

Parvovirus cũng tăng lên rất nhiều so với chó khỏe mạnh. Ở chó khỏe mạnh, GPT trung bình là $35,42 \pm 0,54 \mu\text{l}$; còn ở chó mắc bệnh do *Parvovirus* chỉ số GPT trung bình là $64,77 \pm 0,93 \mu\text{l}$; tăng hơn so với chó khỏe là $29,35 \mu\text{l}$ ($P < 0,05$). GPT có nhiều trong mô gan, việc kiểm tra định lượng GPT có ích trong chẩn đoán hoại tử gan.

- Urea (mmol/l)

Chỉ số urea huyết ở chó mắc bệnh $14,03 \pm 0,31 \text{ mmol/l}$; cao hơn chó bình thường ($6,36 \pm 0,14 \text{ mmol/l}$). Sự sai khác này có ý nghĩa thống kê sinh học ($P < 0,05$). Theo Đỗ Đình Hồ (2005), chỉ số urea huyết đánh giá thể tích huyết tương và áp suất máu. Chỉ số urea huyết tăng do xuất huyết tiêu hóa làm giảm áp suất máu hoặc giảm thể tích huyết tương, khi đó lưu lượng máu đến thận giảm, làm cho urea huyết tăng. Do khi chó nhiễm bệnh do *Parvovirus* cơ thể suy nhược, suy tim, làm cho lưu lượng máu đến thận giảm dẫn đến urea huyết tăng. Ngoài ra chó bị mất nước, ít tiểu cũng đều làm urea huyết tăng.

- Creatinine (mmol/l)

Creatinine là một chất có nito của máu ổn định nhất, sự tổng hợp nội sinh của nó không ảnh hưởng bởi chế độ ăn và sự thoái hóa protid (Đỗ Đình Hồ, 2005). Sự sản xuất creatinine hàng ngày thực tế chỉ phụ thuộc vào khối lượng của cơ bắp. Do đó thông thường khi bị các bệnh về cơ thì creatinine giảm. Kết quả bảng 6 cho thấy chỉ số creatinine ở chó khỏe là $68,72 \pm 1,05 \text{ mmol/l}$, ở chó mắc bệnh do *Parvovirus* chỉ số này là $35,87 \pm 0,96 \text{ mmol/l}$; giảm $32,85 \text{ mmol/l}$ ($P < 0,05$).

Khi chó nhiễm bệnh do *Parvovirus*, cơ thể chó suy nhược, khả năng tiêu hóa - hấp thu kém, suy gan, gan không tổng hợp được creatinine hàng ngày nên nồng độ creatinine giảm (Nguyễn Thế Khánh và Phạm Tử Dương, 2001).

- Hàm lượng đường huyết (mmol/l)

Để xác định sự thay đổi của hàm lượng đường huyết trong máu chó khỏe và chó mắc bệnh do *Parvovirus*, chúng tôi tiến hành đo trên máy glucometer, đơn vị tính mmol/l. Kết quả

trình bày ở bảng 6 cho thấy: Ở chó khỏe, hàm lượng đường huyết trung bình là $5,36 \pm 0,10 \text{ mmol/l}$. Khi chó mắc bệnh do *Parvovirus*, hàm lượng đường huyết giảm xuống còn $4,26 \pm 0,08 \text{ mmol/l}$, giảm $1,10 \text{ mmol/l}$ so với chó khỏe với $P < 0,05$. Hàm lượng đường huyết giảm như vậy theo chúng tôi là do chó mắc bệnh do *Parvovirus* chán ăn, bỏ ăn dẫn đến làm giảm nguồn cung cấp glucose từ ngoài vào cơ thể, ngoài ra niêm mạc đường tiêu hóa bị tổn thương ảnh hưởng đến quá trình tiêu hóa và hấp thu dinh dưỡng, trong khi đó quá trình viêm làm con vật sốt cao dẫn đến tiêu hao nhiều năng lượng nên glucose trong máu phải tăng cường chuyển hóa để cung cấp năng lượng cho cơ thể, do đó hàm lượng đường huyết giảm.

- Độ dự trữ kiềm (mg%)

Độ dự trữ kiềm trong máu là lượng muối NaHCO_3 tính bằng mg có trong 100 ml máu (mg%). Trong quá trình trao đổi chất, cơ thể sinh ra các loại acid là chủ yếu, các muối kiềm trong máu có thể trung hòa các loại acid đi vào máu, nhờ đó giữ cho độ pH trong máu không đổi. Qua bảng 6, độ dự trữ kiềm có sự khác nhau giữa chó khỏe và chó mắc bệnh do *Parvovirus*. Ở chó khỏe, độ dự trữ kiềm trung bình là $517,67 \pm 4,71 \text{ mg\%}$. Khi chó bị viêm ruột truyền nhiễm do *Parvovirus*, độ dự trữ kiềm giảm xuống còn $462,23 \pm 4,48 \text{ mg\%}$; giảm $55,44 \text{ mg\%}$ so với chó khỏe với $P < 0,05$. Kết quả này phù hợp với nhận định của Phạm Ngọc Thạch (2003) rằng trong quá trình bệnh lý kéo dài, con vật bị sốt, dẫn tới tăng trao đổi chất, sản sinh nhiều chất có tính acid làm thay đổi pH máu mà khả năng đệm của máu có hạn dẫn đến lượng kiềm dự trữ giảm hơn bình thường.

IV. KẾT LUẬN

Các triệu chứng thường gặp trong bệnh viêm ruột truyền nhiễm do *Parvovirus* là con vật mệt mỏi, ủ rũ, nôn mửa, ỉa chảy phân loãng lầy nhầy có lẫn máu tươi và có mùi rất đặc trưng, bỏ ăn, sốt.

Chó mắc bệnh do *Parvovirus* có thân nhiệt, tần số hô hấp và tần số nhịp tim cao hơn chó khỏe.

Các chỉ tiêu sinh lý máu có sự biến đổi

khi chó mắc bệnh viêm ruột truyền nhiễm do *Parvovirus*: Các chỉ tiêu hồng cầu, số lượng bạch cầu đều giảm so với chó khỏe. Công thức bạch cầu cũng có sự thay đổi; tỷ lệ bạch cầu trung tính tăng lên, trong khi đó số lượng các bạch cầu khác lại giảm đi.

Các chỉ tiêu sinh hóa máu theo dõi có sự thay đổi khi chó mắc bệnh viêm ruột truyền nhiễm do *Parvovirus*: GOP, GTP, urea tăng lên trong khi creatinine, hàm lượng đường huyết và độ dự trữ kiềm giảm xuống so với chó khỏe.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Trần Anh Đào, Bùi Thị Tố Nga, Vũ Thị Lễ, Nguyễn Trọng Tâm, Đào Hữu Trường, 2010. Một số đặc điểm huyết học ở chó mắc bệnh *Parvovirus*, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, 17 (4): 13 – 17.
- Nguyễn Ngọc Đình, Nguyễn Thị Vân Anh, 2012. Chỉ tiêu huyết học chó mắc bệnh do *Parvovirus*, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, 19 (8): 66 – 69.
- Đỗ Đình Hồ, 2005. Hóa sinh lâm sàng, *Nhà xuất bản Y học*, Hà Nội.
- Nguyễn Thế Khánh, Phạm Tử Dương, 2003. Xét nghiệm sử dụng trong lâm sàng. *Nhà xuất bản Y học*, Hà Nội.
- Hồ Văn Nam, Nguyễn Thị Đào Nguyên, Phạm Ngọc Thạch, 1997. Chẩn đoán lâm sàng thú y. *Nxb Nông nghiệp*, Hà Nội.
- Huỳnh Tấn Phát, 2001. *Khảo sát tình hình nhiễm và một số biến đổi bệnh lý do Parvovirus trong hội chứng ói mửa, tiêu chảy ra máu trên chó tại Thành phố Hồ Chí Minh*. Luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Nông lâm Tp HCM.
- Vũ Như Quán, 2012. Những đặc điểm sinh học cần biết khi khám, chữa bệnh cho chó. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, 19 (4): 64 – 74.
- Phạm Ngọc Thạch, 2003. Một số chỉ tiêu lâm sàng, phi lâm sàng ở chó bị viêm ruột ỉa chảy, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp*, 1 (2): 127 – 132.
- Bạch Quốc Tuyên, 1992. Huyết học, tập I. *Nhà xuất bản Y học*, Hà Nội.
- Nguyễn Xuân Tịnh, Tiết Hồng Ngân, Nguyễn Bá Mùi, Lê Mộng Loan, 1998. Giáo trình sinh lý gia súc. *Nxb Nông nghiệp*, Hà Nội.
- Mathios E Mylonakis, Iris Kalli, Timoleon S Ralis, 2016. Canine Parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment and prevention. *J of Veterinary Medicine*, 7: 91-100.
- Tatiana X. Castro, Rita de Cássia N. Cubel Garcia, Luciana P. S. Gonçalves, Erika M. Costa, Gracy C.G. Marcello, Norma V. Labarthe, Flavya Mendes-de-Almeida, 2013. Clinical, hematological, and biochemical findings in puppies with coronavirus and *Parvovirus* enteritis. *Can Vet J*, 54:885–888.
- Tion Matthew Terzungwe, 2018. Hematological parameters of dogs infected with canine *Parvovirus* enteritis in Sumy Ukraine. *World Journal of Innovative Research*, 5(3): 1-5.
- Waddill, D.G., Ullrey, D.E., 1992. Blood cell population and serum protein concentration in the fetal pig. *J. Anim. Sci*, 21(3): 583-587.

Ngày nhận 2-6-2020

Ngày phản biện 25-6-2020

Ngày đăng 1-12-2020

SO SÁNH CÁC PHƯƠNG PHÁP CHẨN ĐOÁN VÀ PHÂN LẬP VIRUS GÂY BỆNH GIẢM BẠCH CẦU TRÊN MÈO (*FELINE PANLEUKOPENIA VIRUS*)

Lê Văn Hùng, Lê Huỳnh Thanh Phương, Nguyễn Thị Yến,
Ngô Thị Hạnh, Nguyễn Quang Hưng, Bùi Quang Huy, Nguyễn Thị Ngọc
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là so sánh, lựa chọn phương pháp chẩn đoán và phân lập virus gây bệnh giảm bạch cầu mèo (*Feline panleukopenia virus*). Kết quả nghiên cứu cho thấy, kỹ thuật PCR có độ nhạy, chính xác cao hơn phương pháp ELISA (47,06% so với 40,20%). Tuy nhiên, thời gian chẩn đoán của phương pháp này dài hơn so với ELISA. Virus có khả năng nhân lên trên môi trường tế bào CRFK và gây bệnh tích điển hình (các tế bào co cụm và bong tróc khỏi bề mặt chai nuôi cấy). Bệnh tích tế bào xuất hiện sớm sau 4 giờ nuôi cấy và sau 32 giờ các tế bào bị phá hủy và bong tróc khỏi bề mặt chai nuôi cấy. Hiệu giá virus của các chủng đạt giá trị cao nhất sau 32 giờ nuôi cấy và kéo dài khoảng 4 giờ ($TCID_{50}/25\mu l$ dao động trong khoảng 10^8 đến 10^{11}).

Từ khóa: Chẩn đoán, virus gây giảm bạch cầu mèo, phân lập virus, hiệu giá virus.

Comparing the diagnostic and isolation methods for *Feline panleukopenia virus* (FPV)

Le Van Hung, Le Huynh Thanh Phuong, Nguyen Thi Yen,
Ngo Thi Hanh, Nguyen Quang Hung, Bui Quang Huy, Nguyen Thi Ngoc

SUMMARY

The objective of this study aimed at comparing the diagnostic and isolation methods for *Feline panleukopenia virus* (FPV). The studied results showed that the sensitivity level of PCR test were higher than that of ELISA test (47.06% and 40.20%, respectively). However, the time of diagnosis by PCR methods were longer than that of the ELISA test. Virus quickly replicated in such Crandall-Reese Feline Kidney (CRFK) cells and caused typical cytopathogenic effect (CPE) (cells clumped and sloughed from the bottoms of culture flask). FPV caused CPE in CRFK cells as early as 4 hours post inoculation (hpi) and after 32 hpi, almost of cells were detached from the surface of the culture flasks. The titer of virus ($TCID_{50}/25\mu l$) reached a peak at 32 hpi and over the period of 4 hours ($TCID_{50}/25\mu l$ fluctuation from 10^8 to 10^{11}).

Keywords: Diagnosis, *Feline panleukopenia virus*, isolation, the titer of virus.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Giảm bạch cầu trên mèo là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm do *Feline panleukopenia virus* (FPV) gây nên và thường lan truyền giữa mèo nhà với mèo hoang. Triệu chứng lâm sàng chủ yếu của bệnh là suy nhược cơ thể, nôn, tiêu chảy, mất nước; tỷ lệ tử vong cao. Số lượng bạch

cầu giảm rõ rệt, làm suy giảm hệ miễn dịch, gây bội nhiễm, kể phát các bệnh khác. Virus xâm nhập vào cơ thể theo đường mũi, nhanh chóng tấn công vào các tế bào bạch huyết và tế bào đang phân chia, đặc biệt là biểu mô ruột non, mô lympho và tế bào tủy xương (Bennet và Gaskell., 1996; Cave và cs., 2002). Năm 2009, các nhà khoa học đã tiến hành nghiên cứu ứng

dụng phương pháp ELISA trong chẩn đoán bệnh (Abd-Eldaim và cs., 2009); đến năm 2014, các nhà khoa học tại Đức cũng ứng dụng phương pháp này trong giám sát dịch bệnh tại đây (Mende và cs., 2014); sau đó phương pháp này cũng được ứng dụng tại Australia (Westman và cs., 2019). Năm 2016, Iraq đã nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật PCR trong chẩn đoán bệnh tại đất nước này; đây là phương pháp có độ nhạy, độ chính xác cao (Bayati, 2016). Cho đến nay, các nhà khoa học trên thế giới đã tiến hành giải mã gen của virus và xác định mối tương quan giữa virus gây bệnh giâm bạch cầu và virus gây bệnh viêm ruột truyền nhiễm trên chó (Ahmed và cs., 2018).

Tại Việt Nam trong những năm gần đây, phong trào chăn nuôi thú cảnh đang phát triển mạnh cả về số lượng và quy mô chăn nuôi; trong đó có cả chó, mèo nhập ngoại. Theo Tổng cục Thống kê Việt Nam; cả nước có khoảng hơn 10 triệu đầu chó, mèo; chiếm khoảng 2% tổng động vật nuôi trong cả nước (Tổng cục Thống kê, 2020). Tuy nhiên, cùng với sự phát triển của lĩnh vực này là sự bùng phát của dịch bệnh, đặc biệt là một số bệnh truyền nhiễm trên chó, mèo như bệnh Ca-rê (Canine Distemper), *Parvovirus* trên chó, bệnh viêm mũi khí quản truyền nhiễm (Feline Rhinotracheitis), bệnh hô hấp do *Calicivirus* gây nên..., trong đó phải kể đến bệnh truyền nhiễm do *Feline panleukopenia virus* gây nên trên mèo. Mặc dù dịch bệnh diễn biến rất phức tạp, tỷ lệ mắc bệnh cao dù đã được tiêm vaccin phòng bệnh, tỷ lệ tử vong lớn; nhưng việc ứng dụng các phương pháp chẩn đoán trong phòng xét nghiệm còn nhiều hạn chế và chưa được quan tâm đúng mức mà chủ yếu dựa vào kết test nhanh; chưa xác định được đặc tính gây bệnh của virus trên bản động vật tại ổ dịch. Do vậy, nghiên cứu lựa chọn phương pháp chẩn đoán và bước đầu xác định khả năng sinh trưởng và phát triển của virus gây bệnh giâm bạch cầu ở mèo trên môi trường tế bào, tạo tiền đề cho việc nghiên cứu các đặc tính sinh học, sinh học phân tử, tiến tới lựa chọn các chủng tiềm năng sản xuất chế phẩm sinh học, vaccin phòng bệnh là cần thiết và cấp bách trong bối cảnh hiện nay tại Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu được sử dụng trong nghiên cứu này gồm: dịch nôn, máu, phân, ruột của mèo mắc hoặc nghi mắc bệnh giâm bạch cầu.

Môi trường hóa chất sử dụng trong nghiên cứu: sử dụng bộ kit thương mại (The antigen rapid FPV Ag test kit, Bionote Inc., Hàn Quốc); kit chiết tách DNA QIAamp DNA mini kit (QIAGEN Inc., Mỹ), GoTaq PCR green (Promega, Mỹ), kit chiết tách RNA QIAamp RNA mini kit (QIAGEN Inc., Mỹ), PBS (Kitazato, Nhật Bản).

Trang thiết bị cần thiết khác trong phòng thí nghiệm sử dụng trong nghiên cứu gồm có: Kính hiển vi quang học, tủ ẩm CO₂, cabinet vô trùng, đĩa lòng, đĩa nuôi cấy tế bào, eppendorff, đầu type, pipette kích cỡ khác nhau, máy PCR, máy điện di, máy Vortex, tủ lạnh dương, tủ lạnh âm 86°C, dụng cụ bảo hộ lao động...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp PCR (Polymerase chain reaction)

DNA được chiết tách từ bộ kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN Inc., Mỹ) theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.

DNA chuẩn được chiết tách từ chủng vaccin phòng 4 bệnh cho mèo Felocell® của hãng Zoetis.

Kỹ thuật PCR được dùng để khuếch đại đoạn gen VP2 của FPV, với cặp mồi F: 5'-ACAAGATAAAAGACGTGGTGTA ACTCA-3', R: 5'-AATGGGAAATACAGACTATAT-3', sản phẩm PCR có độ dài 83 bp (Decaro và cs., 2008). Thành phần của phản ứng PCR gồm: 5,5µl nuclease-free water; 12,5µl GoTaq green; 1µl reverse primer; 1µl forward primer; 5µl khuôn mẫu DNA. Chu trình nhiệt được thực hiện gồm 3 bước: tiền biến tính ở 95°C trong 5 phút; chu kỳ lặp lại 35 lần: biến tính ở 95°C trong 50 giây,

gắn mỗi ở 55°C trong 30 giây, tổng hợp kéo dài ở 72°C trong 30 giây; hoàn thành ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel 1,2% (TBE 1X) với thang DNA chuẩn (marker). Sử dụng nguồn điện di ở hiệu điện thế 100V, cường độ 100 mA, trong 35 phút.

2.2.2. *Kít chẩn đoán nhanh*

Tất cả các mèo nghi ngờ đều được lấy dịch hầu/họng, dịch nôn, phân để xác định kháng nguyên FPV bằng kít thương mại (The antigen rapid FPV Ag test kit, Bionote Inc., Hàn Quốc). Bộ kít dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch sandwich với nguyên tắc kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể, trong đó kháng thể được gắn với một enzyme. Khi cho thêm cơ chất thích hợp vào phản ứng, enzyme sẽ thủy phân cơ chất thành một chất có màu. Sự xuất hiện màu chứng tỏ đã xảy ra phản ứng đặc hiệu giữa kháng thể với kháng nguyên và thông qua cường độ màu mà biết được nồng độ kháng nguyên cần phát hiện.

Diễn giải kết quả: (1) phản ứng dương tính khi cả vạch C và T đều hiện màu, (2) phản ứng âm tính nếu chỉ có vạch C hiện màu, kết luận không có kháng nguyên FPV, (3) phản ứng không hợp lệ khi vạch C không hiện màu cho dù vạch T hiện màu hay không.

2.2.3. *Phân lập virus*

Mẫu bệnh phẩm ruột được nghiên cứu với môi

trường để tạo thành dung dịch huyền phù 10%, tiến hành đông tan một lần. Dung dịch huyền phù được chiết tách bằng cách pha cùng thể tích với dung dịch chloroform. Ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút, phần nổi phía trên được lọc qua màng lọc có đường kính lỗ lọc 0,22 µl. Dịch lọc được nuôi cấy vào trong môi trường tế bào CRFK (Crandall-Reese Feline Kidney) khoảng 45 phút sau khi lắng đều chúng trong bình. Các tế bào sau khi nuôi cấy được thử nghiệm bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu lợn. Kết quả thử nghiệm không làm kết tủa các tế bào hồng cầu lợn chứng tỏ virus đã nhân lên trên môi trường tế bào (Kapil và cs., 2007). Quá trình nhân lên của virus trên môi trường tế bào được khẳng định lại bằng kỹ thuật PCR (Decaro và cs., 2008). TCID₅₀ được tính toán theo phương pháp của Spearman-Kaber.

2.2.4. *Xử lý dữ liệu*

Các tỷ lệ được tính toán trong phần mềm Excel và phần mềm Minitab 16.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. *Kết quả chẩn đoán bệnh giảm bạch cầu trên mèo bằng kỹ thuật PCR và kít test nhanh*

102 mẫu thu thập được được chẩn đoán bằng hai phương pháp PCR và kít test nhanh để đánh giá độ nhạy, chính xác của từng phương pháp.

Bảng 1. Kết quả chẩn đoán bệnh giảm bạch cầu trên mèo bằng kỹ thuật PCR và ELISA

Thông tin mẫu		Chẩn đoán PCR			Chẩn đoán ELISA		
Nhóm tuổi (tháng)	Số lượng (mẫu)	Số dương (mẫu)	Tỷ lệ (%)	P	Số dương (mẫu)	Tỷ lệ (%)	P
0 đến 6	45	29	64,44	0,01	25	55,56	0,02
7 đến 12	29	11	37,93	0,01	9	31,03	0,02
Trên 12	20	3	15,00	0,01	1	5,00	0,02
Không rõ độ tuổi	8	5	62,50	0,01	6	75,00	0,0
Tổng	102	48	47,06	0,01	41	40,20	0,02

Bảng 1 cho thấy 25 trong tổng số 45 mẫu thu thập ở mèo từ 0 đến 6 tháng tuổi phát hiện

thấy kháng nguyên gây bệnh giảm bạch cầu khi kiểm tra bằng kít test nhanh, chiếm tỷ lệ



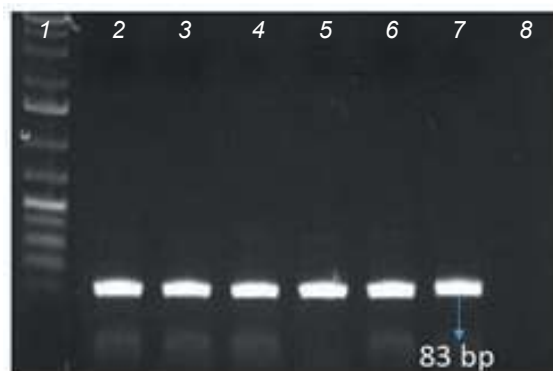
Hình 1. Dấu hiệu lâm sàng và kết quả chẩn đoán bệnh bằng kỹ thuật ELISA

A-1, A-2: Kết quả chẩn đoán âm tính; B-1, B-2: kết quả chẩn đoán dương tính và triệu chứng lâm sàng của bệnh

khoảng 55,56% (khoảng 24,51% tổng số mẫu chẩn đoán). 9/29 mẫu cho kết quả dương tính ở nhóm mèo từ 7 đến 12 tháng tuổi (31,03%). Mẫu thu thập ở mèo trên 12 tháng tuổi, nhóm nghiên cứu phát hiện thấy 1 trong tổng số 20 mẫu có kháng nguyên virus khi chẩn đoán bằng kỹ thuật này; chiếm 5,00%. Tuy nhiên, đối với nhóm mèo không rõ độ tuổi (mèo hoang, mèo qua nhiều chủ, mèo mua online...), tỷ lệ nhiễm bệnh tương đối cao (75,00%) (hình 1). Sự sai khác này có ý nghĩa thống kê khi $P < 0,05$.

Bằng kỹ thuật PCR, 29 trong tổng số 45 mẫu thu thập ở mèo từ 0 đến 6 tháng tuổi phát hiện thấy DNA của virus gây bệnh giảm bạch cầu; chiếm tỷ lệ 64,44% (xấp xỉ 28,43% tổng số mẫu thu thập). Trong khi đó, nhóm mèo từ 7 đến 12 tháng tuổi cũng chiếm tỷ lệ tương đối cao khi 11 trong số 29 mẫu chẩn đoán phát hiện thấy DNA của virus (khoảng 37,93%). 3/20 mẫu thu được ở mèo trên 12 tháng tuổi phát hiện thấy yếu tố di truyền của virus khi chẩn đoán bằng kỹ thuật

này (15,00%). Tuy nhiên, tỷ lệ mèo nhiễm bệnh ở nhóm tuổi này thấp hơn so với nhóm không xác định được tuổi (62,50%) (hình 2). Sự sai khác này có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.



Hình 2. Kết quả chẩn đoán bệnh bằng kỹ thuật PCR

Giếng 1: DNA marker (100bp); Giếng 7: đối chứng dương; Giếng 8: đối chứng âm; Giếng 2, 3, 4, 5, 6: các mẫu cần chẩn đoán

Theo chúng tôi, sở dĩ có sự sai khác trên

có thể do: (1) môi trường chăn nuôi, công tác vệ sinh phòng bệnh, phương thức chăn nuôi an toàn sinh học tại Việt Nam chưa được áp dụng triệt để, quá trình tiêm vacxin phòng bệnh cho đàn vật nuôi chưa đồng bộ (chủ yếu tiêm phòng cho mèo nhập ngoại giá trị kinh tế cao); (2) hệ miễn dịch của mèo non phát triển chưa hoàn thiện, hàm lượng kháng thể mẹ truyền chưa đủ bảo hộ dưới áp lực của môi trường chăn nuôi, lượng kháng thể thụ động do tiêm vacxin cơ thể chưa kịp sản sinh để trung hòa lượng kháng nguyên xâm nhập từ môi trường bên ngoài; (3) mèo không rõ độ tuổi, nguồn gốc, lịch sử bệnh là một trong những nguyên nhân làm lan truyền dịch bệnh trong cộng đồng do con vật mang trùng.

Về sự sai khác giữa hai kỹ thuật chẩn đoán trong nghiên cứu, nhóm tác giả cho rằng, phương pháp sử dụng kit phát hiện kháng nguyên mặc dù cho kết quả chẩn đoán nhanh, nhưng độ nhạy không cao. Nếu hàm lượng virus không đủ lớn hoặc kỹ thuật lấy mẫu không tốt, kit test cho vạch mờ (hoặc không cho vạch); khi đó cho kết quả âm tính nhưng thực chất con vật đã mang mầm bệnh. Với kỹ thuật PCR, đây là kỹ thuật hiện đại, được ứng dụng nhiều trong phòng chẩn đoán xét nghiệm, có độ nhạy, độ chính xác cao, có khả năng phát hiện tác nhân di truyền ở nồng độ thấp; tuy nhiên kỹ thuật này có chi phí cao, thời gian đọc kết quả dài (2 đến 3 giờ) nên chưa được áp dụng nhiều trong chẩn đoán bệnh trên thú cảnh, trong đó có mèo.

Năm 2011, các nhà khoa học ở Mỹ đã nghiên cứu hiệu giá kháng thể có khả năng bảo hộ mèo chống lại tác nhân gây bệnh sử dụng kỹ thuật ELISA; tuy nhiên độ nhạy của phương pháp này khá thấp, khó có thể áp dụng trong quá trình kiểm soát sự bùng phát của dịch bệnh (DiGangi và cs., 2011). Đến năm 2018, khi nghiên cứu so sánh giữa hai kỹ thuật chẩn đoán ELISA và PCR, Awad và cs. cho biết 66/165 mẫu cho kết quả dương tính khi chẩn đoán bệnh giảm bạch cầu mèo bằng kỹ thuật ELISA; trong khi cũng những mẫu kể trên, có 75 mẫu cho kết quả dương tính khi chẩn đoán bệnh bằng kỹ thuật PCR. Mặc dù độ nhạy của phản ứng ELISA chiếm khoảng 88% (Awad và cs., 2018); nhưng đây vẫn là phương pháp có độ chính xác cao khi phát hiện kháng nguyên định tính từ phân của mèo nghi mắc bệnh và có thể sử dụng phương pháp này trong chẩn đoán sàng lọc bệnh (Abd-Eldaim và cs., 2009; Tizard., 1996). Cũng theo Abd-Eldaim và cs. (2009) cho biết, hầu hết những mẫu cho kết quả âm tính với phương pháp ELISA thì cho kết quả dương tính với PCR. Kết quả này cũng cho thấy độ nhạy cao của phương pháp PCR so với phương pháp ELISA và các phương pháp chẩn đoán khác.

3.2. Phân lập *Feline panleukopenia virus* (FPV)

Khả năng gây bệnh tích của 5 chủng virus FPV trên môi trường tế bào CRFK.

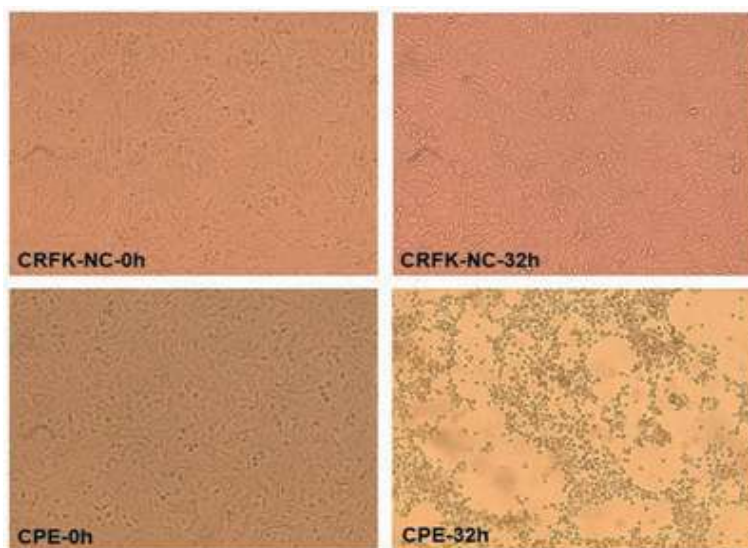
Bảng 2. Khả năng gây bệnh tích tế bào của các chủng FPV phân lập

Chủng virus	Thời gian (hpi) gây bệnh tích tế bào (CPE%)									
	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
Vnua-Fpv-07	*	15	30	35	45	60	85	100	B	
Vnua-Fpv-23	5	20	30	45	65	90	100	B		
Vnua-Fpv-28	-	10	20	35	60	75	85	95	100	B
Vnua-Fpv-63	*	10	25	40	55	70	90	100		
Vnua-Fpv-87	-	5	15	30	45	60	75	90	10	

Ghi chú: (-): chưa có bệnh tích tế bào (CPE - Cytopathologic Effects); (*): CPE dưới 5%; B: Tế bào bong tróc hoàn toàn khỏi bề mặt nuôi cấy; hpi: hour post inoculation (giờ sau gây nhiễm virus).

Bảng 2 cho thấy: 8 giờ sau khi gây nhiễm chủng Vnua-Fpv-07, khoảng 15% tế bào bị phá hủy, sau 24 giờ tỷ lệ này tăng trên 50% và sau 32 giờ 100% số lượng tế bào bị phá hủy và bong tróc khỏi bề mặt chai nuôi cấy sau 36 giờ. Một quá trình tương tự đối với chủng Vnua-Fpv-63; sau 8 giờ nuôi cấy xấp xỉ 10% số lượng tế bào bị phá hủy; sau 24 giờ nuôi cấy, 70% lượng tế bào bị phá hủy, cao hơn chủng Vnua-Fpv-07 (60%). Đối với Vnua-Fpv-23, thời gian gây bệnh tích tế bào mạnh hơn so với các chủng còn lại, sau 4 giờ gây nhiễm có khoảng 5% số lượng tế bào đã bị phá hủy, tỷ lệ này tăng mạnh và đạt khoảng 65% sau 20 giờ gây nhiễm và đạt 100% sau 28 giờ, các tế bào bị bong tróc hoàn toàn khỏi bề mặt chai nuôi cấy chỉ sau 32 giờ gây nhiễm. Trong khi đó, chủng Vnua-Fpv-28 phá hủy 10% tế bào sau 8 giờ gây nhiễm; tuy nhiên, tốc độ nhân lên và phá hủy tế bào của chủng này tương đối chậm; sau 20 giờ gây nhiễm, tỷ lệ tế bào bị phá hủy đạt 60%, sau 36 giờ, 100% tế bào mới bị phá hủy và bong tróc khỏi bề mặt chai nuôi cấy lúc 40 giờ. Tương tự, chủng Vnua-Fpv-87 sau 8 giờ gây nhiễm chỉ có xấp xỉ 5% lượng tế bào bị phá hủy và bong tróc khỏi bề mặt chai

nuôi cấy (tỷ lệ này thấp hơn khoảng 5% so với chủng Vnua-Fpv-28). Sau 20 giờ gây nhiễm, lượng tế bào bị phá hủy đạt khoảng 45%; đến 28 giờ sau gây nhiễm, lượng tế bào này tăng chạm ngưỡng 75% và sau 36 giờ gây nhiễm 100% tế bào bị phá hủy, bong tróc khỏi bề mặt tế bào; các tế bào bị phá hủy, bong tróc hoàn toàn khỏi bề mặt chai nuôi cấy sau 40 giờ nuôi cấy (hình 3). Theo nhóm tác giả, các chủng virus khác nhau sẽ mang đặc tính sinh học không giống nhau. Trong giai đoạn đầu sau gây nhiễm, virus trải qua giai đoạn hấp phụ vào bên trong tế bào, lấy nguyên sinh chất của tế bào, nhân lên làm cho tế bào co cụm lại rồi trương phình lên, sau đó tế bào vỡ ra và giải phóng virus. Độc lực của virus càng lớn thì tốc độ hấp phụ, nhân lên và phá hủy tế bào càng mạnh, thời gian biểu hiện bệnh tích tế bào quan sát được qua kính hiển vi quang học càng ngắn (chủng Vnua-Fpv-23) và ngược lại. Trong nghiên cứu, nhóm tác giả đã xác định được 3 chủng virus có khả năng gây bệnh tích tế bào tương đối nhanh, mạnh, là tiền đề cho nghiên cứu chọn lọc chủng giống sản xuất vaccin, chế phẩm sinh học phòng bệnh.



Hình 3. Kết quả phân lập Feline panleukopina virus trên môi trường tế bào CRFK
 NC: đối chứng tế bào thời điểm bắt đầu thí nghiệm (0 giờ) và sau 32 giờ thí nghiệm; CPE: bệnh tích tế bào thời điểm bắt đầu gây nhiễm và sau 32 giờ gây nhiễm

Truyen và Parrish (1992) khi nghiên cứu điều kiện thích hợp cho quá trình nhân lên của CPV và FPV cho biết, FPV có thể nhân lên trên môi trường tế bào mèo trong điều kiện phòng thí nghiệm và trên thực nghiệm. Trong khi đó, CPV-2 có khả năng nhân lên trên môi trường tế bào chó, mèo trong điều kiện phòng thí nghiệm; nhưng không có khả năng gây bệnh cho mèo ngoài thực nghiệm. Cũng theo Truyen và cs. (2000), nghiên cứu hồi cứu 3 chủng FPV nhằm xác định đặc tính sinh học phân tử và tổn thương bệnh lý cho biết, FPV có khả năng gây thoái hóa tế bào sau 5 ngày gây nhiễm so với đối chứng tế bào. Năm 2010, khi nghiên cứu xác định một số đặc điểm của FPV phân lập từ loài khỉ mắc

bệnh tiêu chảy, tác giả cho biết có thể quan sát được bệnh tích điển hình trong quá trình phân lập virus trên môi trường tế bào F18 với kích thước hạt virus từ 20-24 nm nằm đối xứng nhau dưới dạng hình khối rất đặc trưng của bệnh. Tuy nhiên, nhóm tác giả lại không quan sát thấy bệnh tích tế bào trong quá trình phân lập virus trên môi trường Vero và DK (Yang và cs., 2010). Một nghiên cứu về quá trình phân lập FPV trên môi trường tế bào CRFK cho thấy, bệnh tích tế bào của chủng FPV được quan sát thấy trên môi trường tế bào sau 3 đời cấy truyền; các tế bào nhiễm FPV co cụm lại tạo thành khoảng trống trên bề mặt chai nuôi cấy và quan sát thấy dưới kính hiển vi quang học (Leal và cs., 2020).

Bảng 3. Hiệu giá của các chủng *Feline panleukopina virus* phân lập theo thời gian

Hpi	Hiệu giá của các chủng virus (TCID ₅₀)				
	Vnua-Fpv-07	Vnua-Fpv-23	Vnua-Fpv-28	Vnua-Fpv-63	Vnua-Fpv-87
8	2,08x10 ²	3,16x10 ³	1,16x10 ¹	1,08x10 ²	1,08x10 ¹
12	2,16x10 ⁵	3,16x10 ⁶	1,16x10 ³	2,08x10 ⁵	1,08x10 ³
16	2,08x10 ⁶	3,16x10 ⁷	1,16x10 ⁵	2,16x10 ⁶	1,08x10 ⁵
20	2,08x10 ⁷	3,16x10 ⁸	1,16x10 ⁶	2,16x10 ⁷	1,08x10 ⁶
24	5,45x10 ⁸	6,81x10 ¹⁰	3,16x10 ⁷	3,16x10 ⁹	2,16x10 ⁷
28	5,45x10 ⁹	6,81x10 ¹⁰	3,16x10 ⁷	3,16x10 ⁸	2,16x10 ⁷
32	1,16x10 ¹⁰	1,47x10 ¹¹	1,16x10 ⁸	1,08x10 ⁹	1,08x10 ⁸
36	1,08x10 ¹⁰	3,16x10 ¹¹	1,16x10 ⁸	2,16x10 ⁹	1,08x10 ⁸
40	2,08x10 ⁹	3,16x10 ¹⁰	2,16x10 ⁸	2,16x10 ⁸	2,08x10 ⁷

Ghi chú: hpi: giờ sau gây nhiễm

3.3. Hiệu giá của các chủng *Feline panleukopina virus* (TCID₅₀)

Trong nghiên cứu, nhóm tác giả đã tiến hành xác định liều gây nhiễm MOI=0,001 và đánh giá TCID₅₀ của các chủng theo thời gian (bảng 3). Tại thời điểm 8 giờ sau gây nhiễm, hiệu giá virus của chủng Vnua-Fpv-07 đạt 2,08x10²; giá trị này liên tục tăng, đạt cực đại tại thời điểm 32 giờ sau gây nhiễm và duy trì trong thời gian 4 giờ (1,16x10¹⁰); sau 40 giờ gây nhiễm, giá trị này có xu hướng giảm xuống ngưỡng 2,08x10⁹.

Tương tự, hiệu giá chủng virus Vnua-Fpv-63 đạt 1,08x10² sau 8 giờ gây nhiễm và tiếp tục tăng đạt giá trị cao nhất tại thời điểm 24 giờ sau gây nhiễm (3,16x10⁹). Tuy nhiên giá trị này không ổn định, sau 28 giờ gây nhiễm, TCID₅₀ của chủng giảm xuống 3,16x10⁸ và sau đó đạt cực đại và duy trì trong thời gian 4 giờ, sau đó có xu hướng giảm sau 40 giờ gây nhiễm (2,16x10⁸). Chủng virus Vnua-Fpv-23 có giá trị TCID₅₀ cao nhất và ổn định trong thời gian dài. Tại thời điểm sau gây nhiễm 8 giờ, giá trị này của chủng đạt 3,16x10³ và liên tục tăng mạnh sau 32 giờ gây nhiễm, duy