

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA VIRUS PED (PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS)

Nguyễn Thị Hoa*, Nguyễn Thị Lan, Trương Quang Lâm, Trịnh Đình Thâu, Ngô Thị Hạnh

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email: hoanguyen2405@gmail.com*

Ngày gửi bài: 08.12.2017

Ngày chấp nhận: 21.05.2018

TÓM TẮT

Virus PED (PEDV) gây tiêu chảy cấp trên lợn và đặc biệt nguy hiểm đối với lợn con theo mẹ. Nghiên cứu phân lập PEDV là tiền đề tốt cho các nghiên cứu về sản xuất vắc xin hay các chế phẩm sinh học trong phòng và trị bệnh. Vì vậy việc lựa chọn được điều kiện thích hợp cho phân lập PEDV và xác định một số đặc điểm sinh học của các chủng PEDV phân lập ở Việt Nam là vô cùng cần thiết. Mẫu ruột non của lợn được chẩn đoán dương tính với PED dựa trên kỹ thuật RT-PCR và dòng tế bào Vero được sử dụng cho nghiên cứu này. Các chủng PEDV phân lập được xác định hiệu giá virus và dựng đường cong sinh trưởng. Kết quả đã phân lập thành công 13 PEDV từ 83 mẫu bệnh phẩm. Môi trường phân lập có bổ sung 10 µg/ml trypsin là thích hợp cho phân lập virus. PEDV thích ứng và gây bệnh tích tế bào bắt đầu ở đời cấy chuyển thứ 2. Bệnh tích tế bào biểu hiện rõ với các đám tế bào bị dung giải màng, nhân tế bào co cụm lại với nhau hình thành các thể hợp bào. Bệnh tích tế bào xuất hiện ở 12 giờ sau gây nhiễm và tế bào bị phá hủy hoàn toàn sau 36 - 48 giờ gây nhiễm. Hiệu giá virus ở đời đầu tiên khi xuất hiện bệnh tích tế bào đạt từ $10^{3,4}$ TCID₅₀/ml đến $10^{5,7}$ TCID₅₀/ml. Sau 4 đời cấy chuyển liên tiếp hiệu giá virus có xu hướng tăng đạt từ $10^{5,3}$ TCID₅₀/ml đến $10^{7,3}$ TCID₅₀/ml.

Từ khóa: Virus gây tiêu chảy thành dịch, phân lập virus, đặc điểm sinh học.

Isolation and Identification of Biological Characteristics of Porcine Epidemic Diarrhea Virus

ABSTRACT

Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) causes acute diarrhea in pigs and this is especially dangerous for piglets. Isolation of PEDV is a pre-requisite for research on production of vaccines or bioformulations in the prevention and treatment of the disease. Small intestines of pigs diagnosed positively with PEDV based on RT-PCR method and vero cell lines were used for this study. PEDV isolations were determined for the viral titre and the growth curve. A total of 13 PEDV strains were successfully isolated from 83 disease samples. The medium containing 10µg/ml trypsin was suitable for viral isolation. PEDV was permissive for replication and caused disease at the beginning of the second culture passage. Infected vero cell cultures exhibited characteristics CPE by cell-fusion and syncytial formation. CPE occurred at 12 hours post infection and the cells were completely destroyed after 36 to 48 hours of infection. In the first passage, CPE viral titre ranged from $10^{3,4}$ to $10^{5,7}$ TCID₅₀/ml but after 4 culture passages, the viral titre increased from $10^{5,3}$ to $10^{7,3}$ TCID₅₀/ml.

Keywords: Porcine epidemic diarrhea virus, virus isolation, biological characteristics.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

PEDV (Porcine epidemic diarrhea virus) là một loại virus thuộc họ Coronaviridae, virus gây tiêu chảy cấp trên lợn và đặc biệt nguy

hiểm đối với lợn con theo mẹ (Tyrrell *et al.*, 1978). Ở Châu Âu, virus được tìm thấy lần đầu tiên ở Anh và Bỉ năm 1978 (Wood, 1977; Chasey and Cartwright, 1978; Pensaert & De Bouck, 1978; Debouck *et al.*, 1981), sau đó nó nhanh

chóng lan rộng ra nhiều nước. Ở Mỹ, Canada và Mexico virus gây dịch tiêu chảy ở lợn (PED) được phát hiện vào năm 2013 - 2014 và gây ra thiệt hại kinh tế đáng kể cho người chăn nuôi lợn tại đây (Stevenson *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Jung & Saif, 2015). Ở khu vực châu Á, virus được báo cáo ở Trung Quốc năm 1973 (Li *et al.*, 2012), Nhật năm 1983 (Takahashi *et al.*, 1983), Hàn Quốc năm 1992 (Kweon *et al.*, 1993), Thái Lan năm 2007 (Puranaveja *et al.*, 2009). Tại Việt Nam PED là một bệnh mới nổi được công bố lần đầu tại một số tỉnh phía Nam từ cuối năm 2008 đến đầu năm 2009 (Duy *et al.*, 2011) và ở phía Bắc năm 2012 (Nguyễn Văn Điệp và cs., 2014).

Việc phân lập và xác định được các đặc điểm sinh học của các chủng PEDV lưu hành ở Việt Nam là rất quan trọng để có thể phát triển nghiên cứu sản xuất các loại vacxin nhược độc hoặc bất hoạt phục vụ công tác phòng chống và kiểm soát dịch bệnh hiệu quả. Tuy nhiên các nghiên cứu về phân lập PEDV được các tác giả trên thế giới thực hiện theo nhiều cách thức khác nhau, trong đó Hofmann & Wyler. (1988) và Kusanagi *et al.* (1992) đã tiến hành cấy chuyển 3 đời liên tiếp PEDV trong môi trường có bổ sung 10 µg/ml trypsin, Chen *et al.* (2014) và Kweon *et al.* (1993) tiến hành cấy chuyển 4 đời liên tiếp trong môi trường có bổ sung 5 µg/ml trypsin, Chung *et al.* (2015) cấy chuyển 5 đời liên tiếp trong môi trường không bổ sung trypsin, Pan *et al.* (2012) cấy chuyển 7 đời liên tiếp trong môi trường có bổ sung 10 µg/ml trypsin. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định được điều kiện thích hợp cho phân lập PEDV ở Việt Nam và một số đặc điểm sinh học của các chủng PEDV phân lập được, góp phần cung cấp chủng giống PEDV phục vụ sản xuất vacxin cũng như các chế phẩm sinh học hay kit chẩn đoán.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Mẫu ruột non của lợn được chẩn đoán dương tính với PEDV bảo quản ở nhiệt độ -80°C

- Hóa chất, dụng cụ, trang thiết bị phục vụ nghiên cứu bao gồm: tế bào Vero, môi trường nuôi cấy tế bào DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Corning), huyết thanh bào thai bò (FBS-Gibco), trypsin (sigma), tryptose phosphate broth (TPB-sigma), phosphate buffer saline (PBS-Life technologies), dịch chiết nấm men (Yeast Extract-Merk), các kit tách chiết RNA (Qiagen), kit RT-PCR (Invitrogen), tủ cấy an toàn sinh học cấp II, tủ ấm CO₂, máy PCR, máy điện di, máy ly tâm, máy vortex, bình nuôi cấy tế bào, khay 96 giếng, pipet các loại, đầu tip các loại, ống ly tâm 15 ml và 50 ml, ống eppendorf...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Tiến hành thí nghiệm phân lập PEDV trên tế bào vero trong 3 điều kiện khác nhau đó là: môi trường nuôi cấy không bổ sung trypsin, bổ sung 5 µg/ml trypsin và bổ sung 10 µg/ml trypsin. Các mẫu bệnh phẩm được cấy chuyển liên tục 9 đời trên môi trường tế bào Vero trong 3 điều kiện trên để có kết quả phân lập cuối cùng.

2.2.2. Nuôi cấy tế bào Vero

Môi trường DMEM có 10% FBS được làm ấm trong tủ ấm 37°C trong 30 phút trước khi lấy tế bào ra nuôi cấy. Tế bào vero bảo quản trong ni tơ lỏng được giải đông nhanh bằng bể ổn nhiệt. Tế bào sau giải đông được chuyển vào ống ly tâm có chứa 5 ml môi trường DMEM. Ly tâm 1.500 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 5 ml môi trường DMEM có 10% FBS. Giữ tế bào ở 37°C với 5% CO₂ hàng ngày theo dõi sự phát triển của tế bào. Cấy chuyển tế bào khi tế bào mọc một lớp ở bình nuôi cấy.

2.2.3. Phân lập virus

Bước một: Tế bào vero được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung 10% FBS (Fetal bovine serum), giữ tế bào ở 37°C với 5% CO₂, khi tế bào mọc vừa kín đáy bình thì tiến hành gây nhiễm virus.

Bước hai: Mẫu bệnh phẩm là ruột non của lợn mắc PED được xử lý theo quy trình sau. Ruột nghiền bằng chày cối vô trùng, pha loãng trong DMEM theo tỉ lệ 1 : 5. Ly tâm huyền dịch ở điều kiện 10.000 vòng/10 phút/4°C loại bỏ cặn, xử lý kháng sinh dịch nổi và lọc qua màng lọc có đường kính lỗ lọc 0,22 µm, sau đó gậy nhiễm lên môi trường tế bào Vero.

Bước ba: Tế bào đã chuẩn bị ở bước một được loại bỏ môi trường nuôi cấy và bổ sung 100µl mẫu bệnh phẩm đã chuẩn bị ở bước hai. Tiến hành ủ trong thời gian 60 phút ở 37°C sau đó bổ sung 5 ml môi trường phân lập gồm (DMEM có TPB (0,3%), dịch chiết nấm men (0,02%), và trypsin (theo các nồng độ ở bố trí thí nghiệm) để ở 37°C với 5% CO₂. Hàng ngày theo dõi bệnh tích 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 tế bào thì thu lại tế bào và môi trường nuôi cấy, đông tan 3 lần ở nhiệt độ phòng. Tiến hành cấy chuyển 9 đời liên tiếp để thu được kết quả phân lập cuối cùng.

2.2.4. Phương pháp RT-PCR

RNA tổng số được tách chiết bằng Kit Qiagen, các bước tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. RNA sau tách chiết được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Mẫu RNA sau khi tách chiết sẽ được hỗn hợp với các thành phần phản ứng của Kit Invitrogen được trình bày ở bảng 1.

Sử dụng các cặp mồi chẩn đoán phát hiện virus gây tiêu chảy trên lợn có trình tự như bảng 2.

Điện di kiểm tra sản phẩm PCR: Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,2%. Điện di ở hiệu điện thế 100V cường độ 100 mA, thời gian điện di trong 30 phút. Kết thúc điện di, bản gel được lấy ra nhuộm Red gel trong khoảng 5 - 7 phút. Sau khi nhuộm, bản gel 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 mồi, mẫu âm tính khi không có sản phẩm DNA.

Bảng 1. Thành phần phản ứng RT- PCR

Thành phần phản ứng	Thể tích cần lấy (µl)
2X Reaction Mix	12,5
Mẫu RNA	5,0
Primer Forward	0,5
Primer Reverse	0,5
RT/Platium Taq Mix	0,5
Nước cất	6,0
Tổng thể tích	25

Bảng 2. Trình tự mồi phát hiện virus gây tiêu chảy trên lợn

Virus	Mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm	Tham khảo
PEDV	PM1 f	CCCCAGTACTGTTATTGACGTATAAAC	715bp	Sun <i>et al.</i> , 2015
	PM2 b	GTTTAGACTAAATGAAGCACTTTC		
TGEV	TGEF	GATGCTCGTCCTCCTCC	252bp	Lan <i>et al.</i> , 2011
	TGER	GACATCGGGTTGCC		
Rota virus	RotaF	AAAGATGCTAGGGACAAAATTG	309bp	Song <i>et al.</i> , 2006
	RotaR	TTCAGATTGTGGAGCTATTCCA		
Delta Corona virus	PDCoF	ATCCTCCAAGGAGGCTATGC	493bp	Wang <i>et al.</i> , 2014
	PDCoR	GCGAATTCTGGATCGTTGTT		

Bảng 3. Nhiệt độ và thời gian trong từng giai đoạn của chu kỳ nhiệt

Giai đoạn	Bước tổng hợp	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ
1	Tổng hợp cDNA	50	30 phút	1
	Duỗi mạch	94	5 phút	
2	Duỗi mạch	94	30 giây	30
	Gắn mồi	53/53/50/55	60 giây	
	Tổng hợp sợi mới	72	1 phút	
3	Hoàn chỉnh	72	5 phút	1
4	Giữ sản phẩm	4	∞	

Tiến hành khuếch đại sản phẩm trong máy PCR theo chu kỳ nhiệt ở bảng 3

2.2.5. Xác định hiệu giá virus

Tế bào vero một lớp được chuẩn bị trên khay 96 giếng. Mẫu virus cần xác định hiệu giá được pha loãng theo cơ số 10 từ 10^{-1} đến 10^{-12} , tiến hành gây nhiễm 25 μ l dung dịch virus ở các nồng độ khác nhau vào các giếng có chứa tế bào vero một lớp, mỗi độ pha loãng gây nhiễm cho 6 giếng tế bào. Theo dõi bệnh tích tế bào hàng ngày bằng kính hiển vi soi ngược. TCID₅₀ được xác định theo phương pháp của Spearman & Karber.

2.2.6. Xác định đường cong sinh trưởng của virus

Tế bào Vero được chuẩn bị vào những khay 96 giếng (5×10^4 tế bào/giếng) và được nuôi cấy như mô tả ở trên. PEDV phân lập được gây nhiễm lên tế bào ở MOI = 0,002 TCID₅₀/tế bào (Kusanagi *et al.*, 1992). Thu dịch nuôi cấy (bao gồm virus bên trong tế bào và virus được giải phóng ra môi trường) ở các thời điểm 8 h, 12 h, 24 h, 28 h, 30 h, 32 h, 36 h giờ sau gây nhiễm virus. Tiến hành xác định hiệu giá những ống virus đã thu để định lượng virus. Đường cong sinh trưởng của virus được xây dựng có biến là logarit thập phân của TCID₅₀ tại mỗi thời điểm thu virus.

2.2.7. Xử lý số liệu

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

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập PEDV

Nghiên cứu phân lập PEDV được thực hiện trên tế bào Vero với 3 điều kiện phân lập khác nhau đã được trình bày ở bố trí thí nghiệm. 83 mẫu ruột non dương tính với PEDV trong tổng số 155 mẫu bệnh phẩm của lợn nghi mắc PED thu thập từ các tỉnh phía bắc Việt Nam trong thời gian từ năm 2016 đến 2017 được sử dụng để phân lập virus PED. Trong nghiên cứu này do điều kiện thí nghiệm không cho phép làm dài hơn nên chúng tôi mới chỉ dừng lại ở 9 đời cấy chuyển liên tiếp để thu được kết quả phân lập cuối cùng. Kết quả phân lập được 13 chủng PEDV và thông tin chi tiết về các chủng virus phân lập được tổng hợp và trình bày ở bảng 4 và 5.

Qua 9 đời cấy chuyển liên tiếp 83 mẫu ruột non của lợn mắc PED trên tế bào Vero trong điều kiện môi trường không bổ sung trypsin, chúng tôi không phân lập được chủng PEDV nào. Trong khi đó môi trường bổ sung 5 μ g/ml trypsin và bổ sung 10 μ g/ml trypsin chúng tôi lần lượt thu được 11 và 13 chủng PEDV phân lập. Như vậy nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ ra rằng PEDV chỉ thích ứng nhân lên trên môi trường có trypsin. Để phân lập thành công PEDV thì môi trường phân lập cần thiết phải có trypsin, đây là điều kiện được Hofmann & Wyler. (1988), Kusanagi *et al.* (1992), Pan *et al.* (2012), Chen *et al.* (2014) và Lee *et al.* (2015) báo cáo trong các nghiên cứu của mình.

Tuy nhiên, Kweon *et al.* (1993) và Chung *et al.* (2015) cũng đã phân lập thành công PEDV

Bảng 4. Kết quả phân lập PEDV qua 9 đời cấy chuyển liên tiếp trong môi trường bổ sung 5 µg/ml trypsin

Địa phương	Số mẫu thu thập	Số mẫu PCR dương tính	Số mẫu có CPE	Bệnh tích tế bào								
				đời 1	đời 2	đời 3	đời 4	đời 5	đời 6	đời 7	đời 8	đời 9
Thái Bình	19	12	2	0	0	1	2	2	2	2	2	2
Hưng Yên	40	22	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
Hải Phòng	27	13	2	0	0	1	1	2	2	2	2	2
Bắc Giang	20	15	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Nam Định	16	11	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
Hà Nội	11	3	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
Hà Nam	7	2	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Vĩnh Phúc	10	3	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Bắc Ninh	5	2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Tổng	155	83	11	0	0	5	8	10	11	11	11	11

Bảng 5. Kết quả phân lập PEDV qua 9 đời cấy chuyển liên tiếp trong môi trường bổ sung 10µg/ml trypsin

Địa phương	Số mẫu PCR dương tính	Số mẫu có CPE	Bệnh tích tế bào									
			đời 1	đời 2	đời 3	đời 4	đời 5	đời 6	đời 7	đời 8	đời 9	
Thái Bình	12	2	0	1	2	2	2	2	2	2	2	2
Hưng Yên	22	2	0	1	2	2	2	2	2	2	2	2
Hải Phòng	13	2	0	0	1	2	2	2	2	2	2	2
Bắc Giang	15	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
Nam Định	11	2	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2
Hà Nội	3	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Hà Nam	2	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Vĩnh Phúc	3	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
Bắc Ninh	2	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Tổng	83	13	0	2	8	11	13	13	13	13	13	13

trong môi trường không bổ sung trypsin. Điều này cho thấy sự khác biệt trong các điều kiện môi trường thích hợp cho phân lập PEDV. Có thể lý giải các chủng PEDV khác nhau có sự nhạy cảm với trypsin khác nhau. Có những chủng PEDV bắt buộc phải có mặt của trypsin mới thích ứng nhân lên trên tế bào, cũng có chủng PEDV không cần sự có mặt của trypsin trong quá trình nhân lên.

Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng, với điều kiện môi trường nuôi cấy có bổ sung trypsin không phát hiện được bệnh tích tế bào ở đời

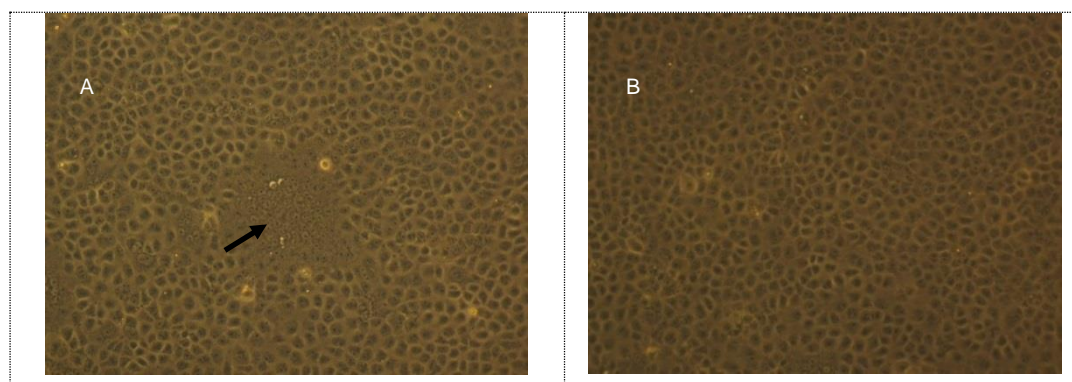
phân lập đầu tiên mặc dù kết quả xác nhận PEDV bằng RT-PCR là dương tính. Trong 13 chủng PEDV phân lập được từ môi trường bổ sung 10 µg/ml trypsin, chúng tôi lần lượt phân lập được 2, 6, 3, 2, 0, 0, 0, 0 chủng ở đời cấy chuyển thứ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9. Các nghiên cứu về phân lập virus PED trên thế giới cho thấy các chủng PEDV khác nhau được phân lập thành công ở các đời cấy chuyển khác nhau. Cụ thể: Chủng ISU13-22038 được Chen *et al.* (2014) phân lập thành công ở đời cấy chuyển thứ nhất. Chủng 83P-5 được Kusanagi *et al.*

(1992) phân lập thành công ở đời cấy chuyển thứ 2. Chủng CHGD-01 được Pan *et al.* (2012) phân lập thành công ở đời cấy chuyển thứ 7. Các kết quả nghiên cứu này chỉ ra sự thích ứng khác nhau của các chủng PEDV ở các điều kiện môi trường nuôi cấy khác nhau. Tuy nhiên, nếu cấy chuyển liên tiếp quá nhiều đời mà virus vẫn chưa thích ứng gây bệnh tích tế bào thì cần tìm một tế bào cảm thụ khác thích hợp hơn hoặc một điều kiện phân lập tối ưu hơn.

Quan sát bệnh tích tế bào do PEDV gây ra trên tế bào Vero chúng tôi thấy rằng bệnh tích tế bào được biểu hiện rõ với các đám tế bào bị dung giải màng, nhân tế bào co cụm lại với nhau hình thành các thể hợp bào (Hình 1).

Kết quả phân lập PEDV cho thấy môi trường DMEM bổ sung 5 $\mu\text{g/ml}$ trypsin cho kết quả phân lập thành công thấp hơn so với môi trường DMEM bổ sung 10 $\mu\text{g/ml}$ trypsin, cụ thể sau khi cấy chuyển liên tiếp 9 đời, 11 chủng virus PED đã được phân lập thành công đối với môi trường bổ sung 5 $\mu\text{g/ml}$ trypsin, trong khi môi trường bổ sung 10 $\mu\text{g/ml}$ trypsin

phân lập thành công 13 chủng. Ngoài ra kết quả nghiên cứu cũng cho thấy thời gian tế bào xuất hiện CPE cũng nhanh hơn khi sử dụng môi trường DMEM bổ sung 10 $\mu\text{g/ml}$ trypsin so với môi trường DMEM bổ sung 5 $\mu\text{g/ml}$ trypsin. Trong quá trình nghiên cứu chúng tôi còn nhận thấy ở môi trường bổ sung 5 $\mu\text{g/ml}$ trypsin PEDV có nhân lên nhưng không thể phá vỡ toàn bộ tế bào Vero như nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$ trypsin. Chính vì vậy nghiên cứu đã lựa chọn môi trường có bổ sung 10 $\mu\text{g/ml}$ trypsin để phân lập và tiến hành nghiên cứu các đặc điểm sinh học của virus. Trong nghiên cứu này các chủng PEDV phân lập cũng được kiểm tra, giám định bằng phương pháp RT-PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu cho PEDV, TGEV, Rota virus, Porcine Delta Coronavirus và kết quả được trình bày ở bảng 6 và hình 2. Kết quả nghiên cứu thể hiện ở bảng 6 và hình 2 cho thấy các chủng PEDV phân lập được là thuần khiết, không tạp nhiễm các loại virus gây tiêu chảy khác như TGEV, Rota virus, Porcine Delta Coronavirus.

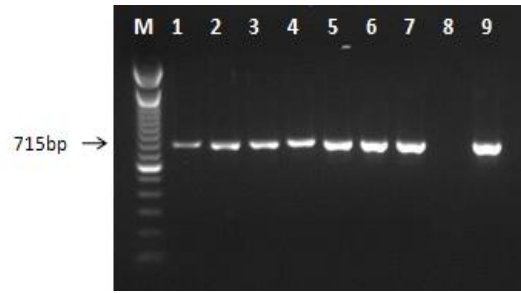


Hình 1. Bệnh tích tế bào do PEDV gây ra trên tế bào Vero

Ghi chú: A: Tế bào Vero sau khi gây nhiễm PEDV, B: Đối chứng - tế bào Vero không gây nhiễm PEDV.

Bảng 6. Kết quả RT-PCR xác định sự có mặt của một số virus gây tiêu chảy trên lợn ở các chủng PEDV phân lập

Virus kiểm tra	Số chủng PED kiểm tra	Số chủng PED dương tính	Tỷ lệ dương tính (%)
PEDV	13	13	100
TGEV	13	0	0
Rotavirus	13	0	0
PDCoV	13	0	0



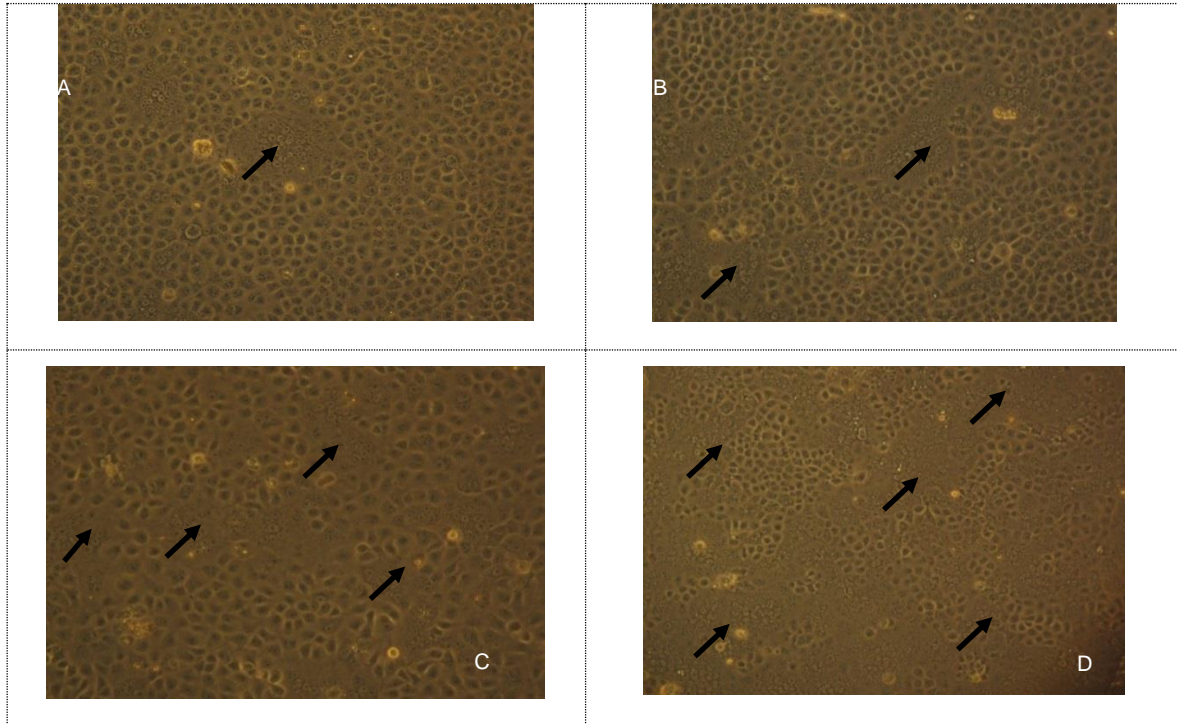
Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra PEDV phân lập

Ghi chú: M: Marker 100bp, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: là các mẫu PEDV phân lập, 8: đối chứng âm, 9: đối chứng dương - vaccin nhược độc PED của Hàn Quốc.

Bảng 7. Khả năng gây bệnh tích tế bào theo thời gian của các chủng PEDV phân lập

Tên virus	Thời gian	Đời	6 h	8 h	12 h	24 h	28 h	30 h	32 h	36 h	48 h
PEDTB03	P0	-	-	+	+	++	++	+++	++++		
	P4	-	+	++	++	+++	+++	++++			
PEDTB08	P0	-	-	-	+	++	++	++	+++	++++	
	P4	-	-	+	++	++	++	+++	++++		
PEDHY05	P0	-	-	+	++	++	++	+++	++++		
	P4	-	+	++	++	+++	+++	++++			
PEDHY31	P0	-	-	+	+	++	++	+++	++++		
	P4	-	+	++	++	+++	+++	++++			
PEDHP09	P0	-	-	-	+	++	++	++	+++	++++	
	P4	-	-	+	++	++	++	+++	++++		
PEDHP16	P0	-	-	-	+	++	++	++	+++	++++	
	P4	-	-	+	++	++	++	++	+++	++++	
PEDBG01	P0	-	-	-	+	++	++	++	+++	++++	
	P4	-	-	+	++	++	++	+++	++++		
PEDNĐ06	P0	-	-	-	+	++	++	++	+++	++++	
	P4	-	-	+	++	++	++	++	+++	++++	
PEDNĐ11	P0	-	-	-	+	++	++	++	+++	++++	
	P4	-	-	+	++	++	++	+++	++++		
PEDHN08	P0	-	-	-	+	++	++	++	+++	++++	
	P4	-	-	+	++	++	++	+++	++++		
PEDHN05	P0	-	-	-	+	+	++	++	+++	++++	
	P4	-	-	+	++	++	++	+++	++++		
PEDVP10	P0	-	-	+	++	++	++	+++	++++		
	P4	-	+	++	++	+++	+++	++++			
PEDBN02	P0	-	-	-	+	++	++	++	+++	++++	
	P4	-	-	+	++	++	++	+++	++++		

Ghi chú: “-” chưa có bệnh tích tế bào; +; ++; +++; ++++ tương ứng với tỉ lệ bệnh tích tế bào bị phá hủy là < 10%; 10 - 70%; 70 - 100%; tế bào bị bong tróc hoàn toàn khỏi đáy bình nuôi cấy (ước lượng bằng mắt khi soi trên kính hiển vi soi ngược)



Hình 3. Bệnh tích tế bào do PEDV gây ra trên tế bào vero ở các thời điểm khác nhau

Ghi chú: A: CPE sau 8 giờ gây nhiễm PEDV, B: CPE sau 12 giờ gây nhiễm PEDV, C: CPE sau 24 giờ gây nhiễm PEDV, D: CPE sau 36 giờ gây nhiễm PEDV.

3.2. Một số đặc tính sinh học của các chủng PEDV phân lập được

3.2.1. Khả năng thích ứng nhân lên trên môi trường tế bào Vero của các chủng PEDV phân lập được

Để xác định khả năng thích ứng nhân lên trên môi trường tế bào Vero của các PEDV phân lập được, 13 chủng virus phân lập được chúng tôi mã hóa theo từng địa phương, tiến hành cấy chuyển liên tiếp 4 đời trên tế bào Vero. Kết quả so sánh sự thích ứng của PEDV ở lần đầu gây bệnh tích tế bào (P0) và sau 4 đời cấy chuyển (P4) được tổng hợp ở bảng 7.

Kết quả cấy chuyển PEDV trên tế bào Vero cho thấy, CPE thường được quan sát thấy trong vòng 12 - 24 giờ và tế bào bị phá hủy hoàn toàn sau 48 giờ gây nhiễm ở P0. Trong khi đó đời cấy chuyển P4 bệnh tích tế bào xuất hiện sớm hơn 8 - 12 giờ sau gây nhiễm và tế bào bị phá hủy hoàn toàn sau 36 giờ gây nhiễm (Hình 3). Như vậy PEDV ở đời cấy chuyển P4 đã thích ứng

nhân lên trên tế bào Vero hơn PEDV ở đời phân lập đầu tiên. Nghiên cứu về sự thích ứng nhân lên của PEDV qua các đời cấy chuyển Hofmann & Wyler. (1988) đã quan sát thấy rằng: Đời phân lập đầu tiên CPE xuất hiện sau 3-5 ngày gây nhiễm và tế bào bị phá hủy hoàn toàn sau 2 ngày kể từ khi xuất hiện bệnh tích tế bào và sau 4 đời cấy chuyển liên tiếp thì tế bào bị phá hủy hoàn toàn sau 96 giờ (4 ngày). Như vậy, các chủng PEDV mà chúng tôi phân lập thích ứng nhân lên trên môi trường tế bào Vero nhanh hơn các chủng PEDV mà Hofmann & Wyler. (1988) đã phân lập. Đây có thể là đặc điểm nổi bật của các chủng PEDV phân lập tại Việt Nam hoặc môi trường và điều kiện phân lập đã được tối ưu hơn.

3.2.2. Hiệu giá virus

Xác định hiệu giá virus của các chủng PEDV phân lập được ở P0 và P4 được chúng tôi tiến hành trên 13 mẫu phân lập. Kết quả được trình bày ở bảng 8.

Bảng 8. Hiệu giá của các chủng PEDV phân lập được

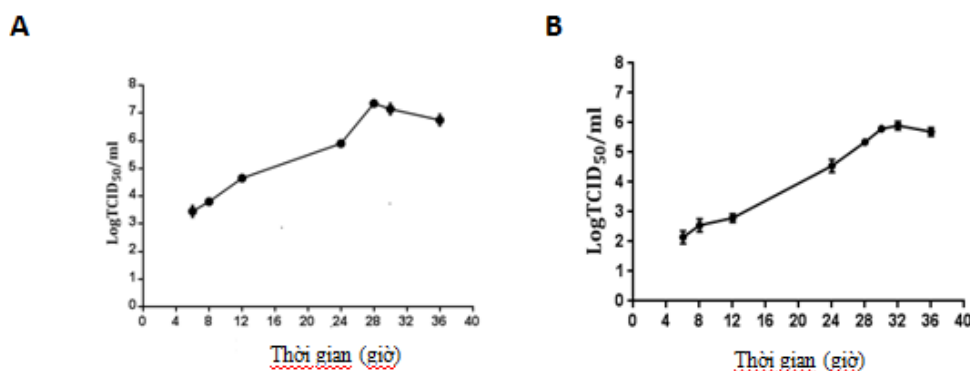
Mẫu virus PED	Hiệu giá virus TCID ₅₀ /ml ở P0	Hiệu giá virus TCID ₅₀ /ml ở P4
PEDTB03	10 ^{5,4}	10 ^{7,3}
PEDTB08	10 ^{4,9}	10 ^{6,0}
PEDHY05	10 ^{4,6}	10 ^{6,6}
PEDHY31	10 ^{5,7}	10 ^{6,5}
PEDHP09	10 ^{4,3}	10 ^{5,0}
PEDHP16	10 ^{4,4}	10 ^{5,4}
PEDBG01	10 ^{3,8}	10 ^{5,7}
PEDND06	10 ^{3,8}	10 ^{5,7}
PEDND11	10 ^{3,4}	10 ^{5,8}
PEDHN08	10 ^{4,2}	10 ^{5,3}
PEDHN05	10 ^{4,7}	10 ^{6,6}
PEDVP10	10 ^{4,3}	10 ^{6,6}
PEDBN02	10 ^{3,6}	10 ^{5,4}

Nghiên cứu xác định hiệu giá của các chủng PEDV phân lập cho thấy hiệu giá của các chủng PEDV ở đời đầu tiên xuất hiện CPE cho kết quả từ 10^{3,4} đến 10^{5,7} TCID₅₀/ml. Sau 4 đời cấy chuyển liên tiếp hiệu giá virus đạt từ 10^{5,3} đến 10^{7,3}TCID₅₀/ml. Như vậy, hiệu giá virus có xu hướng tăng dần qua các đời cấy chuyển. Hiệu giá của PEDV ở lần phân lập đầu tiên khi có bệnh tích tế bào đạt 10^{5,5} TCID₅₀/ml đã được Hofmann & Wyler. (1989) công bố. Trong khi đó hiệu giá PEDV qua 10 đời cấy chuyển dao động từ 10^{2,3} đến 10^{5,2} TCID₅₀/ml theo nghiên cứu của Chen *et al.* (2014) và dao động trong khoảng từ

10^{5,1} đến 10^{8,2} TCID₅₀/ml qua 30 đời cấy chuyển (Lee *et al.*, 2015). Tuy nhiên hiệu giá virus của các chủng PEDV phân lập giữ ổn định ở đời cấy chuyển thứ bao nhiêu thì cần tiếp tục nghiên cứu để có kết quả chính xác nhất.

3.2.3. Đường cong sinh trưởng của các chủng PEDV phân lập được

Chúng tôi đã lựa chọn 2 chủng PEDV phân lập ở đời cấy chuyển thứ 4 là PEDTB03 và PEDHN05 có hiệu giá cao nhất lần lượt là 10^{7,3} và 10^{6,6} TCID₅₀/ml để xây dựng đường cong sinh trưởng (Hình 4).



Hình 4. Đường cong sinh trưởng của các chủng PEDV nghiên cứu

Ghi chú: A và B: Đường cong sinh trưởng tương ứng của chủng PEDTB03 và PEDHN05.

Qua hình 4 cho thấy, hiệu giá của 2 chủng PEDV có sự tăng dần theo thời gian. Quy luật sinh trưởng của PEDV có thể phân chia thành 3 giai đoạn, bao gồm: giai đoạn tiềm tàng (từ 0 - 8 giờ sau gây nhiễm), giai đoạn lũy thừa (từ 8 - 32 giờ sau gây nhiễm) và giai đoạn suy giảm (sau gây nhiễm 32 giờ). Kết quả xây dựng đường cong sinh trưởng của 2 chủng PEDV cho thấy hiệu giá virus thu được cao nhất ở thời điểm từ 28 - 32 giờ sau gây nhiễm: cụ thể chủng PEDTB03 có hiệu giá cao nhất đạt $10^{7.3}$ TCID₅₀/ml ở 28 giờ sau gây nhiễm và chủng PEDHN05 có hiệu giá cao nhất đạt $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml ở 32 giờ sau gây nhiễm.

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã phân lập thành công 13 chủng PEDV từ 83 mẫu ruột lợn được chẩn đoán dương tính với PEDV. Tế bào Vero được nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung 10 µg/ml trypsin là thích hợp cho phân lập virus. Bệnh tích tế bào được biểu hiện rõ với các đám tế bào bị dung giải màng, nhân tế bào co cụm lại với nhau hình thành các thể hợp bào (syncytium). PEDV nhân lên và hủy hoại tế bào Vero nhanh, bệnh tích tế bào xuất hiện ở 12 giờ sau gây nhiễm và tế bào bị phá hủy hoàn toàn sau 36 - 48 giờ gây nhiễm. PEDV ở đời đầu tiên khi xuất hiện bệnh tích tế bào hiệu giá virus đạt từ $10^{3.4}$ TCID₅₀/ml đến $10^{5.7}$ TCID₅₀/ml. Sau 4 đời cấy chuyển liên tiếp hiệu giá virus có xu hướng tăng đạt từ $10^{5.3}$ TCID₅₀/ml đến $10^{7.3}$ TCID₅₀/ml. Chủng PEDTB03 và PEDHN05 được thu lần lượt tại thời điểm 28 và 32 giờ sau gây nhiễm cho hiệu giá virus cao nhất.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn tới Dự án FIRST: “Nghiên cứu công nghệ chế tạo vắc xin phòng bệnh tiêu chảy thành dịch (PED-Porcine Epidemic Diarrhea) cho lợn nuôi trang trại” đã tạo điều kiện để chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chasey, D., Cartwright, S. (1978). Virus-like particles

associated with porcine epidemic diarrhoea. *Research in veterinary science*, 25: 255-256.

Chen, Q., Li, G., Stasko, J., Thomas, J.T., Stensland, W.R., Pillatzki, A.E., Gauger, P.C., Schwartz, K.J., Madson, D., Yoon, K.-J. (2014). Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *Journal of clinical microbiology*, 52: 234-243.

Chung, H.-C., Van Giap Nguyen, H.-J.M., Lee, J.-H., Park, S.-J., Lee, G.-E., Kim, H.-K., Noh, Y.-S., Lee, C.-H., Goede, D., Park, B.K. (2015). Isolation of porcine epidemic diarrhea virus during outbreaks in South Korea, 2013-2014. *Emerging infectious diseases*, 21: 2238.

Debouck, P., Pensaert, M., Coussement, W. (1981). The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV 777. *Veterinary Microbiology*, 6: 157-165.

Hofmann, M., Wyler, R. (1988). Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *Journal of clinical microbiology*, 26: 2235-2239.

Hofmann, M., Wyler, R. (1989). Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV). *Veterinary microbiology*, 20: 131-142.

Jung, K., Saif, L.J. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *The Veterinary Journal*, 204: 134-143.

Kim, S.Y., Song, D.S., Park, B.K. (2001). Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 13: 516-520.

Kusanagi, K.-i., Kuwahara, H., Katoh, T., Nunoya, T., Ishikawa, Y., Samejima, T., Tajima, M. (1992). Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *Journal of Veterinary Medical Science*, 54: 313-318.

Kweon, C., Kwon, B., Jung, T.S., Kee, Y., Hur, D., Hwang, E., Rhee, J., An, S. (1993). Isolation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Korea. *Korean J Vet Res.*, 33: 249-254.

Lan, D., Gu, J., Xing, R., Yuan, C., Cui, L., Hua, X., Yang, Z. (2011). Sequence analysis of the ORF7 region of chinese transmissible gastroenteritis virus isolate TGEs-1. *Bull Vet Inst Pulawy*, 55: 169-175.

Lee, S., Kim, Y., Lee, C. (2015). Isolation and characterization of a Korean porcine epidemic