

PHÁT HIỆN VÀ PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA *CANINE KOBUVIRUS* TRÊN CHÓ NUÔI TẠI THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Nguyễn Văn Dũng, Lê Việt Bảo, Lê Đình Hà Thanh
Chi cục Chăn nuôi và Thú y Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Canine Kobuvirus (CKoV) là một trong những tác nhân có liên quan đến viêm đường ruột trên chó nuôi. Tỷ lệ lưu hành CKoV đã được báo cáo ở nhiều nước. Tuy nhiên, ở Việt Nam hiện tại thiếu thông tin về CKoV trên chó nuôi. Nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá sự lưu hành và xác định các đặc tính di truyền liên quan CKoV trên chó nuôi tại Thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả kiểm tra 80 mẫu swab phân từ chó nuôi (30 chó tiêu chảy, 50 chó khỏe) bằng kỹ thuật RT-PCR, cho thấy tỷ lệ lưu hành của CKoV ở nhóm chó bệnh là 10%, cao hơn ở nhóm chó khỏe (4%). Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$). CKoV thường phát hiện nhiễm cùng với các virus gây bệnh viêm đường ruột khác (CPV, CDV, CCoV và MRV). Điều này cho thấy CKoV có thể là một tác nhân phụ trong các bệnh gây viêm ruột trên chó. Kết quả phân tích đặc tính di truyền cho thấy có 5 chủng CKoV phát hiện được trên chó nuôi ở Thành phố Hồ Chí Minh có mức tương đồng cao với các chủng CKoV từ Hàn Quốc, Anh (95,8%-99,5%). Đây là báo cáo về sự nhiễm CKoV đầu tiên trên chó nuôi tại Thành phố Hồ Chí Minh.

Từ khóa: CKoV, chó nuôi, sự lưu hành, phân tích di truyền.

Detection and analysis of the genetic characteristics of *Canine Kobuvirus* in domestic dogs in Ho Chi Minh City

Nguyen Van Dung, Le Viet Bao, Le Dinh Ha Thanh

SUMMARY

Canine Kobuvirus (CKoV) is a pathogen relating to enteritis in the domestic dogs. Currently, prevalence of CKoV in dogs has been reported in many countries. However, information on CKoV in the domestic dogs is lack in Viet Nam at present. The objective of this study was to investigate and characterize CKoV, circulating in Ho Chi Minh City, Viet Nam. A total of 80 fecal swab samples from dogs (30 samples from the diarrheic dogs, 50 samples from the healthy dogs) were detected for CKoV by RT-PCR technique. The studied result showed that the prevalence of CKoV in the diarrheic dogs was 10% higher than that in the healthy dogs (4%). However, there was no statistically significant differences in prevalence of CKoV from the diarrheic and health dogs ($P>0.05$). The infection of CKoV with other enteric viruses (CPV, CDV and MRV) was commonly found in the domestic dogs. It indicated that CKoV was a minor pathogen in enteritis in dogs. Genetic analysis showed that 5 detected CKoV strains presented high similarity level to Korean and British CKoV strains (95.8%-99.5%). This is the first report on CKoV infection in the domestic dogs in Ho Chi Minh City.

Keywords: CKoV, domestic dogs, prevalence, genetic analysis.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

CKoV được cho là có nguồn gốc từ *Aichivirus* từ 20 đến 50 năm về trước. *Aichivirus* lần đầu tiên mô tả gây viêm dạ dày-ruột trên người tại tỉnh Aichi, Nhật Bản vào năm 1989 (Yamashita

và cs., 1991; Reuter và cs., 2011). CKoV là một *Aichivirus* và chỉ có một kiểu gen (genotype). Trên chó, CKoV được phát hiện ổ dịch cấp tính trên chó gây viêm dạ dày-ruột ở Mỹ (Kapoor và cs., 2011), và một số nước khác như Hàn Quốc,

Trung Quốc, Nhật Bản....

CKoV là một RNA virus, chuỗi dương thuộc giống *Kobuvirus* trong họ *Picornaviridae*. Giống *Kobuvirus* được phân chia thành 3 loài: *Aichivirus A*, *Aichivirus B* (trước đây gọi là *Bovine Kobuvirus*) và *Aichivirus C* (trước đây gọi là *Porcine Kobuvirus*). CKoV thuộc *Aichivirus A* và thuộc genotype CKoV type 1 (phân biệt với *Murine Kobuvirus* type 1 và *Human Aichivirus* type 1). Bộ gen của CKoV chỉ có một khung đọc mở (ORF) mã hóa một chuỗi protein đơn và chia thành 3 protein cấu trúc (VP0, VP1 và VP3) và 7 protein không cấu trúc (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C và 3D) (Kapoor và cs., 2011).

Mặc dù hiện tại nhiều nước đã có nghiên cứu và báo cáo về CKoV trên chó nuôi, tuy nhiên, ở Việt Nam, đặc biệt là Thành phố Hồ Chí Minh còn thiếu các dữ liệu liên quan CKoV. Nghiên cứu này, mục đích là tìm hiểu tình hình lưu hành và các đặc tính di truyền liên quan CKoV trên chó nuôi.

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

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Đánh giá tỷ lệ lưu hành CKoV trên nhóm chó khỏe và chó bệnh tiêu chảy.
- Xây dựng cây phát sinh dòng các chủng CKoV phát hiện được trên chó nuôi.

2.2. Nguyên liệu

Mẫu xét nghiệm: Tổng cộng 80 mẫu swab trực tràng (30 mẫu trên chó có triệu chứng viêm ruột, tiêu chảy và 50 mẫu trên chó khỏe mạnh, không có biểu hiện lâm sàng của bệnh) được thu thập ở khu vực Thành phố Hồ Chí Minh. Các mẫu bệnh phẩm được bảo quản trong dung dịch PBS ở nhiệt độ -80°C cho đến khi thực hiện các phân tích xét nghiệm.

Bộ kit ly trích RNA và bộ kit sử dụng phản ứng RT-PCR: sử dụng kit thương mại Viral RNA mini kit và One step RT-PCR kit (Qiagen, Đức).

Tinh sạch sản phẩm PCR dùng cho giải trình tự nucleotide sử dụng QIAquick PCR Purification (Qiagen).

Tế bào nuôi cấy virus: tế bào A72 có gắn receptor cSLAM (Canine signaling lymphocyte activation molecule) nuôi cấy trong môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) với 10% FCS (Fetal Calf Serum).

Thiết bị: máy luân nhiệt Real-time PCR, bộ điện di, kính hiển vi đảo ngược, tủ ẩm, máy ly tâm lạnh, máy giải trình tự nucleotide tự động ABI-PRISM 310 (Applied Biosystem, USA) và các dụng cụ thường quy khác phòng thí nghiệm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Ly trích RNA virus: sử dụng bộ kit Viral RNA mini kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

RT-PCR phát hiện RNA virus: Để phát hiện CKoV trên chó nuôi, bộ kit RT-PCR One step được sử dụng để thực hiện phản ứng RT-PCR với cặp mồi CKoVF, 5'-CTC CCC TCA GCT GCC TTC TC-3' và CaKoVR, 5'-GAG GAT CTG AAA TTT GGA AG-3' (Choi và cs., 2014). Chu kỳ nhiệt của phản ứng thực hiện ở 50°C trong 30 phút để tổng hợp cDNA, kế đến là 95°C trong 15 phút và tiếp theo là 40 chu kỳ gồm 94°C trong 30 giây, 52°C trong 30 giây và 72°C trong 1 phút. Sản phẩm PCR có kích cỡ 252 bp được phát hiện bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 2%. Sản phẩm PCR của các mẫu dương tính được tinh sạch bằng kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) và dùng cho việc giải trình tự.

Phân lập virus: mẫu dịch swab được lọc qua lọc 0,22µm và được gây nhiễm trên tế bào A72cSLAM/ DMEM 10% FCS, ủ ở nhiệt độ 37°C, theo dõi quan sát bệnh tích tế bào hàng ngày, cứ mỗi 5 ngày cấy chuyển tế bào một lần, nếu qua 5 lần cấy chuyển không quan sát thấy bất cứ bệnh tích tế bào nào, mẫu được xem là âm tính. Đối với mẫu xuất hiện bệnh tích tế bào, sử dụng PCR hoặc RT-PCR để xác định các virus được phân lập.

Phân tích dữ liệu: Xây dựng cây phát sinh

dòng theo phương pháp Neighbor-Joining sử dụng phần mềm MEGA 7.0, giá trị bootstrap được tính trên 1000 lần lặp lại. Trắc nghiệm "Chi bình phương" được dùng phân tích khi so sánh các tỷ lệ, giá trị $P < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê (sử dụng phần mềm thống kê Minitab 16.0)

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tỷ lệ nhiễm MRV trên chó bệnh tiêu chảy và chó khỏe mạnh

Tỷ lệ nhiễm CKoV trên nhóm chó tiêu chảy 10% (3/30), cao hơn trên nhóm chó khỏe là 4% (2/50). Tuy nhiên, sự khác biệt này không

có ý nghĩa về mặt thống kê ($P > 0,05$). Kết quả này tương tự một số nghiên cứu trên chó nuôi ở Hàn Quốc và Nhật Bản cũng không phát hiện sự khác biệt có ý nghĩa CKoV trên chó khỏe và chó bị tiêu chảy (Oem và cs., 2014; Soma và cs., 2016). Trên nhóm chó tiêu chảy trong nghiên cứu này, CKoV thường nhiễm cùng với các virus gây viêm ruột khác như CDV, CPV, MRV, trong khi đó trên nhóm chó khỏe, CKoV đồng nhiễm với CCoV, MRV (bảng 1). Ở Hàn Quốc, sự đồng nhiễm giữa CKoV và CDV hay CCoV thường được phát hiện (Oem và cs., 2014). Những kết quả này cho thấy CKoV có thể là một tác nhân gây bệnh phụ trong bệnh viêm ruột trên chó nuôi.

Bảng 1. Thông tin mẫu dương tính với CKoV bằng kỹ thuật RT-PCR

Ký hiệu	Tuổi (tháng)	Triệu chứng lâm sàng	RT-PCR phát hiện CKoV	Sự đồng nhiễm với các virus đường ruột khác*
9	2	Tiêu chảy, tiết dịch mũi	+	CPV, CDV, MRV
13	3	Tiêu chảy, ho, tiết dịch mũi	+	CPV
16	4	Tiêu chảy	+	CDV, MRV
47	72	Không	+	CCoV
69	24	Không	+	MRV

* CPV: Canine Parvovirus; CD: Canine distemper virus; CCoV: Canine Coronavirus; MRV: Mammalian Orthoreovirus; CKoV: Canine Kobuvirus; +: positive

Một số nghiên cứu tỷ lệ lưu hành CKoV đã được báo cáo ở một số nước như: ở Ý ghi nhận là 2,34%, ở Trung Quốc là 17,9%, ở Anh là 1,25%, ở Hàn Quốc, nhóm chó tiêu chảy là 19% và nhóm chó khỏe là 13,2%, ở Nhật Bản, nhóm chó tiêu chảy là 37,2% và nhóm chó khỏe là 48% (Martino và cs., 2013; Vicente và cs., 2013; Oem và cs., 2014; Castillo và cs., 2015; Li và cs., 2016; Soma và cs., 2016). Một nghiên cứu gần đây ở Thái Lan cho thấy nhóm chó bệnh có tỷ lệ nhiễm CKoV (19,44%) cao hơn trên nhóm chó khỏe (9,04%) (Charoenkul và cs., 2017). Các trường hợp phát hiện chó nhiễm CKoV đều có sự đồng nhiễm các virus gây bệnh viêm ruột khác như CDV, CPV, CCoV nên rất khó đánh giá các tác động gây bệnh riêng lẻ của CKoV. Tuy nhiên, cũng không loại trừ khả năng CKoV góp phần lớn trong việc gây bệnh viêm ruột trên

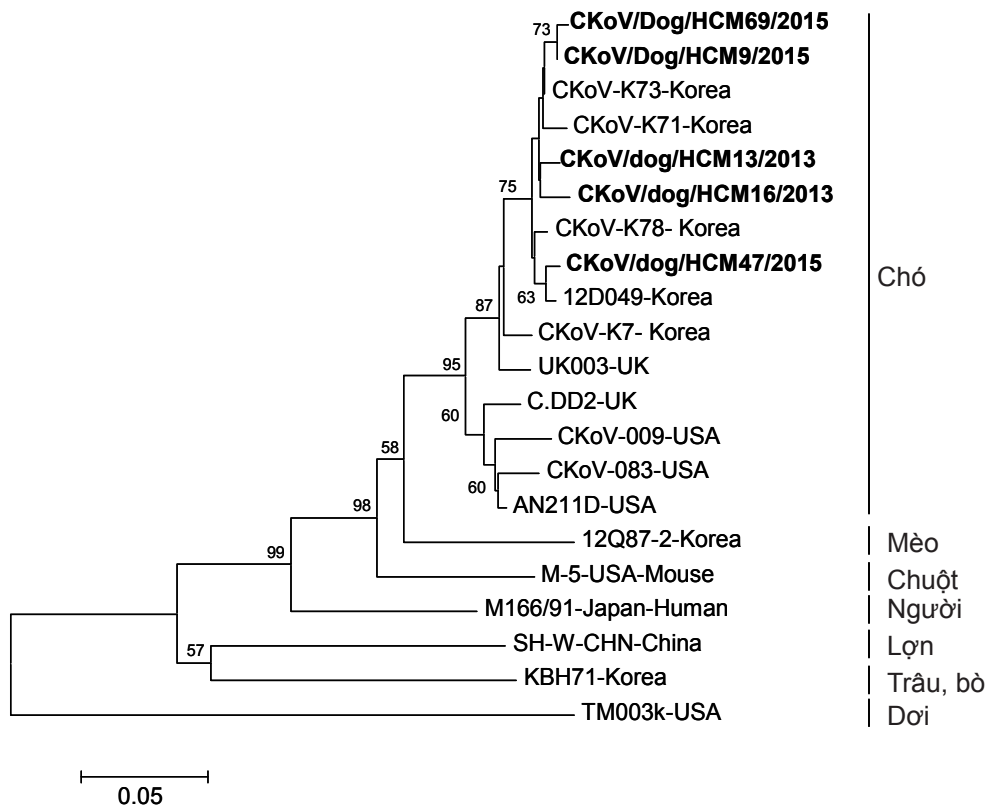
chó nuôi khi có sự hiện diện của các tác nhân khác.

3.2. Phân lập virus và xây dựng cây phát sinh dòng các chủng CKoV phát hiện được

Một điều không may mắn là việc phân lập CKoV không thành công như mong đợi (ngoài sử dụng tế bào A72/cSLAM để phân lập không thành công, các dòng tế bào khác như vero, fcwf-4, CRFK, cũng đã được dùng thử phân lập nhưng cũng không phân lập được CKoV). Cũng giống như CCoV-1, cho đến hiện nay chưa nghiên cứu nào được báo cáo thành công trong việc phân lập CKoV trên chó. Điều này cũng gây khó khăn lớn trong việc nghiên cứu, tìm hiểu sâu hơn các đặc tính sinh học, tính gây bệnh của CKoV. Do đó, việc nghiên cứu CKoV chủ yếu dựa trên phân tích

trình tự nucleotide từ các chủng CKoV được phát hiện bằng RT-PCR. Trong nghiên cứu này, 5 chủng CKoV (CKoV/dog/HCM9/2013, CKoV/dog/HCM13/2013, CKoV/dog/HCM16/2013, CKoV/dog/HCM47/2015 và CKoV/dog/HCM69/2015) phát hiện được xây dựng cây phát sinh dòng dựa trên vùng gen 3D (hình 1).

HCM16/2013, CKoV/dog/HCM47/2015 và CKoV/dog/HCM69/2015) phát hiện được xây dựng cây phát sinh dòng dựa trên vùng gen 3D (hình 1).



Hình 1. Cây phát sinh dòng của CKoV phát hiện trên chó nuôi dựa trên vùng gen 3D (252nt)

Kết quả phân tích cho thấy các chủng CKoV thuộc nhóm *Kobuvirus* trên chó và tương đồng cao với các chủng CKoV từ Hàn Quốc và Anh (CKoV-K73, CKoV-K71, CKoV-K78, 12D049 và UK003). Mức độ tương đồng giữa các chủng CKoV trong nghiên cứu này từ 97,2-100% và tương đồng với các chủng phát hiện tại Hàn Quốc và Anh từ 95,8%-99,5%. Điều này cho thấy, CKoV phân bố và lan rộng trên chó nuôi không phụ thuộc vào vùng địa lý. Hiện nay, do chưa phân lập thành công CKoV nên chưa có vaccin phòng bệnh do CKoV trên chó. Việc phòng bệnh chủ yếu là vệ sinh, sát trùng. Tuy nhiên, CKoV được xem là virus có sức đề kháng rất tốt với các loại thuốc

sát trùng (alcohols, chlorine, chloroform...) nên cũng gặp những khó khăn trong vệ sinh phòng bệnh. Một số thuốc sát trùng tiềm năng có thể có hiệu quả như glutaraldehyde, sodium hydroxide và Virkon-S (Proietto và *cs.*, 2016).

IV. KẾT LUẬN

Có sự lưu hành CKoV trên chó nuôi tại Thành phố Hồ Chí Minh. Tỷ lệ lưu hành CKoV trên nhóm chó tiêu chảy là 10% và nhóm chó khỏe là 4%.

CKoV thường đồng nhiễm với các virus gây bệnh viêm đường ruột khác như CDV, CPV, MRV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Choi, S., Lim, S. I., Kim, Y. K., Cho, Y. Y., Song, J. Y. and An, D. J. 2014. Phylogenetic Analysis of Astrovirus and Kobuvirus in Korean Dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 76: 1141-1145.
2. Li, C., Wei, S., Guo, D., Wang, Z., Geng, Y., Wang, E., Zhao, X., Su, M., Wang, X. and Sun, D. 2016. Prevalence and phylogenetic analysis of canine *Kobuviruses* in diarrhoeic dogs in northeast China. *J. Vet. Med. Sci.* 78: 7-11.
3. Martino, B. D., Felice, E. D., Ceci, C., Profio, F. D. and Marsilio, F. 2013. Canine *Kobuviruses* in diarrhoeic dogs in Italy. *Vet. Microbiol.* 166: 246-249.
4. Oem, J. K., Choi, J. W., Lee, M. H., Lee, K. K. and Choi, K. S. 2014. Canine *Kobuvirus* infections in Korean dogs. *Arch. Virol.* 159: 2751-2755.
5. Park, S. J., Kim, H. K., Moon, H. J., Song, D. S., Rho, S. M., Han, J. Y., Nguyen, V. G. and Park, B. K. 2010. Molecular detection of porcine *Kobuviruses* in pigs in Korea and their relationship with diarrhea. *Arch. Virol.* 155: 1803-1811.
6. Reuter, G., Boros, A. and Pankovics, P. 2011. Kobuviruses - a comprehensive review. *Rev. Med. Virol.* 21: 32-41.
7. Soma, T., Matsubayashi, M. and Sasai, K. 2016. Detection of *Kobuvirus* RNA in Japanese domestic dog. *J. Vet. Med. Sci.* (In press).
8. Vicente, N. C., Buesa, J., Brown, P. A., Merga, J. Y., Darby, A. C., Tavisky, J., Sadler, L., Gaskell, R. M., Dawson, S. and Radford, A. D. 2013. Phylogeny and prevalence of *Kobuviruses* in dogs and cats in the UK. *Vet. Microbiol.* 164: 246-252.
9. Choi, S., Lim, S. I., Kim, Y. K., Cho, Y. Y., Song, J. Y. and An, D. J. 2014. Phylogenetic Analysis of Astrovirus and Kobuvirus in Korean Dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 76: 1141-1145.
10. Li, C., Wei, S., Guo, D., Wang, Z., Geng, Y., Wang, E., Zhao, X., Su, M., Wang, X. and Sun, D. 2016. Prevalence and phylogenetic analysis of canine *Kobuviruses* in diarrhoeic dogs in northeast China. *J. Vet. Med. Sci.* 78: 7-11.
11. Martino, B. D., Felice, E. D., Ceci, C., Profio, F. D. and Marsilio, F. 2013. Canine *Kobuviruses* in diarrhoeic dogs in Italy. *Vet. Microbiol.* 166: 246-249.
12. Oem, J. K., Choi, J. W., Lee, M. H., Lee, K. K. and Choi, K. S. 2014. Canine *Kobuvirus* infections in Korean dogs. *Arch. Virol.* 159: 2751-2755.
13. Park, S. J., Kim, H. K., Moon, H. J., Song, D. S., Rho, S. M., Han, J. Y., Nguyen, V. G. and Park, B. K. 2010. Molecular detection of porcine *Kobuviruses* in pigs in Korea and their relationship with diarrhea. *Arch. Virol.* 155: 1803-1811.
14. Reuter, G., Boros, A. and Pankovics, P. 2011. Kobuviruses - a comprehensive review. *Rev. Med. Virol.* 21: 32-41.
15. Soma, T., Matsubayashi, M. and Sasai, K. 2016. Detection of *Kobuvirus* RNA in Japanese domestic dog. *J. Vet. Med. Sci.* (In press).
16. Vicente, N. C., Buesa, J., Brown, P. A., Merga, J. Y., Darby, A. C., Tavisky, J., Sadler, L., Gaskell, R. M., Dawson, S. and Radford, A. D. 2013. Phylogeny and prevalence of *Kobuviruses* in dogs and cats in the UK. *Vet. Microbiol.* 164: 246-252.

Ngày nhận 16-8-2019

Ngày phản biện 30-9-2019

Ngày đăng 1-12-2019