và hiệu giá của các chủng virus Ca-rê phân lập được**

Sau khi phân lập virus từ các mẫu bệnh phẩm, chúng tôi tiếp tục tìm hiểu sâu thêm về khả năng nhân lên trên môi trường tế bào của các chủng virus Ca-rê phân lập được. Trong nghiên cứu này chúng tôi không chỉ tiến hành nghiên cứu với những virus phân lập được mà còn đồng thời tiến hành đối với cả chủng virus vaccin Onderstepoort để so sánh khả năng nhân lên, hủy hoại tế bào của các chủng Ca-rê phân lập được với chủng virus vaccin.

Để đánh giá một cách khách quan khả năng gây bệnh tích tế bào, virus phân lập được xác định hiệu giá để tính toán giá trị TCID<sub>50</sub>. Sau đó mới đem gây nhiễm lên môi trường tế bào Vero-DST ở cùng một tỷ lệ

MOI là 0.01. Kết quả nghiên cứu khả năng gây bệnh tích tế bào (CPE) của các chủng virus Ca-rê trên môi trường tế bào Vero-DST được thể hiện ở bảng 5.

Nghiên cứu về khả năng nhân lên trên môi trường tế bào (khả năng gây bệnh tích tế bào) của các chủng virus Ca-rê nghiên cứu qua bảng 5 chúng tôi thấy rằng virus bắt đầu phá hủy tế bào từ 24 giờ đến 48 giờ sau khi gây nhiễm và phá hủy hoàn toàn tế bào sau 60 giờ đến 96 giờ. 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. Các chủng thích nghi cao có khả năng nhân lên trên tế bào tốt sẽ gây bệnh tích tế bào sớm, ngược lại các chủng virus thích nghi thấp khả năng nhân lên trên tế bào kém sẽ gây bệnh tích tế bào muộn hơn. 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 khả năng nhân lên của virus, ngược lại thu thập và bảo quản mẫu không đúng quy trình sẽ làm giảm số lượng cũng như sự sống của virus, điều này ảnh hưởng trực tiếp tới việc phân lập giữ giống virus.

Phân tích bảng kết quả cho thấy trong tổng số 12 chủng virus được lựa chọn nghiên cứu có chủng virus gây bệnh tích tế bào sớm, diễn hình và phá hủy tế bào hoàn toàn rất giống với chủng virus vaccin đó là các chủng CDV1-PHN, CDV5-RHN, CDV10-PHN, CDV19-RHN, CDV28-HHN biểu hiện là thời gian xuất hiện bệnh tích sớm 24h và thời gian hủy hoại hoàn toàn tế bào ngắn 48h, diễn biến bệnh tích tế bào phát triển nhanh trong vòng 24h. Trong 12 chủng virus phân lập được lựa chọn nghiên cứu, chúng tôi còn nhận thấy có chủng virus phát triển

chậm trên môi trường tế bào, bệnh tích tế bào xuất hiện muộn sau 48h thời gian phá hủy hoàn toàn tế bào dài hơn 96h và không thể phá hủy hoàn toàn tế bào sau khi gây nhiễm như CDV2-HHN, CDV3-PHN, CDV6-HHN, CDV30-RHN, CDV37-RHN. Như vậy trong tổng số 12 chủng virus được lựa chọn nghiên cứu chúng tôi đã bước đầu xác định được một số chủng virus Ca-rê có khả năng nhân lên tốt trên môi trường tế bào Vero-DST để tiếp tục nghiên cứu và loại bỏ các chủng nhân lên kém, không ổn định trên môi trường tế bào.

**Bảng 5. Kết quả nghiên cứu khả năng gây bệnh tích tế bào (CPE) của các chủng virus Ca-rê**

| STT | Virus         | CPE (%) |       |       |       |       |       |       |       |
|-----|---------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|     |               | 12hpi   | 24hpi | 36hpi | 48hpi | 60hpi | 72hpi | 84hpi | 96hpi |
| 1   | CDV1-PHN      | -       | *     | 50    | 100   | B     | B     | B     | B     |
| 2   | CDV2-HHN      | -       | -     | *     | 30    | 70    | 80    | 90    | 90    |
| 3   | CDV3-PHN      | -       | -     | *     | 20    | 65    | 80    | 80    | 85    |
| 4   | CDV5-RHN      | -       | -     | *     | 80    | 100   | 100   | B     | B     |
| 5   | CDV6-HHN      | -       | -     | *     | 10    | 20    | 30    | 30    | 30    |
| 6   | CDV10-PHN     | -       | -     | *     | 90    | 90    | 100   | B     | B     |
| 7   | CDV19-RHN     | -       | *     | 50    | 100   | B     | B     | B     | B     |
| 8   | CDV28-HHN     | -       | -     | *     | 80    | 100   | B     | B     | B     |
| 9   | CDV30-RHN     | -       | *     | *     | 40    | 55    | 75    | 90    | 90    |
| 10  | CDV31-PHN     | -       | -     | *     | 10    | 20    | 30    | 30    | 30    |
| 11  | CDV36-HHN     | -       | *     | *     | 50    | 70    | 90    | 90    | B     |
| 12  | CDV37-RHN     | -       | -     | *     | 15    | 35    | 50    | 80    | 90    |
| 13  | Onderstepoort | -       | *     | 50    | 100   | B     | B     | B     | B     |

**Chú thích:**

-: Chưa có bệnh tích tế bào (CPE)

\*: 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)

Sau khi nghiên cứu khả năng gây bệnh tích tế bào của các chủng virus Ca-rê, chúng tôi tiến hành nghiên cứu sự ổn định về đặc tính nuôi cấy của virus Ca-rê (bằng cách nhân lên 3 thế hệ trên

môi trường tế bào Vero-DST) và xác định hiệu giá của các chủng virus Ca-rê được lựa chọn để có kết quả lựa chọn các chủng virus cho các bước nghiên cứu sau một cách chính xác nhất.



**Hình 1. CPE do CDV1-PHN gây ra sau 36 giờ gây nhiễm trên tế bào Vero-DST**



**Hình 2. Tế bào Vero-DST không gây nhiễm virus Ca-rê**

#### **4.2.3. Nghiên cứu xác định biểu đồ tăng trưởng của những chủng virus Ca-rê phân lập được**

Để tiến hành nghiên cứu đặc tính sinh học của virus CDV, chúng tôi tiến hành nghiên cứu sự hiện diện của virus ở bên trong và bên ngoài tế bào sau khi gây nhiễm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu quy luật nhân lên của 12 chủng virus Ca-rê nghiên cứu. Nghiên cứu quy luật nhân lên của 12 chủng virus Ca-rê phân lập được chúng tôi nhận thấy 03 chủng CDV1-PHN, CDV19-RHN, CDV28-HHN xâm nhập và nhân lên nhanh trong tế bào Vero-DST, chúng tôi cũng nhận thấy các chủng virus CDV trên có đặc điểm chung đó là hàm lượng virus tập trung ở trong tế bào luôn cao hơn so với hàm lượng virus tập trung ở ngoài tế bào qua các thời điểm thu khác nhau thì khác nhau ở từng virus.

Kết quả nghiên cứu này có ý nghĩa rất quan trọng đối với các nhà nghiên cứu trong việc xác định thời điểm nhằm thu hoạch virus với hiệu giá virus cao nhất. Bên cạnh đó kết hợp với việc sử dụng các thiết bị phá vỡ tế bào giúp tăng hiệu giá virus thu hoạch được từ môi trường nuôi cấy. Đồng thời, 12 chủng virus này có đường biểu diễn sự nhân lên tương đối giống với chủng virus vaccin, tùy thuộc vào thời điểm thu khác nhau thì sẽ có sự khác nhau giữa chủng virus vaccin và chủng virus mới phân lập được. Như vậy, sự tăng trưởng của virus trên môi trường nuôi cấy tế bào Vero-DST không phải là một quá trình liên tục,

đồng đều. Cả 12 chủng virus Ca-rê phân lập được đều cho thấy chúng tấn công, xâm nhập, nhân lên trong tế bào mạnh hay yếu tùy từng thời điểm nhất định. Kết quả về quy luật nhân lên của 12 chủng virus trong nghiên cứu này khi so sánh với chủng 007Lm (Asia 2), chủng S124C (Asia 1) và Vn86 (Classic) trong các nghiên cứu của Lan *et al.* (2006b; 2009a) nhận thấy có sự sai khác về thời điểm xuất hiện cực đại với lượng virus liên kết trong tế bào và lượng virus giải phóng ngoài môi trường nuôi cấy.

**Bảng 6. Hiệu giá của các chủng virus Ca-rê phân lập**

| STT | Chủng virus | TCID <sub>50</sub> /ml |
|-----|-------------|------------------------|
| 1   | CDV1-PHN    | 6,67x10 <sup>4</sup>   |
| 2   | CDV2-HHN    | 3,16x10 <sup>2</sup>   |
| 3   | CDV3-PHN    | 1,26 x10 <sup>4</sup>  |
| 4   | CDV5-RHN    | 6,67x10 <sup>2</sup>   |
| 5   | CDV6-HHN    | 2,00x10 <sup>3</sup>   |
| 6   | CDV10-PHN   | 5,01 x10 <sup>3</sup>  |
| 7   | CDV19-RHN   | 3,16x10 <sup>5</sup>   |
| 8   | CDV28-HHN   | 6,67x10 <sup>4</sup>   |
| 9   | CDV30-RHN   | 6,67x10 <sup>3</sup>   |
| 10  | CDV31-PHN   | 3,16x10 <sup>3</sup>   |
| 11  | CDV36-HHN   | 1,44 x10 <sup>2</sup>  |
| 12  | CDV37-RHN   | 5,01x10 <sup>3</sup>   |

Bên cạnh đó, khi so sánh quy luật nhân lên của 12 chủng virus nghiên cứu với khả năng gây bệnh tích tế bào trên môi trường nuôi cấy tế bào Vero-DST, nhận thấy khả năng gây bệnh tích tế bào của chủng virus nghiên cứu đạt 90% sau 48 giờ gây nhiễm tương ứng với đạt giá trị cực đại (lượng virus trong tế bào và giải phóng ngoài môi trường nuôi cấy).

Căn cứ vào khả năng gây bệnh tích tế bào và khả năng nhân lên ổn định (là các chủng virus nhân lên và gây bệnh tích tế bào như nhau qua 3 thế hệ cấy truyền) và hiệu giá virus xác định được chúng tôi tiếp tục chọn ra 3 chủng virus Ca-rê để nghiên cứu quy luật nhân lên trên môi trường tế bào Vero-DST của các chủng này để phục vụ cho nghiên cứu tiếp theo. Kết quả các chủng virus Ca-rê được lựa chọn được trình bày ở bảng 7.

**Bảng 7. Các chủng virus Ca-rê được lựa chọn nghiên cứu quy luật nhân lên**

| STT | Chủng virus | TCID <sub>50</sub> /ml |
|-----|-------------|------------------------|
| 1   | CDV1-PHN    | 6,67x10 <sup>4</sup>   |
| 2   | CDV19-RHN   | 3,16x10 <sup>5</sup>   |
| 3   | CDV28-HHN   | 6,67x10 <sup>4</sup>   |

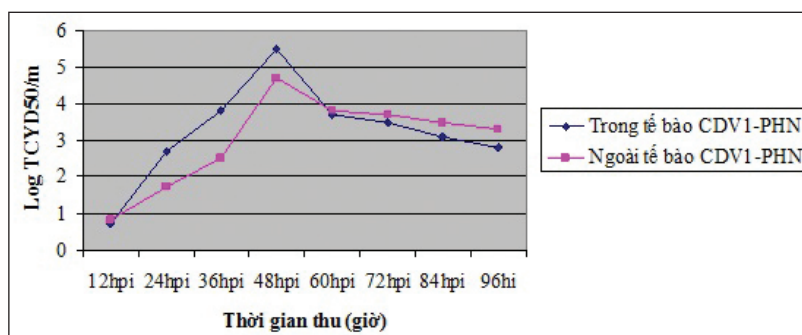
Để có những nghiên cứu sâu hơn về đặc tính sinh học của virus, chúng tôi tiến hành nghiên cứu quy luật nhân lên của virus cả bên trong và bên ngoài tế bào sau khi gây nhiễm. Tế bào Vero-DST sau khi được gây nhiễm virus Ca-rê sẽ được thu riêng rẽ ở bên trong và bên ngoài tế bào theo các thời điểm khác nhau từ khi virus bắt đầu nhân lên trên tế bào cho đến khi virus phá hủy hoàn toàn tế bào, xác định hiệu giá virus tại các thời điểm thu và đường cong sinh trưởng của virus chính là đường biểu diễn sự nhân lên của virus qua các thời điểm khác nhau trên tế bào Vero-DST.

Kết quả được trình bày ở đồ thị 1, 2 và 3.

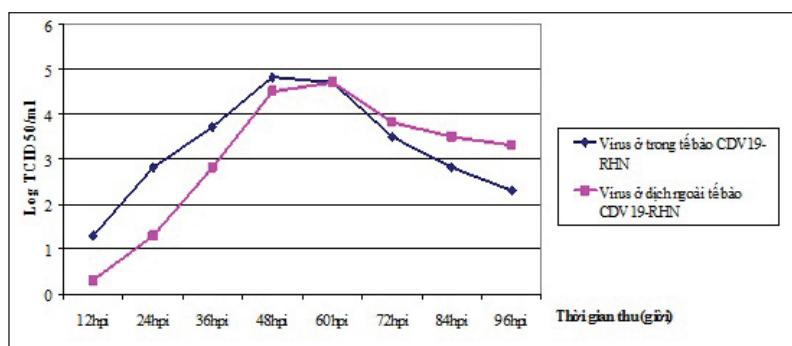
Nghiên cứu về quy luật nhân lên của

3 chủng virus điển hình là CDV1-PHN, CDV19-RHN và CDV28-HHN, qua đồ thị 1, 2 và 3 chúng tôi thấy hiệu giá virus biến đổi theo thời gian nhân lên của virus trên tế bào. Đối với virus trong tế bào hiệu giá virus thường cao hơn hiệu giá virus ngoài tế bào từ thời điểm gây nhiễm đến 60 giờ sau gây nhiễm và đạt cao nhất ở 48 giờ đến 60 giờ tùy từng chủng virus cụ thể. Sau khi gây nhiễm 60 giờ thì hiệu giá virus ngoài tế bào lại cao hơn hiệu giá virus trong tế bào. Cụ thể chủng virus CDV1-PHN có hiệu giá virus bên trong tế bào cao nhất Log TCID<sub>50</sub> tại thời điểm 48 giờ sau gây nhiễm là 5,5 và cao hơn so hiệu giá virus bên ngoài tế bào đạt 4,71. Chủng virus CDV19-RHN có hiệu giá virus bên trong tế bào cao nhất Log TCID<sub>50</sub> tại thời điểm 48 giờ sau gây nhiễm là 4,82 và cao hơn so hiệu giá virus bên ngoài tế bào đạt 4,71 tại thời điểm 60 giờ sau gây nhiễm. Chủng virus CDV28-HHN có hiệu giá virus bên trong tế bào cao nhất Log TCID<sub>50</sub> tại thời điểm 60 giờ sau gây nhiễm là 4,82 và cao hơn so hiệu giá virus bên ngoài tế bào đạt 4,3.

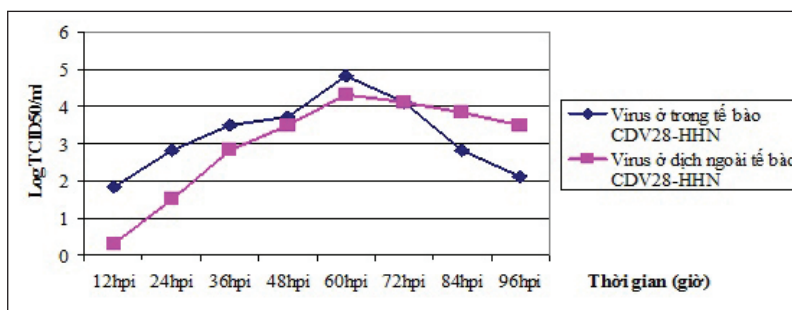
Như vậy sự nhân lên của virus khi nuôi cấy trên môi trường tế bào là một quá trình liên tục, đồng đều. Cả 3 chủng virus phân lập đều được phát hiện rằng hiệu giá virus bên trong tế bào cao hơn ngoài tế bào ở thời điểm gây nhiễm đến 60 giờ sau gây nhiễm và đạt cao nhất ở 48 giờ đến 60 giờ sau gây nhiễm tùy từng chủng virus. Sau 60 giờ gây nhiễm, virus phá vỡ tế bào hoàn toàn và giải phóng ra môi trường nuôi cấy nên hàm lượng virus ngoài tế bào thời điểm này thường lớn hơn hàm lượng virus trong tế bào. Bên cạnh đó, những thời điểm phát triển mạnh trong tế bào của 3 virus này không giống nhau hoàn toàn trong toàn bộ thời gian sau khi 3 virus được đem gây nhiễm lên tế bào Vero-DST. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với các công bố trước đây của Lan *et al.* (2005a, 2005b, 2007).



**Đồ thị 1. Đường biểu diễn sự nhân lên của chủng CDV1-PHN**



**Đồ thị 2. Đường biểu diễn sự nhân lên của chủng CDV19-RHN**



**Đồ thị 3. Đường biểu diễn sự nhân lên của chủng CDV28-HHN**

#### IV. KẾT LUẬN

Chúng tôi thu được 37 mẫu chó mắc Ca-rê chẩn đoán bằng phương pháp RT-PCR. Đã phân lập được 12 mẫu virus Ca-rê trên môi trường tế bào Vero – DST. Bệnh tích tế bào xuất hiện đầu tiên sau 24 giờ đến 36 giờ sau khi gây nhiễm virus, đạt mức phá hủy cao ở 48 giờ đến 60 giờ

sau gây nhiễm và tế bào Vero-DST bị phá hủy hoàn toàn sau 96 giờ. Virus Ca-rê có hiệu giá cao từ  $6,67 \times 10^4$  đến  $3,16 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml. Trong giai đoạn đầu sau gây nhiễm, hiệu giá virus trong tế bào thường lớn hơn hiệu giá virus ngoài tế bào. Cả 12 chủng virus Ca-rê phân lập được đều cho thấy chúng tấn công, xâm nhập, nhân lên trong tế bào mạnh hay yếu tùy từng thời điểm nhất định.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hồ Đình Chúc (1993). Bệnh Ca-rê trên đàn chó ở Việt Nam và kinh nghiệm điều trị, Công trình nghiên cứu, Hội thú y Việt Nam.
2. Nguyễn Hữu Nam (2011). *Báo cáo tổng kết đề tài khoa học và công nghệ cấp bộ*, tr: 16, 30-34.
3. Nguyễn Thị Lan và Trần Trung Kiên (2010). Nghiên cứu bệnh Ca-rê trên chó vùng Hà Nội bằng phương pháp giải phẫu bệnh lý và hóa mô miễn dịch. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y. XVII (2). tr. 14-18.
4. Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Hữu Nam và Nguyễn Thị Huyền (2012). Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của virus gây bệnh Ca-rê phân lập trên đàn chó nuôi tại Hà Nội. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y. 19(4). tr. 11-17.
5. Nguyễn Văn Dũng, Vũ Kim Chiến và Phạm Xuân Thảo (2018). Phân lập và xác định đặc tính di truyền của virus gây bệnh Ca-rê trên chó nuôi tại Thành phố Hồ Chí Minh. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y. tr 19-24.
6. Trần Văn Nền, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Văn Thanh và Lương Quốc Hưng (2017). Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học phân tử của virus Ca-rê phân lập được tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 15 (1). tr.44-45.
7. Angelika K. L., D.P. Morné, L.D. Desiré, M. Emily and H.V. Estelle (2017). Genome Sequences of Three Vaccine Strains and Two Wild-Type Canine distemper Virus Strains from a Recent Disease Outbreak in South Africa. pp. 23-25.
8. Lamb R. A. And D. Kolakofsky (2001). Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In FundaDMEMtal Virology, 4th edn. pp. 689-724. Edited by Kinpe D. M. and Howley, P. M. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
9. Lan N.T., R. Yamaguchi, A. Inomata, Y. Furuya, K. Uchida, S. Sugano and S. Tateyama (2006). Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. Vet Microbiol. pp. 32-42. Epub 2006 Feb 28.
10. Nguyen Thi Lan, R. Yamaguchi, T. T. Kien, H. Takuya, H. Yuichi and N. H. Nam (2008). First Isolation and Characterization of Canine distemper Virus in Vietnam with the Immunohistochemical Examination of the Dog. J. Vet. Med. Sci. pp. 155-162.

Ngày nhận 14-5-2019

Ngày phản biện 5-11-2019

Ngày đăng 1-12-2019