

SỰ LƯU HÀNH HUYẾT THANH KHÁNG CORONAVIRUS TRÊN CHÓ NUÔI TẠI THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

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

TÓM TẮT

Tổng số 201 mẫu huyết thanh của chó nuôi không chủng ngừa vắc xin phòng bệnh CCoV tại Thành phố Hồ Chí Minh đã được dùng để kiểm tra sự lưu hành huyết thanh kháng CCoV- II. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ lưu hành huyết thanh kháng CCoV- II trên đàn chó là 43,3%. Kết quả phân tích tỷ lệ lưu hành CCoV-II theo nhóm giống, tuổi và giới tính chó cho thấy nhóm giống chó ngoại có tỷ lệ lưu hành CCoV- II cao hơn nhóm các giống khác, nhóm chó từ trên 3 năm tuổi có tỷ lệ lưu hành CCoV-II cao hơn nhóm dưới một năm tuổi, không phát hiện sự khác biệt tỷ lệ lưu hành CCoV-II theo giới tính. Tính kháng nguyên giữa CCoV-IIb (CCoV/dog/HCM47/2015) và CCoV-IIa (fc1) được kiểm tra bằng PRNT, kết quả cho thấy tính kháng nguyên của CCoV-IIb cao hơn so với CCoV-IIa.

Từ khóa: Chó nuôi, *Coronavirus*, lưu hành huyết thanh.

Seroprevalence of canine coronavirus in domestic dogs in Ho Chi Minh City

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

SUMMARY

A total of 201 sera samples from CCoV unvaccinated dogs in Ho Chi Minh City were used for detecting antibody against CCoV-II. The studied results indicated that CCoV-II seroprevalence in the domestic dogs in Ho Chi Minh City was 43.3% (87/201). The result of analysing CCoV-II seroprevalence by dog breed groups, age and sex showed that the exotic dog breed group presented CCoV-II seroprevalence higher than that of the other dog breed groups. The CCoV-II seroprevalence of the dog group over 3 years old was higher than that of the dog group under one year old, there was no significant difference on CCoV-II seroprevalence found between the male and female dogs. The antigenicity between CCoV-lib (CCoV/HCM47/2015) and the other CCoV-lia (fc1) was checked by PRNT, as a result the antigenicity of the CCoV-IIb was higher than that of the CCoV-IIa (fc1).

Keywords: Domestic dogs, *Coronavirus*, seroprevalence.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, phong trào nuôi thú cưng, thú cảnh ở nước ta đang phát triển mạnh với nhiều loài thú khác nhau, trong đó có chó nuôi, đặc biệt là tại các đô thị, thành phố lớn như Hà Nội, Thành phố Hồ Chí Minh. Khi mật độ chó nuôi càng gia tăng thì kèm theo nhiều mầm bệnh có thể lây nhiễm và gây bệnh trên đàn chó, đặc biệt là các bệnh gây viêm dạ dày-ruột và tiêu chảy như bệnh Ca-rê, bệnh do *Parvovirus*, *Coronavirus*... Mặc dù bệnh do *Coronavirus* trên chó nuôi (*Canine*

coronavirus - CCoV) không gây tỷ lệ chết cao nhưng cũng ảnh hưởng đến sức khỏe của chó nuôi đặc biệt khi đồng nhiễm với *Parvovirus* có thể gây tử vong rất cao.

CCoV là một RNA virus, thuộc chi *Alphacoronavirus* trong họ *Coronaviridae* (Họ *Coronaviridae* có bốn chi virus gồm *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus* và *Deltacoronavirus*). CCoV (CCoV khác với coronavirus gây bệnh đường hô hấp là *Canine respiratory coronavirus*, thuộc

chi *Betacoronavirus*) được chia thành 2 type: CCoV-I và CCoV-II dựa vào sự khác biệt về trình tự nucleotide tại vùng gen S (Masters và cs., 2013). Trong genotype CCoV-II lại được phân ra subtype CCoV-IIa, CCoV-IIb dựa vào trình tự amino acid vùng đầu N của gen S (Spike gene).

Bệnh do CCoV trên chó thường gây các triệu chứng liên quan đến viêm dạ dày-ruột và tiêu chảy, bệnh lây truyền chủ yếu qua đường phân-miệng. CCoV gây bệnh trên chó phát hiện đầu tiên ở tại Đức từ năm 1971 (Binn và cs., 1974), từ đó đến nay CCoV lây lan ra nhiều nước trên thế giới trong đó có Việt Nam. Một số nghiên cứu về CCoV đã được báo cáo tại Việt Nam (Nguyễn Văn Dũng và cs., 2020; Bùi Thị Tố Nga và cs., 2019). Tuy nhiên, nghiên cứu lưu hành huyết thanh kháng CCoV trên đàn chó nuôi còn hạn chế, đặc biệt tại Thành phố Hồ Chí Minh. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá sự lưu hành huyết thanh kháng CCoV-II trên chó nuôi, từ đó cung cấp thông tin, dữ liệu làm cơ sở cho việc phòng và kiểm soát bệnh hiệu quả hơn.

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

2.1. Nội dung

- Đánh giá tỷ lệ lưu hành huyết thanh kháng CCoV-II trên chó nuôi tại Thành phố Hồ Chí Minh.
- So sánh tính kháng nguyên của genotype CCoV-IIa và CoV-IIb bằng PRNT.

2.2. Nguyên liệu

Mẫu huyết thanh: Tổng cộng 201 mẫu huyết thanh được thu thập từ chó nuôi tại các quận/huyện trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh, có độ tuổi từ 3 tháng đến 10 năm tuổi. Tất cả các chó được lấy mẫu đều chưa chủng ngừa vaccine phòng bệnh do CCoV. Mẫu huyết thanh bảo quản ở -20°C cho đến khi thực hiện các thí nghiệm.

Tế bào: tế bào fcwf-4 (*Felis catus* whole fetus-4, ATCC number CRL-2787) được nuôi cấy trong môi trường DMEM (Dulbecco's minimum

essential medium (Life Technologies, USA).

Vật tư, hóa chất và thiết bị: tủ an toàn sinh học cấp II, tủ âm, máy ly tâm, kính hiển vi đảo ngược...v.v và các hóa chất, vật dụng thường quy phòng thí nghiệm khác.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Lấy mẫu huyết thanh: Mẫu máu được lấy từ tĩnh mạch chân trước hoặc sau. Mẫu sau khi lấy được đặt nằm nghiêng và để yên khoảng 45-60 phút ở nhiệt độ phòng, bảo quản mát chuyển về phòng thí nghiệm. Sau đó chất lấy huyết thanh cho vào ống trữ mẫu, bảo quản lạnh ở nhiệt độ từ 4°C nếu kiểm tra trong vòng vài ngày, nếu trữ mẫu lâu thì phải trữ ở -20°C.

Phương pháp xét nghiệm: Sử dụng kỹ thuật trung hoà giảm đám hoại tử (Plaque Reduction Neutralization Test- PRNT). Kỹ thuật được thực hiện trên tế bào fcwf-4 được mô tả trước đây (Shiba và cs., 2007; Terada và cs., 2014) với một số cải tiến. Chủng CCoV-IIa fc1, phân lập tại Nhật Bản năm 1990 (Bandai và cs., 1999), và chủng CCoV-IIb CCoV/dog/HCM47/2015 được phân lập tại Việt Nam và được tinh sạch. Tóm tắt kỹ thuật như sau: huyết thanh chó được bất hoạt bổ thể ở 56°C trong 30 phút trước khi thực hiện phản ứng. Một lượng thể tích tương đương giữa huyết thanh pha loãng bậc 2 và virus CCoV chứa $2,0 \times 10^3$ PFU/ml được trộn đều và ủ 37°C trong 1 giờ. Tiếp theo, lấy 50 µl của hỗn dịch này nhỏ vào giếng trong đĩa 24 giếng chứa tế bào fcwf-4 một lớp. Ủ đĩa 2 giếng đã nhỏ hỗn dịch 37°C trong 1 giờ, sau đó hút loại bỏ hỗn dịch, rửa 3 lần với môi trường nuôi cấy. Sau đó, phủ agarose 0,8% (Lonza, Rockland, USA) trong môi trường DMEM chứa 10% FCS. Để nhiệt độ phòng cho agarose đặc lại và đặt ủ tủ âm 37°C cho đến khi quan sát thấy được bệnh tích tế bào (CPE). Sau cùng cố định bằng dung dịch đệm formalin và nhuộm với crystal violet. Khi số lượng plaque ở giếng xét nghiệm ít hơn 75% so với giếng đối chứng thì huyết thanh pha loãng được xem là dương tính. Hàm lượng kháng thể được xác định là ở nồng độ pha loãng huyết thanh cao nhất nhưng có số lượng plaque

ít hơn 75% so giềng đối chứng.

Phân tích dữ liệu: số liệu thu thập được xử lý và phân tích thống kê sinh học. Trắc nghiệm Chi Square và Fisher Extract được sử dụng phân tích so sánh tỷ lệ lưu hành.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tỷ lệ lưu hành huyết thanh CCoV-II trên đàn chó nuôi

Tổng cộng có 87 chó (43,3%) được phát hiện dương tính với kháng thể kháng CCoV-II (bảng 1).

Bảng 1. Tỷ lệ lưu hành huyết thanh CCoV-II trên chó nuôi tại Thành phố Hồ Chí Minh

Quận/huyện	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương	Tỷ lệ dương (%)
Quận 1	6	3	50,0
Quận 2	14	9	64,3
Quận 3	2	0	0,0
Quận 4	7	4	57,1
Quận 5	3	1	33,3
Quận 6	8	4	50,
Quận 7	1	0	0,0
Quận 8	1	1	100,0
Quận 10	2	1	50,0
Quận 11	3	0	0,0
Quận 12	29	8	27,6
Gò Vấp	6	3	50
Bình Thạnh	7	4	57,1
Tân Phú	2	2	100,0
Tân Bình	3	1	33,
Bình Tân	4	1	25,0
Thủ Đức	13	6	46,2
Bình Chánh	9	7	77,
Hóc Môn	39	16	41,0
Củ Chi	12	2	16
Cần Giờ	30	14	46,7
Tổng cộng	201	87	43,3

Điều này cho thấy CCoV-II đã lưu hành và lan rộng trên đàn chó nuôi tại Thành phố Hồ Chí Minh. Tỷ lệ lưu hành huyết thanh CCoV-II cũng đã ghi nhận tại nhiều nước như: tại Úc, nghiên cứu cho thấy trên quần thể chó nuôi là 15,8% và chó nhốt là 40,8%; tại Nhật Bản có tỷ lệ lưu

hành là 44,1%; tại Ý là 90,8% và tại Thổ Nhĩ Kỳ là 96,5% (Bandai và cs., 1999; Pratelli và cs., 2002; Gur và cs., 2008).

Tỷ lệ lưu hành huyết thanh CCoV-II trên chó từ 3 năm tuổi trở lên (52,0%) cao hơn trên chó dưới một năm tuổi (28,6%) ($P < 0,05$) (bảng 2).

Bảng 2. Tỷ lệ lưu hành huyết thanh đối với CCoV-II trên chó nuôi theo tuổi, giống, giới tính

	Chỉ tiêu	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương	Tỷ lệ dương (%)
Giới tính	Đực	101	45	44,6
	Cái	100	42	42
Tuổi (năm)	<1	28	8	28,6 ^a
	1	44	14	31,8
	2	54	26	48,1
	≥3	75	39	52,0 ^a
	Chó ta	120	47	39,2 ^b
Giống	Chó lai	51	21	41,2
	Chó ngoại	30	19	63,3 ^b
Tổng cộng		201	87	43,3

Ghi chú: a, b khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

Kết quả nghiên cứu này chỉ ra rằng tỷ lệ lưu hành huyết thanh CCoV-II gia tăng theo lứa tuổi. Một nghiên cứu trên chó tại Thổ Nhĩ Kỳ cũng cho kết quả tương tự là tỷ lệ nhiễm tăng theo lứa tuổi (Gur và cs., 2008). Có thể chó nhiều tuổi có nhiều cơ hội tiếp xúc và nhiễm với CCoV-II hơn chó nhỏ tuổi. Trên nhóm giống chó ta, tỷ lệ lưu hành huyết thanh CCoV-II (39,2%) thấp hơn giống chó ngoại (63,3%). Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu đã được báo cáo tại Nhật Bản (Soma và cs., 2012) cho thấy giống ngoại tại cửa hàng kinh doanh thú cưng nhiễm CCoV cao. Điều này có thể do giống ngoại được nuôi tập trung ở khu vực có mật độ cao, dễ tiếp xúc gần nhau, ví dụ như giống chó ngoại thường có thời gian nuôi tập trung trong các cửa hàng thú cưng, cũng có thể chó ngoại thường được chủ nuôi chú ý đến việc khám, điều trị bệnh hơn. Trong khi đó, giống chó ta chủ yếu nuôi giữ nhà, vườn và thường được nuôi ở khu vực nông thôn, mật độ nuôi không cao nên có thể ít có cơ hội để virus truyền lây.

Trong nghiên cứu này, hàm lượng kháng thể lưu hành huyết thanh CCoV-II biến động từ 1:10 đến 1:320 và chủ yếu tập trung mức từ 1:10 đến 1:40 (92,0%). Kết quả này cho thấy đàn chó nhiễm CCoV-II có hàm lượng kháng thể trong máu không cao và nếu có tiếp xúc CCoV vẫn

có thể nhiễm bệnh, đặc biệt trên những chó nhiễm *Parvovirus* thì đồng nhiễm thêm CCoV sẽ làm bệnh trầm trọng hơn. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy đàn chó nuôi tại Thành phố có phản ứng huyết thanh với CCoV-IIb mạnh hơn CCoV-IIa, điều này chỉ ra CCoV-IIb đang là genotype chính đang lưu hành trên đàn chó nuôi tại Thành phố.

3.2. So sánh tính kháng nguyên của genotype CCoV-IIa và CCoV-IIb

Để so sánh tính kháng nguyên của CCoV genotype CCoV-IIa và CCoV-IIb, 60 mẫu máu chó được thực hiện phản ứng trung hòa với chủng virus CCoV-IIa (fc1) và CCoV-IIb (CCoV/dog/HCM47/2015). Kết quả cho thấy tỷ lệ dương tính kháng thể CCoV-IIb (58,3%) cao hơn kháng thể kháng CCoV-IIa (51,7%). Có 4 chó phát hiện dương tính khi sử dụng virus CCoV-IIb thực hiện xét nghiệm, nhưng âm tính khi sử dụng chủng virus CCoV-IIa để xét nghiệm (bảng 3).

Như vậy, sử dụng chủng CCoV/dog/HCM/2015 phân lập được tại Việt Nam (CCoV-IIb) trong chẩn đoán sẽ phát hiện sự lưu hành bệnh cao hơn so với chủng fc1 (CCoV-IIa). Các mẫu huyết thanh dương tính được pha loãng thực hiện

Bảng 3. So sánh tính kháng nguyên giữa genotype CCoV-IIa và CCoV-IIb

		CCoV/dog/HCM47/2015 (IIb)		Tổng cộng
		Mẫu dương	Mẫu âm	
CCoV fc1 (IIa)	Mẫu dương	31	0	31 (51,7%)
	Mẫu âm	4	25	29 (48,3%)
Tổng cộng		35 (58,3%)	25 (41,7%)	60 (100,0%)

phản ứng trung hòa để xác định hàm lượng kháng thể cuối cùng. Kết quả cho thấy có 9 chó có hàm lượng kháng thể kháng CCoV-IIb cao hơn có ý nghĩa (cao gấp 4 lần) so với hàm lượng kháng thể kháng CCoV-IIa (dữ liệu chưa báo cáo). Điều này cho thấy khi sử dụng chủng CCoV khác genotype với chủng CCoV chó nhiễm từ thực địa trong chẩn đoán bệnh hoặc sản xuất vaccin phòng bệnh sẽ không thể cho kết quả hoàn hảo.

IV. KẾT LUẬN

Tỷ lệ lưu hành huyết thanh CCoV-II trên chó nuôi tại Thành phố Hồ Chí Minh là 43,3%. Nhóm giống chó ngoại có tỷ lệ lưu hành CCoV-II cao hơn nhóm giống khác và tỷ lệ lưu hành ở nhóm chó từ trên 3 năm tuổi cao hơn nhóm dưới 1 năm tuổi.

Tính kháng nguyên CCoV-IIb (CCoV/dog/HCM47/2015) cao hơn CCoV-IIa (fc1) khi kiểm tra bằng PRNT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bandai, C., Ishiguro, S., Masuya, N., Hohdatsu, T., Mochizuki, M., 1999. Canine coronavirus infections in Japan: virological and epidemiological aspects. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 731-736.
2. Binn, L., Lazar, E. C., Keenan, K. P., Huxsoll, D. L., Marchwicki, R. H., Strano, A. J., 1974. Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. *Proc. Annu. Meet U.S. Anim. Health Assoc.* 78: 359-366.
3. Bùi Thị Tố Nga, Bùi Trần Anh Đào, Nguyễn Văn Dũng, 2019. Ứng dụng kỹ thuật RT-PCR trong chẩn đoán bệnh do Coronavirus trên chó nuôi. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*. Tập

XXVI, Số 4, trang 38-42.

4. Gür, S., Ayşe, G. A. and Doğan, N., 2008. A serologic investigation for canine corona virus infection in individually reared dogs in central Anatolia. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Erciyes.* 5: 67-71.
5. Masters, P.S., Perlman, S., 2013. Coronaviridae. *In Fields Virology*, 6th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott, Williams and Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; pp. 825-858.
6. Pratelli, A., Elia, G., Martella, V., Palmieri, A., Cirone, F., Tinelli, A., Corrente, M., Buonavoglia, C., 2002. Prevalence of canine coronavirus antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay in dogs in the south of Italy. *J. Virol. Methods* 102: 67-71.
7. Shiba, N., Maeda, K., Kato, H., Mochizuki, M., Iwata, H., 2007. Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test. *Vet. Microbiol.* 124: 348-352.
8. Soma, T., Ohinata, T., Aoki, E., Kurita, K., 2012. Prevalence of canine coronavirus and canine parvovirus type 2 infections in pet shop in Japan. *J. Anim. Clin. Med.* 21: 126-129.
9. Terada, Y., Matsui, N., Noguchi, K., Kuwata, R., Shimoda, H., Soma, T., Mochizuki, M., Maeda, K., 2014. Emergence of pathogenic coronaviruses in cats by homologous recombination between feline and canine coronaviruses. *PLoS ONE* 9: e106534.

Ngày nhận 11-12-2019

Ngày phản biện 22-1-2020

Ngày đăng 1-6-2020