

ĐẶC TÍNH SINH HỌC VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA CHỦNG VIRUS DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI PHÂN LẬP ĐƯỢC TẠI MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM

Trịnh Thị Bích Ngọc, Nguyễn Văn Tâm, Nguyễn Thị Thu Huyền, Vũ Xuân Đăng, Lê Văn Phan*

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: letranphan@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 25.06.2020

Ngày chấp nhận đăng: 03.09.2020

TÓM TẮT

Dịch tả lợn châu Phi (DTLCP) là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, đã và đang gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng đối với ngành chăn nuôi lợn trên toàn thế giới. DTLCP được phát hiện lần đầu tiên ở Việt Nam vào ngày 1/2/2019 và sau khoảng 7 tháng, dịch đã lan ra khắp 63 tỉnh thành trong cả nước. Trong nghiên cứu này, virus DTLCP phân lập từ các mẫu bệnh phẩm của lợn bệnh thu thập được tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam đã được xác định một số đặc tính sinh học và sinh học phân tử. Kết quả phân lập virus trên môi trường tế bào PAM (tế bào đại thực bào phế nang phổi của lợn) đã thu được 5 chủng virus khác nhau với hiệu giá virus dao động từ 10^6 đến $10^{7.5}$ HAD₅₀/ml. Kết quả nghiên cứu về đường cong sinh trưởng của virus trên tế bào PAM cho thấy với liều gây nhiễm MOI = 1, hiệu giá virus đạt giá trị cao nhất là $10^{8.16 \pm 0.21}$ HAD₅₀/ml sau 96 giờ gây nhiễm virus. Kết quả giải trình tự gen và phân tích trình tự gen P72 cho thấy các chủng virus phân lập được tương đồng với nhau 100% về trình tự nucleotide và acid amin. Kết quả phân tích cây phả hệ cho thấy tất cả các chủng virus phân lập được đều thuộc genotype II.

Từ khóa: DTLCP, phân lập virus, cây phả hệ.

Molecular and Biological Characteristics of African Swine Fever Virus Isolated in Some Northern Provinces of Vietnam

ABSTRACT

African swine fever (ASF) is a highly infectious disease in the domestic and wild pig populations causing tremendous damage to the global swine industry. ASF was first reported in Vietnam on February 1st, 2019 and the disease has spread to 63 provinces in just 7 months. This study aims to investigate the molecular and biological characteristics of ASF viruses isolated from tissue samples of ASF-infected pigs collecting from the northern provinces of Vietnam. The results of virus isolation showed that five ASFV strains had been successfully isolated on PAM (Porcine Alveolar Macrophage) cells, virus titer ranging from 10⁶-10^{7.5} HAD₅₀/ml. The results of the growth curve of the virus on PAM cells disclosed that, with the multiplicity of infection (MOI) = 1, the highest achieved virus titer was $10^{8.16 \pm 0.21}$ HAD₅₀/ml after 96 hours post-infection. The sequencing results of the B646L (p72) gene showed that all present ASFV strains shared 100% nucleotide and amino acid sequence identity with each other. Phylogenetic analysis revealed that all isolated strains belonged to genotype II.

Keywords: African swine fever, virus isolation, phylogeny.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dịch tả lợn châu Phi (African swine fever) là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm có tính lây nhiễm cao trên lợn nhà và lợn rừng, tỷ lệ chết lên đến 100% và gây thiệt hại kinh tế nặng nề tới ngành chăn nuôi lợn trên thế giới. DTLCP trước đây là dịch bệnh địa phương ở châu Phi,

xảy ra ở các khu vực vùng phụ cận sa mạc Sahara, bệnh xảy ra chủ yếu trên lợn rừng. Ca bệnh DTLCP đầu tiên được phát hiện trên lợn nhà ở Kenya và được công bố bởi Montgomery (1921) với các biểu hiện triệu chứng như một biến thể của bệnh dịch tả lợn cổ điển (CSF) (Montgomery 1921). Trải qua gần một thế kỷ, bệnh DTLCP xuất hiện trên nhiều quốc gia đã

gây ra những thiệt hại kinh tế nặng nề ở mỗi quốc gia có dịch bệnh bùng phát. Năm 2007, bệnh xuất hiện ở Georgia, sau đó lan rộng ra các nước đông Âu như Nga, Belarus, Ukraine, Estonia, Litva, Latvia, Romania, Moldova, Cộng hòa Séc và Ba Lan (Revilla & cs., 2018). Gần đây, bệnh bùng nổ tại khu vực Đông Á và Đông Nam Á. Các ổ dịch bệnh DTLCP ở Trung Quốc lần đầu được công bố vào ngày 03/08/2018 (Zhou & cs., 2018), Mông Cổ tháng 1/2019 (Heilmann & cs., 2020), Campuchia tháng 4/2019, Hàn Quốc vào 5/2019 (Kim & cs., 2020), Việt Nam tháng 2/2019 (Le & cs., 2019), Lào tháng 6/2019, Philippines tháng 7/2019, Myanmar tháng 8/2019, Đông Timor tháng 9/2019, và gần đây nhất là Ấn Độ tháng 5/2020 (<https://www.oie.int/wahis2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI>). Tính đến nay, Việt Nam đã có hơn 8.500 ổ dịch với hơn 6 triệu con lợn đã bị tiêu hủy (<http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en>).

Tác nhân gây bệnh DTLCP là virus DNA mạch kép, có vỏ bọc thuộc họ *Asfviridae* (Dixon & cs., 2005), giống *Asfivirus* (Anderson & cs., 1998; Kleiboeker & cs., 1999). Bộ gen của virus dài khoảng 170-193kbp, có khoảng 151-167 khung đọc mở mã hóa ra hơn 50 protein khác nhau (Chapman & cs., 2011; De Villiers & cs., 2010). Trong số đó, protein P72 là một trong số các protein của virus DTLCP có tính kháng nguyên cao. Protein P72 được mã hóa bởi gen B646L và có khối lượng phân tử khoảng 73,5kDa, đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành vỏ capsid trong quá trình xâm nhiễm của virus (Neilan & cs., 2004). Trình tự gen mã hóa cho protein P72 cũng thường được sử dụng trong các nghiên cứu về dịch tễ học phân tử virus DTLCP (Bastos & cs., 2003; Muangkram & cs., 2015).

Hiện nay chưa có vaccin và phác đồ điều trị cho các đàn lợn bị nhiễm bệnh DTLCP, vì vậy một trong các biện pháp hiệu quả nhất để ngăn chặn sự bùng phát của dịch bệnh là phát hiện sớm và tiêu hủy toàn bộ đàn lợn bị nhiễm bệnh (Sánchez-Vizcaíno & cs., 2015). Trong nghiên cứu này, virus DTLCP đã được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm của lợn bị DTLCP. Chủng virus phân lập được đã được xác định một số đặc tính

sinh học và sinh học phân tử. Những thông tin thu được về đặc tính sinh học và sinh học phân tử của chủng virus phân lập được trong nghiên cứu này sẽ là những thông tin hữu ích phục vụ cho các nghiên cứu về kit chẩn đoán và điều chế vaccin phòng bệnh, góp phần vào công tác phòng chống và kiểm soát dịch bệnh hiệu quả hơn.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Mẫu bệnh phẩm sử dụng để phân lập virus DTLCP trong nghiên cứu này là các mẫu hạch, lách và thận của lợn đã được chẩn đoán dương tính với virus DTLCP bằng phương pháp Real-time PCR (Median Diagnostics Inc., <http://www.mediantagnostics.com>). Các mẫu bệnh phẩm được thu thập trong năm 2019 tại một số trang trại lợn ở miền Bắc Việt Nam (Bảng 1).

2.2. Phân lập virus DTLCP

Chuẩn bị tế bào đại thực bào phế nang phổi của lợn (PAM): Tế bào được thu theo quy trình đã được công bố trước đây (Carrascosa & cs., 1982). Cụ thể, lợn 3 tháng tuổi khỏe mạnh không có các biểu hiện lâm sàng của các bệnh truyền nhiễm được lựa chọn để thu tế bào PAM từ phổi. Lợn được gây mê, và sát trùng trước khi thu phổi. Bộc lộ xoang ngực và khí quản vùng cổ, dùng panh kẹp khí quản và từ từ lấy phổi ra khỏi xoang ngực. Sử dụng PBS 1X rửa phổi và thu dịch tế bào. Dịch tế bào sau khi thu được ly tâm 1.500 vòng/phút trong 10 phút. Loại bỏ dịch nổi, thu cặn tế bào và tiếp tục rửa 2-3 lần bằng dung dịch PBS 1X. Hoàn nguyên tế bào bằng môi trường nuôi cấy RPMI 1640 (Corning) có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (FBS-Gibco) và 1% kháng sinh streptomycin, penicillin, kháng nấm (antifungal). Tế bào PAM được nuôi ở 37°C, 5% CO₂ trong các đĩa nuôi cấy tế bào để gây nhiễm virus DTLCP.

Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm và gây nhiễm virus: Mẫu bệnh phẩm được nghiền nhỏ, pha thành huyền dịch 10% trong dung dịch PBS và lọc vô trùng qua màng lọc 0,22µm. Mẫu bệnh

phẩm đã xử lý ở trên được cho vào khay chứa tế bào PAM, ủ tế bào ở 37°C trong 2 giờ, sau đó loại bỏ dịch gây nhiễm và rửa tế bào bằng dung dịch PBS 1X có bổ sung penicillin, streptomycin, neomycin hoặc gentamycin và kháng nấm (antifungal). Cuối cùng, bổ sung môi trường nuôi cấy RPMI 1640 có chứa 10% FBS và 1% kháng sinh streptomycin, penicillin, kháng nấm. Hồng cầu lợn 1% được bổ sung vào các chai nuôi cấy tế bào sau khi gây nhiễm virus 24 giờ, hàng ngày quan sát hiện tượng hấp phụ hồng cầu do virus gây ra như đã được mô tả trước đây (Enjuanes & cs., 1976). Dịch virus được thu hoạch sau 96 giờ nuôi cấy.

2.3. Xác định hiệu giá virus DTLCP

Phương pháp xác định hiệu giá virus DTLCP được thực hiện theo quy trình đã công bố trước đây (Malmquist & cs., 1960). Cụ thể, các chủng virus phân lập được pha loãng theo cơ số 10. Mỗi độ pha loãng virus sau đó gây nhiễm cho 8 giếng tế bào của đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng được chuẩn bị trước đó (mật độ 2×10^5 tế bào/ giếng). Hồng cầu lợn 1% được bổ sung vào các đĩa nuôi cấy tế bào sau 24 giờ gây nhiễm, quan sát sự có mặt của virus DTLCP thông qua sự hình thành đám “hoa hồng” do sự hấp phụ hồng cầu của tế bào PAM đã nhiễm virus như đã được mô tả trước đây (Enjuanes & cs., 1976). Hiệu giá virus được xác định qua giá trị HAD_{50} (50% hấp phụ hồng cầu) sau 5-7 ngày gây nhiễm, giá trị HAD_{50}/ml được tính theo công thức đã được công bố trước đây (Reed & cs., 1938).

2.4. Xác định đường cong sinh trưởng của virus DTLCP

Virus DTLCP được gây nhiễm trên chai nuôi cấy tế bào T25 (nồng độ 10^7 tế bào/chai) với liều gây nhiễm $MOI = 1$. Sau 2 giờ ủ trong điều kiện 37°C, 5% CO_2 , dịch gây nhiễm virus được loại bỏ và rửa với dung dịch PBS 1X, bổ sung môi trường nuôi cấy mới RPMI 1640 chứa 10% FBS và 1% kháng sinh streptomycin, penicillin, kháng nấm. Virus được thu tại các thời điểm khác nhau sau khi gây nhiễm virus theo thứ tự: 24, 48, 72, 96, 118 và 120 giờ.

Đường cong sinh trưởng của virus được xác định dựa vào giá trị hiệu giá HAD_{50}/ml tại mỗi thời điểm thu virus. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần để đảm bảo độ tin cậy.

2.5. PCR và giải trình tự gen

Bộ kit tách chiết QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) được sử dụng để tách chiết DNA virus từ dịch nuôi cấy tế bào, máu, huyết thanh hoặc huyền dịch bệnh phẩm. Cặp mồi đặc hiệu đã được công bố trước đây P72-U/P72-D được sử dụng để nhân đoạn gen P72 của virus DTLCP có độ dài 478 bp (Bastos & cs., 2003). Chu trình phản ứng PCR bao gồm giai đoạn 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 52°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây) và cuối cùng 72°C trong 5 phút. Sản phẩm được điện di trên gel agarose 1%. Để phân tích trình tự gen P72 của chủng virus phân lập được, sản phẩm PCR có kích thước 478bp được tinh sạch bằng bộ Kit chiết xuất gel Qiaex (Qiagen) và giải trình tự gen bởi công ty 1st BASE DNA Sequencing Division (<http://www.baseasia.com/dna-sequencing-services/support>).

2.6. Phân tích số liệu

Các số liệu tính toán hiệu giá virus được sử dụng trên phần mềm Excel. Dữ liệu giải trình tự gen P72 được phân tích bởi phần mềm BioEdit version 7.2 (Ibis Biosciences) và phần mềm MEGAX sử dụng phương pháp Neighbor-Joining với giá trị Bootstrap là 1.000 đơn vị.

3. KẾT QUẢ

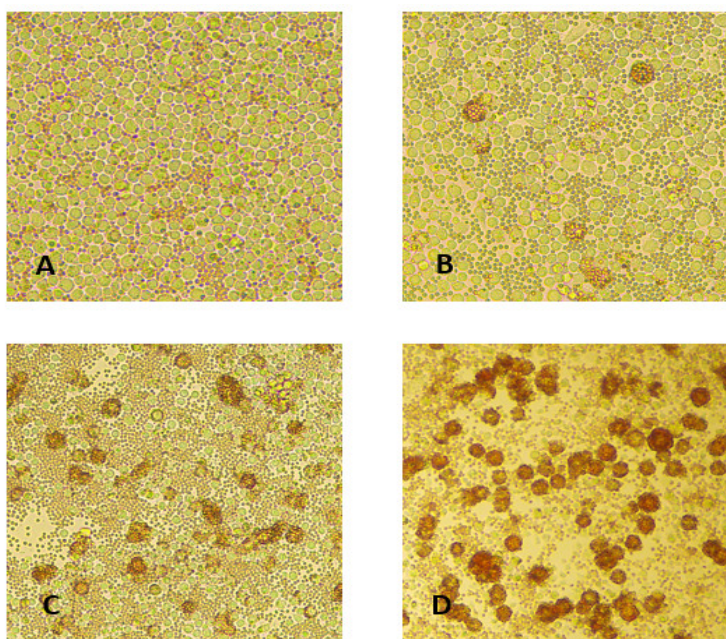
3.1. Chẩn đoán và phân lập virus DTLCP trên tế bào PAM

Trong nghiên cứu này, các mẫu bệnh phẩm được thu từ lợn nghi bị DTLCP tại 5 tỉnh khác nhau của miền Bắc là Hải Phòng, Nam Định, Bắc Giang, Thái Bình và Hưng Yên. Kết quả chẩn đoán bằng phương pháp Real-time PCR cho thấy cả 5 mẫu bệnh phẩm đều cho kết quả dương tính với virus DTLCP, giá trị Ct thu được dao động từ 16,05-24,14 (Bảng 1).

Đặc tính sinh học và sinh học phân tử của chủng virus dịch tả lợn châu Phi phân lập được tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam

Bảng 1. Kết quả chẩn đoán virus DTLCP từ các mẫu bệnh phẩm bằng phương pháp Real-time PCR

Ký hiệu mẫu	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu	Địa chỉ	Kết quả Real-time PCR (giá trị Ct)
VNUA/HaiPhong/ASF	04/2019	Thận	Hải Phòng	16,05
VNUA/NamDinh/ASF	09/2019	Thận	Nam Định	19,15
VNUA/BacGiang/ASF	05/2019	Hạch	Bắc Giang	19,21
VNUA/ThaiBinh/ASF	02/2019	Lách	Thái Bình	24,14
VNUA/HungYen2/ASF	02/2019	Thận	Hưng Yên	16,72



Ghi chú: A: Tế bào PAM đối chứng không gây nhiễm virus; B, C và D: Tế bào PAM gây nhiễm virus DTLCP sau 24, 72 và 96 giờ.

Hình 1. Hình ảnh tế bào gây nhiễm virus DTLCP

Bảng 2. Kết quả chuẩn độ virus qua các đời cấy truyền trên tế bào PAM

Ký hiệu mẫu	Ngày lấy mẫu	Loại mẫu	Địa chỉ	Hiệu giá virus sau các đời cấy truyền (Log ₁₀ HAD ₅₀ /ml)		
				Đời 1	Đời 2	Đời 3
VNUA/HaiPhong/ASF	04/2019	Thận	Hải Phòng	5	5,5	6,5
VNUA/NamDinh/ASF	09/2019	Thận	Nam Định	4,5	6	6,75
VNUA/BacGiang/ASF	05/2019	Hạch	Bắc Giang	5,5	6,5	7
VNUA/ThaiBinh/ASF	02/2019	Lách	Thái Bình	3,5	5	6
VNUA/HungYen2/ASF	02/2019	Thận	Hưng Yên	5,5	6	7,5

Kết quả phân lập virus DTLCP trên môi trường tế bào PAM cho thấy, sau 48 giờ gây nhiễm ở đời đầu tiên, hồng cầu có hiện tượng hấp phụ xung quanh một số tế bào PAM hình thành đám “hoa hồng”. Quan sát các giờ gây nhiễm tiếp

theo thấy số lượng các đám “hoa hồng” nhiều lên. Trong khi đó, với chai đối chứng tế bào không gây nhiễm virus thì hồng cầu nằm riêng rẽ (Hình 1). Tế bào và dịch nuôi cấy ở lần gây nhiễm đầu tiên được thu hoạch sau 96 giờ và được cấy chuyển

thêm hai đời. Kết quả chuẩn độ virus DTLCP sau 3 lần truyền đời trên tế bào PAM cho thấy hiệu giá HAD_{50} của virus tăng dần sau mỗi lần truyền đời. Đặc biệt, hiệu giá HAD_{50} ở đời thứ 3 có giá trị từ 10^6 - $10^{7,5}$ HAD_{50}/ml (Bảng 2). Các chủng virus phân lập trên tế bào PAM đã được chẩn đoán xác nhận bằng phản ứng Real-time PCR và đều cho kết quả dương tính với virus DTLCP (kết quả không được thể hiện).

3.2. Đường cong sinh trưởng của chủng virus DTLCP

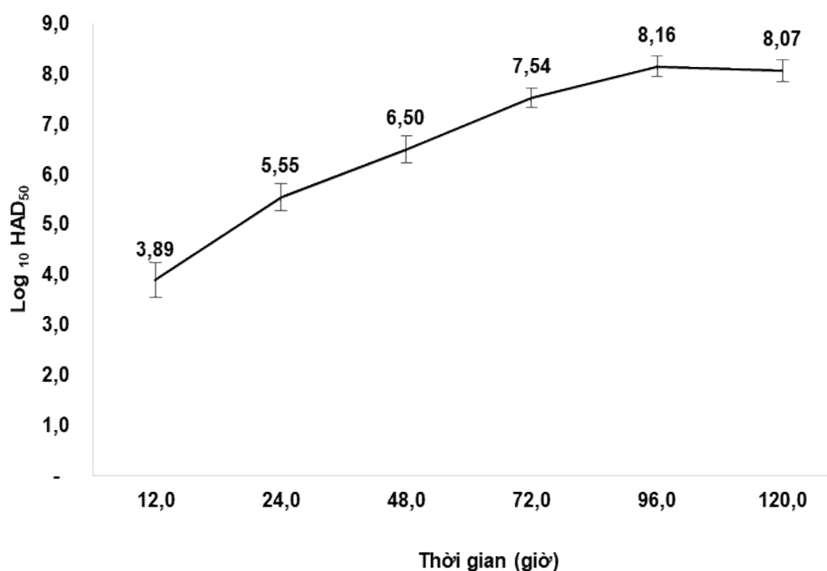
Từ 5 chủng virus đã phân lập thành công, chủng virus VNUA/HungYen2/ASF có hiệu giá virus ($10^{7,5}$ HAD_{50}/ml) đạt cao nhất ở đời thứ 3 đã được lựa chọn để xác định đường cong sinh trưởng của virus trên môi trường tế bào PAM. Virus được gây nhiễm lên tế bào PAM với liều $MOI = 1$. Dịch virus được thu theo các khoảng thời gian khác nhau để xác định hiệu giá virus nhân lên. Kết quả chuẩn độ hiệu giá virus DTLCP ở các thời điểm khác nhau cho thấy hiệu giá virus tăng dần theo thời gian và đạt giá trị cao nhất sau 96 giờ gây nhiễm. Kết quả ở hình 2 cho thấy sau 24 giờ gây nhiễm, hiệu giá virus đạt $10^{3,89 \pm 0,35}$ HAD_{50}/ml và sau 96 giờ gây nhiễm, hiệu giá virus đạt cao nhất là $10^{8,16 \pm 0,21}$ HAD_{50}/ml . Theo dõi hiệu giá virus ở các giờ gây nhiễm tiếp

theo cho thấy hiệu giá virus có xu hướng giảm. Dựa vào đường cong sinh trưởng cho thấy, với liều virus gây nhiễm $MOI = 1$, hiệu giá virus đạt giá trị cao nhất sau 96 giờ gây nhiễm.

3.3. Phân tích trình tự gene P72 của các chủng virus DTLCP

Để xác định genotype của chủng virus DTLCP phân lập, trình tự đoạn gen P72 của 5 chủng virus DTLCP phân lập trong nghiên cứu này đã được nhân lên bằng phản ứng PCR (Hình 3), được giải trình tự gen và phân tích trình tự.

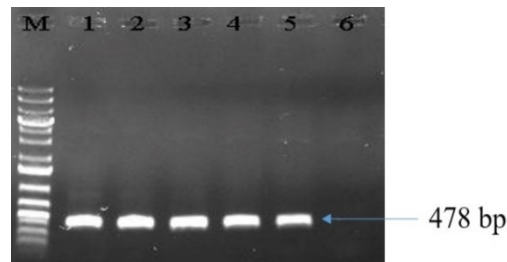
Kết quả giải trình tự gen và phân tích về tỷ lệ tương đồng nucleotide và acid amin của gen P72 đối với 5 chủng virus phân lập được cho thấy cả 5 chủng virus giống nhau 100% về trình tự nucleotide (nt) và amino acid (aa). Khi so sánh trình tự gen P72 của các chủng virus DTLCP trong nghiên cứu này với chủng virus VNUA/HY-ASF1/Vietnam/2019 (mã số GenBank: MK554698) gây ra ổ dịch đầu tiên tại Hưng Yên, Việt Nam, tỷ lệ tương đồng về nt và aa là 100%. Kết quả phân tích trình tự gen P72 cũng cho thấy các chủng virus DTLCP phân lập được trong nghiên cứu này tương đồng 100% về nt và aa khi so sánh với các chủng virus đã được công bố tại Trung Quốc (Bảng 3).



Ghi chú: Hiệu giá virus tại thời điểm sau gây nhiễm: 12 giờ: $10^{3,89 \pm 0,35}$ HAD_{50}/ml ; 24 giờ: $10^{5,55 \pm 0,28}$ HAD_{50}/ml ; 48 giờ: $10^{6,5 \pm 0,26}$ HAD_{50}/ml ; 72 giờ: $10^{7,54 \pm 0,19}$ HAD_{50}/ml ; 96 giờ: $10^{8,16 \pm 0,21}$ HAD_{50}/ml và 120 giờ: $10^{8,07 \pm 0,21}$ HAD_{50}/ml .

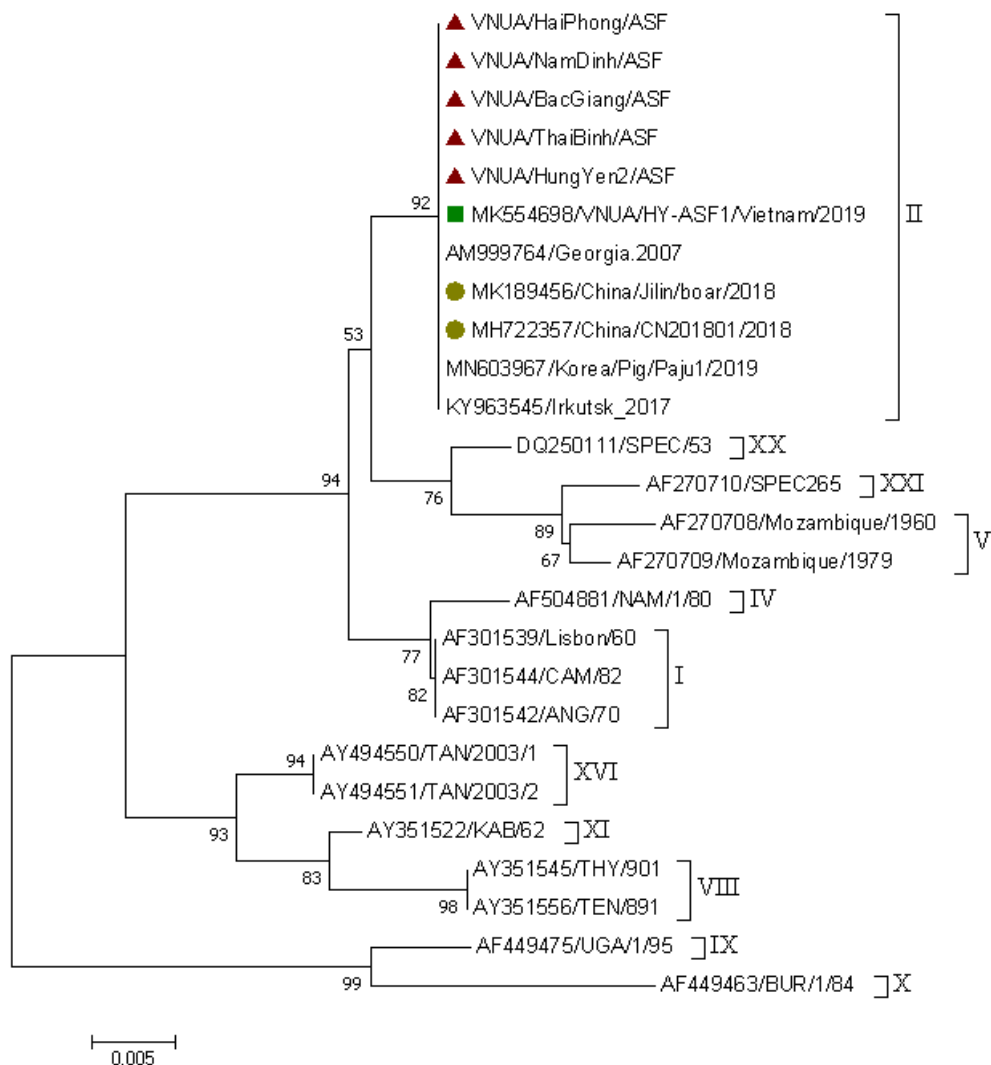
Hình 2. Đường cong sinh trưởng của chủng virus VNUA/HungYen2/ASF trên tế bào PAM

Đặc tính sinh học và sinh học phân tử của chủng virus dịch tả lợn châu Phi phân lập được tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam



Ghi chú: Giếng M: Marker- GeneRuler 1kb; Giếng 1 – 5: Sản phẩm PCR nhân gen 72 của 5 chủng virus tương ứng VNUA/HaiPhong/ASF, VNUA/NamDinh/ASF, VNUA/BacGiang/ASF, VNUA/ThaiBinh/ASF và VNUA/HungYen2/ASF; Giếng 6: Đối chứng âm

Hình 3. Kết quả chạy điện di trên gel agarose sản phẩm PCR của gen P72 của virus DTLCP



Ghi chú: Các chủng virus trong nghiên cứu này được đánh dấu hình tam giác đỏ, chủng virus tham chiếu từ Trung Quốc được đánh dấu hình tròn vàng và chủng virus gây ra ổ dịch đầu tiên tại Việt Nam được đánh dấu hình vuông xanh.

Hình 4. Cây phả hệ của các chủng virus DTLCP phân lập được dựa trên trình tự gen P72

Bảng 3. Tỷ lệ (%) tương đồng về trình tự nucleotide và amino acid của đoạn gen P72 của các chủng virus phân lập được trong nghiên cứu này so với chủng virus VNUA/HY-ASF1/Vietnam/2019 gây ra ở DTLCP đầu tiên tại Việt Nam

Chủng virus	Tỷ lệ % tương đồng về trình tự nucleotide					
	1	2	3	4	5	6
VNUA/HY-ASF1/Vietnam/2019		100	100	100	100	100
VNUA/HaiPhong/ASF	100		100	100	100	100
VNUA/NamDinh/ASF	100	100		100	100	100
VNUA/BacGiang/ASF	100	100	100		100	100
VNUA/ThaiBinh/ASF	100	100	100	100		100
VNUA/HungYen2/ASF	100	100	100	100	100	

Tỷ lệ % tương đồng về trình tự acid amin

Kết quả xây dựng cây phả hệ được thể hiện trong hình 4 cho thấy, 5 chủng virus DTLCP phân lập được từ các tỉnh (Hình tam giác màu đỏ) đều thuộc nhóm genotype II, nằm cùng nhánh với chủng virus VNUA/HY-ASF1/Vietnam/2019 (Hình vuông màu xanh) là chủng virus DTLCP đầu tiên công bố ở Việt Nam (Le & cs., 2019) và các chủng virus gây bệnh ở Trung Quốc (Hình tròn màu vàng).

4. THẢO LUẬN

Virus DTLCP xâm nhiễm các tế bào đại thực bào, tế bào bạch cầu đơn nhân trong máu và tủy xương, trong các tế bào nội mô, tế bào gan, tế bào thận và các tế bào bạch cầu trung tính (Casal & cs., 1984; Wilkinson & cs., 1978; Sierra & cs., 1987). Theo các công bố khoa học trước đây, virus DTLCP có thể nuôi cấy trên các tế bào như tế bào đại thực bào phế nang phổi (PAM), tế bào sơ cấp tủy xương (PBMC), Cos 1 hay Vero (Knudsen & cs., 1987; Carrascosa & cs., 1982). Virus DTLCP có khả năng hấp phụ hồng cầu, vì vậy khi tế bào bị nhiễm virus thì hồng cầu sẽ hấp phụ xung quanh tế bào. Dựa vào hiện tượng hấp phụ hồng cầu của các tế bào PAM sau khi nhiễm virus để xác nhận sự thành công trong quá trình phân lập virus DTLCP (Gallardo & cs., 2015; Sánchez-Vizcaíno & cs., 2015). Trong nghiên cứu này, tế bào PAM của lợn âm tính với virus DTLCP được sử dụng để phân lập. Các mẫu bệnh phẩm được thu thập từ

lợn dương tính với virus DTLCP. Kết quả phân lập virus DTLCP trong nghiên cứu này cho thấy, hiện tượng hấp phụ hồng cầu quan sát được trên tế bào PAM ngay từ lần phân lập đầu tiên. Hiện tượng hấp phụ hồng cầu quan sát được trong nghiên cứu này có đặc điểm hoàn toàn giống với các mô tả trước đây (Enjuanes & cs., 1976; Carrascosa & cs., 1982). Như vậy, trong nghiên cứu này, dựa vào hiện tượng hấp phụ hồng cầu của tế bào PAM sau khi gây nhiễm virus và kết hợp với phương pháp chẩn đoán real-time PCR cho thấy virus DTLCP đã được phân lập thành công. Hiệu giá virus sau 3 đời cấy truyền trên tế bào PAM dao động từ 10^6 đến $10^{7.5}$ HAD₅₀/ml. Kết quả nghiên cứu về đường cong sinh trưởng của virus DTLCP cho thấy, với liều gây nhiễm virus trên tế bào MOI = 1, hàm lượng virus đạt giá trị cao nhất ($10^{8.16 \pm 0.21}$ HAD₅₀/ml) sau 96 giờ gây nhiễm. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với công bố trước đây (Zhao & cs., 2019). Những nghiên cứu gần đây trên thế giới cho thấy virus DTLCP rất đa dạng, dựa vào trình tự gen P72 (B646L), virus DTLCP được chia thành 24 genotype khác nhau (Bastos & cs., 2003; Achenbach & cs., 2017). Kết quả giải trình tự gen P72 của virus DTLCP trong nghiên cứu này đã chỉ ra rằng tất cả các chủng virus phân lập được đều thuộc về genotype II, tương đồng 100% về trình tự nucleotide và acid amin khi so sánh với các chủng virus DTLCP tham chiếu khác thuộc genotype II có độc lực cao trên lợn như chủng Georgia 2007 (Mã số

GenBank: AM999764), chủng CN201801 gây bệnh trên đàn lợn tại Trung Quốc (Mã số GenBank: MH722357) (Chapman & cs., 2011, Ge & cs., 2018). Kết quả giải trình tự gen P72 thu được từ nghiên cứu này cùng với công bố trước đây (Le & cs., 2019) một lần nữa khẳng định các chủng virus DTLCP đã và đang gây bệnh tại Việt Nam thuộc về genotype II, có thể có nguồn gốc từ Trung Quốc. Việt Nam và Trung Quốc là 2 nước có đường biên giới chung kéo dài, nhiều hoạt động thương mại diễn ra và việc buôn bán lợn bất hợp pháp vẫn chưa được kiểm soát chặt chẽ (<http://www.fao.org/3/i8805en/I8805EN.pdf>). Tuy nhiên, bằng cách nào và khi nào virus DTLCP xâm nhập vào Việt Nam vẫn là câu hỏi chưa có lời giải đáp. Vì vậy, rất cần những nghiên cứu liên tục và chuyên sâu về điều tra dịch tễ học, dịch tễ học phân tử chủng virus gây bệnh và con đường truyền lây của bệnh.

4. KẾT LUẬN

Đã phân lập thành công virus DTLCP trên môi trường tế bào PAM, các chủng virus phân lập được có hiệu giá dao động từ 10^6 - $10^{7.5}$ HAD₅₀/ml. Kết quả nghiên cứu về đường cong sinh trưởng của chủng virus VNUA/HungYen2/ASF trên tế bào PAM cho thấy, với liều gây nhiễm virus MOI = 1, hiệu giá virus đạt giá trị cao nhất ($10^{8.16 \pm 0.21}$ HAD₅₀/ml) sau 96 giờ gây nhiễm. Kết quả giải trình tự gen P72 cho thấy tất cả các chủng virus phân lập được trong nghiên cứu này đều thuộc nhóm genotype II.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí đề tài “Nghiên cứu chế tạo Kít chẩn đoán bệnh Dịch tả lợn Châu Phi tại Việt Nam”. Mã số đề tài: DTDL.CN-53/19

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Achenbach J., Gallardo C., Nieto-Pelegrín E., Rivera-Arroyo B., Degefa-Negi T., Arias M., Jenberie S., Mulisa D., Gizaw D. & Gelaye E.

(2017). Identification of a new genotype of African swine fever virus in domestic pigs from Ethiopia. *Transboundary and emerging diseases*. 64(5): 1393-1404.

Anderson E., Hutchings G., Mukarati N. & Wilkinson P. (1998). African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease. *Veterinary microbiology*. 62(1): 1-15.

Bastos A.D., Penrith M.L., Cruciere C., Edrich J., Hutchings G., Roger F., Couacy-Hymann E. & Thomson G.R. (2003). Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Archives of virology*. 148(4): 693-706.

Carrascosa A.L., Santarén J.F. & Viñuela E. (1982). Production and titration of African swine fever virus in porcine alveolar macrophages. *Journal of virological methods*. 3(6): 303-310.

Casal I., Enjuanes L. & Vinuela E. (1984). Porcine leukocyte cellular subsets sensitive to African swine fever virus in vitro. *Journal of virology*. 52(1): 37-46.

Chapman D.A., Darby A.C., Da Silva M., Upton C., Radford A.D. & Dixon L.K. (2011). Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus. *Emerging infectious diseases*. 17(4): 599.

De Villiers E.P., Gallardo C., Arias M., Da Silva M., Upton C., Martin R. & Bishop R.P. (2010). Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. *Virology*. 400(1): 128-136.

Dixon L.K., Escribano J., Martins C., Rock D.L., Salas M. & Wilkinson P.J. (2005). *Asfarviridae*. Virus taxonomy, eighth report of the ICTV. pp. 135-143.

Enjuanes L., Carrascosa A., Moreno M. & Vinuela E. (1976). Titration of African swine fever (ASF) virus. *Journal of General Virology*. 32(3): 471-477.

Gallardo C., Nieto R., Soler A., Pelayo V., Fernández-Pinero J., Markowska-Daniel I., Pridotkas G., Nurmoja I., Granta R. & Simón A. (2015). Assessment of African swine fever diagnostic techniques as a response to the epidemic outbreaks in eastern european union countries: How to improve surveillance and control programs. *Journal of clinical microbiology*. 53(8): 2555-2565.

Ge S., Li J., Fan X., Liu F., Li L., Wang Q., Ren W., Bao J., Liu C. & Wang H. (2018). Molecular characterization of African swine fever virus, China. *Emerging infectious diseases*. 24(11): 2131.

Heilmann M., Lkhagvasuren A., Adyasuren T., Khishgee B., Bold B., Ankhambaatar U., Fusheng G., Raizman E. & Dietze K. (2020). African Swine Fever in Mongolia: Course of the Epidemic and

- Applied Control Measures. *Veterinary Sciences*. 7(1): 24.
- Kim H.J., Cho K.H., Lee S.K., Kim D.Y., Nah J.J., Kim H.J., Kim H.J., Hwang J.Y., Sohn H.J. & Choi J.G. (2020). Outbreak of African swine fever in South Korea. *Transboundary and Emerging Diseases*. 67(2): 473-475.
- Kleiboeker S., Scoles G., Burrage T. & Sur J.H. (1999). African swine fever virus replication in the midgut epithelium is required for infection of *Ornithodoros* ticks. *Journal of virology*. 73(10): 8587-8598.
- Knudsen R., Genovesi E., Whyard T. & Wool S. (1987). Cytopathogenic effect of African swine fever virus for pig monocytes: characterization and use in microassay. *Veterinary microbiology*. 14(1): 15-24.
- Le V.P., Jeong D.G., Yoon S.W., Kwon H.M., Trinh T.B.N., Nguyen T.L., Bui T.T.N., Oh J., Kim J.B., Cheong K.M., Van Tuyen N., Bae E., Vu T.T.H., Yeom M., Na W. & Song D. (2019). Outbreak of African Swine Fever, Vietnam. *Emerging Infect. Dis.* 25: 1433-1435.
- Malmquist W.A. & Hay D. (1960). Hemadsorption and cytopathic effect produced by African Swine Fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *American journal of veterinary research*. 21: 104-108.
- Montgomery R. E. (1921). On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *Journal of comparative pathology and therapeutics*. 34: 159-191.
- Muangkram Y., Sukmak M. & Wajjwalku W. (2015). Phylogeographic analysis of African swine fever virus based on the p72 gene sequence. *Genet Mol Res.* 14(2): 4566-4574.
- Neilan J.G., Zsak L., Lu Z., Burrage T.G., Kutish G.F. & Rock D.L. (2004). Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology*. 319(2): 337-342.
- Reed L.J. & Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints." *American journal of epidemiology*. 27(3): 493-497.
- Revilla Y., Perez-Nunez D. & Richt J.A. (2018). African swine fever virus biology and vaccine approaches. *Advances in virus research*, Elsevier. 100: 41-74.
- Sánchez-Vizcaíno J., Mur L., Gomez-Villamandos J. & Carrasco L. (2015). An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *Journal of comparative pathology*. 152(1): 9-21.
- Sierra M., Bernabe A., Mozos E., Mendez A. & Jover A. (1987). Ultrastructure of the liver in pigs with experimental African swine fever. *Veterinary Pathology*. 24(5): 460-462.
- Wilkinson P. & Wardley R. (1978). The replication of African swine fever virus in pig endothelial cells. *British Veterinary Journal*. 134(3): 280-282.
- Zhao D., Liu R., Zhang X., Li F., Wang J., Zhang J., Liu X., Wang L., Zhang J. & Wu X. (2019). Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China. *Emerging microbes & infections*. 8(1): 438-447.
- Zhou X., Li N., Luo Y., Liu Y., Miao F., Chen T., Zhang S., Cao P., Li X. & Tian K. (2018). Emergence of African swine fever in China, 2018. *Transboundary and emerging diseases*. 65(6): 1482-1484.