

NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ ĐỘC LỰC CỦA CHỦNG VIRUS DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI VNUA - ASFV - L01 PHÂN LẬP TẠI TỈNH HÀ NAM - VIỆT NAM TRÊN LỢN THÍ NGHIỆM

Trương Quang Lâm*, Nguyễn Thị Lan, Đào Lê Anh, Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Thị Thu Hương

Phòng thí nghiệm trọng điểm CNSH Thú y, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: tqlam@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 18.05.2020

Ngày chấp nhận đăng: 23.06.2020

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng gây bệnh trên lợn của chủng virus dịch tả lợn châu Phi VNUA - ASFV - L01 phân lập được từ ổ dịch tại tỉnh Hà Nam trong năm 2019. Tiến hành gây nhiễm cho lợn thí nghiệm bằng đường tiêm bắp gốc tai với liều virus 10^4 HAD₅₀. Lợn thí nghiệm biểu hiện sốt cao sau 48 giờ gây nhiễm, suy hô hấp và xuất huyết ngoài da sau 5-6 ngày gây nhiễm. Tất cả lợn thí nghiệm được gây nhiễm đã chết trong vòng 7-9 ngày sau gây nhiễm với những triệu chứng lâm sàng điển hình như sốt cao (41-42°C), tiêu chảy, nôn mửa, kém ăn, phản xạ kém, suy hô hấp, xuất huyết ở da, biểu hiện thần kinh, hôn mê; bệnh tích đại thể được quan sát thấy khi mổ khám là xuất huyết điển hình ở các mô, xuất huyết tại các hạch lympho, thận, lách, màng não, cơ tim và lách sưng thẫm dịch, gan và túi mật sưng. Kết quả phân tích virus huyết bằng phương pháp realtime PCR cho thấy vào ngày thứ 2 sau gây nhiễm bắt đầu có sự xuất hiện virus DTLCF trong máu, và virus nhân lên mạnh trong máu từ ngày 3-6 sau gây nhiễm. Kết quả nghiên cứu bước đầu này khẳng định chủng virus VNUA - ASFV - L01 có độc lực cao đối với lợn.

Từ khóa: Virus dịch tả lợn châu Phi, độc lực, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đại thể, virus huyết, bài thải.

Virulence in Experimental Pigs of Field African Swine Fever Virus Strain (VNUA - ASFV - L01) Isolated from Infected Pig in Ha Nam Province of Vietnam

ABSTRACT

This study aimed to assess the virulence in experimental pigs of field African swine fever virus strain (VNUA - ASFV - L01) belonged to genotype 2 which isolated from the infected pig during an outbreak occurred in Ha Nam province of Vietnam, 2019. The experimental pigs were intramuscularly inoculated with the virus at a dose of 10^4 HAD₅₀. All inoculated pigs showed acute disease manifestations and died between 7 and 9 days post-infection (dpi) with clinical features of ASF including high fever (41-42°C), diarrhea, vomiting, loss of appetite and reflexes, depression, respiratory distress, haemorrhages in the skin, neurological signs, coma and death. Haemorrhagic lesions were typically observed in multiple tissue organ in ASFV infected pigs with remarkable signs of diffuse hemorrhages in lymph nodes, renal cortex, haemorrhagic spleen, swollen liver, edema of the gall bladder, and hemorrhagic meninges... Analysis of viremia in the blood of pigs by real-time PCR showed that ASFV viremia was detected in the blood of pigs at 2 days post-inoculation, thereafter rapidly replication of field virus strain was observed in the blood of infected pigs at a later time point post-infection (days 3 to 6). These initial results indicate that VNUA - ASFV - L01 strain is highly virulent in pigs.

Keywords: African swine fever virus (ASFV), Virulence, clinical signs, pathological lesions. Viremia, shedding.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dịch tả lợn Châu Phi (DTLCP) do African swine fever virus (ASFV) có kích thước genome lớn (khoảng 170-190 kilobase) mã hóa

tương ứng cho 151 đến 157 protein, virus DNA sợi kép (chi Asfarvirus) thuộc họ Asfarviridae gây ra ở lợn nhà và lợn rừng (Tulman & cs., 2009). Bệnh có biểu hiện xuất huyết tràn lan ở nhiều cơ quan với tỷ lệ tử vong lên tới 100%

(Gómez-Villamandos & cs., 2013; Zao & cs., 2019; FAO, 2020). ASF được công bố lần đầu ở Kenya vào năm 1921 (Eustace Montgomery, 1921), sau đó nhanh chóng lan rộng ra các quốc gia châu Phi, châu Âu, châu Mỹ và châu Á khác (Gómez-Villamandos & cs., 2013; Zao & cs., 2019, FAO, 2020).

Trên thế giới, các nhà khoa học đã và đang tập trung nghiên cứu phân lập các chủng độc lực và nhược độc tự nhiên, nghiên cứu độc lực và phát triển vaccin phòng bệnh DTLCP (Rowlands & cs., 2008; Dixon & cs., 2013; Gallardo & cs., 2019; Zhao & cs., 2019). Đáng chú ý, năm 2007 và 2019 các nhóm nghiên cứu của Rowlands & Zhao đã phân lập thành công chủng độc lực cao ASFV Georgia 2007 và Pig/Heilongjiang/2018 thuộc genotype II từ lợn nhà tại Georgia và Trung Quốc, đây cũng chính là genotype đang gây bệnh ở châu Âu, Trung Quốc và Việt Nam thời gian qua, mở ra cơ hội cho các hướng nghiên cứu phòng bệnh và điều trị bệnh bằng vaccin, chế phẩm và tính ứng dụng thực tế của hướng nghiên cứu này trên toàn thế giới (Rowlands & cs., 2008; Dixon và cs., 2013; Reis & cs., 2016; O'Donnell & cs., 2017; Sánchez-Cordón & cs., 2017b; Zhao & cs., 2019). Cho đến nay, nghiên cứu sản xuất vaccin phòng DTLCP vẫn đang gặp nhiều cản trở do thiếu thông tin đầy đủ về cơ chế gây bệnh và miễn dịch.

Bệnh bùng phát lần đầu tiên tại Việt Nam vào đầu tháng 2/2019, sau đó nhanh chóng lan rộng ra khắp các tỉnh thành trên toàn quốc (63/63 tỉnh, thành phố) với hơn 6 triệu con lợn đã bị tiêu hủy tính đến đầu tháng 5/2020, bệnh đe dọa nghiêm trọng đến ngành chăn nuôi lợn tại Việt Nam. Chính phủ, cơ quan quản lý nhà nước và các nhà khoa học Việt Nam đã gặp nhiều khó khăn trong kiểm soát, nghiên cứu về bệnh DTLCP và đặt nhiệm vụ trọng tâm đối với nghiên cứu khẩn cấp các giải pháp tổng thể phòng, chống dịch bệnh DTLCP. Trong đó, nghiên cứu và sản xuất vaccin phòng bệnh DTLCP từ các chủng virus gây bệnh tại Việt Nam là hướng đi rất cần thiết, mang tính bền vững, lâu dài. Với mục tiêu làm tiền đề cho

nghiên cứu sâu về vaccin Dịch tả lợn châu Phi, việc nghiên cứu phân lập, lựa chọn được chủng virus đại diện đạt các tiêu chí về đặc tính sinh học, tính độc lực, tính sinh miễn dịch và ổn định từ các chủng virus DTLCP phân lập được từ các ổ dịch đóng vai trò quan trọng và cấp thiết. Chủng virus DTLCP ký hiệu VNUA - ASFV - L01 được Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ sinh học Thú y phân lập thành công từ mẫu bệnh phẩm thu thập từ ổ dịch tại tỉnh Hà Nam, Việt Nam vào tháng 5 năm 2019. Chủng virus được nuôi cấy và phát triển tốt trên môi trường tế bào phế nang lợn (PAM). Để góp phần lựa chọn được chủng virus DTLCP thích hợp dùng để sản xuất vaccin, trong nghiên cứu này nhóm nghiên cứu đã triển khai nghiên cứu đánh giá độc lực, khả năng nhân lên và bài thải của chủng virus VNUA - ASFV - L01 trên lợn thí nghiệm, từ đó xác định khả năng gây bệnh của chủng vi rút, làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về tạo chủng virus và sản xuất vaccin phòng bệnh DTLCP.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Chủng virus dịch tả lợn châu Phi VNUA - ASFV - L01 đạt hiệu giá 7.5×10^6 HAD₅₀/ml được phân lập từ mẫu lách của lợn nhiễm bệnh tại tỉnh Hà Nam vào tháng 5 năm 2019 tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ sinh học Thú y, Khoa Thú y

2.2. Phương pháp phân lập và hiệu giá virus DTLCP

Lợn khỏe mạnh, 6-7 tuần tuổi, âm tính với virus và kháng thể DTLCP, được lựa chọn để thu tế bào đại thực bào phế nang phổi (OIE, 2019). Chuẩn bị tế bào đại thực bào phế nang phổi trên những khay 12, 24 hoặc 48 giếng. Các mẫu bệnh phẩm chẩn đoán dương tính với virus dịch tả lợn châu Phi bằng phương pháp real-time PCR được xử lý thành huyền dịch sau đó gây nhiễm 100µl huyền dịch trên 1 giếng tế bào, ủ 37°C trong điều kiện có 5% CO₂ trong 3 tiếng. Loại bỏ dịch gây nhiễm và rửa lại bằng PBS 1X

bổ sung penicillin, streptomycin, neomycin hoặc gentamycin và kháng nấm (antifungal). Bổ sung môi trường RPMI 10% FBS hoặc 10% PS, 1% kháng sinh, 1% kháng nấm, 2% hồng cầu lợn, nuôi cấy trong điều kiện 37°C với 5% CO₂, theo dõi bệnh tích hàng ngày. Chủng virus sau phân lập, cấy chuyển 7 đời được xác định hiệu giá bằng phương pháp pha loãng cơ số 10, sau đó gây nhiễm tế bào như mô tả trong mục phân lập vi rút. Sau đó, căn cứ vào nồng độ pha loãng, số giếng có bệnh tích tế bào, tỷ lệ bị nhiễm virus ở những giếng có độ pha loãng virus khác nhau mà tính ra log HAD₅₀ sử dụng phương pháp Reed & Muench.

2.3. Tách chiết DNA

DNA tổng số được tách chiết từ huyền dịch mẫu bệnh phẩm lách và dịch nuôi cấy tế bào, sử dụng hệ thống chiết tách DNA tự động (Kingfisher Duo Prime, Thermo Scientific, Mỹ) với Kit chiết tách DNA tổng số thương mại kèm theo hệ thống tách chiết (Thermo Scientific, Mỹ). Các bước chiết tách DNA tổng số được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.4. Phương pháp PCR và Realtime PCR

Phản ứng realtime PCR phát hiện virus DTLCP được thực hiện bằng cặp môi probe (p72) theo quy trình đã công bố trước đây (Tignon, 2011). Sản phẩm DNA tổng số tách chiết được phối trộn với cặp môi probe và các thành phần của Quantabio One-Step RT-qPCR ToughMix Kit (Quantabio, Mỹ) và thực hiện theo quy trình đã được công bố (OIE 2019; Tignon, 2011). Kết quả được phân tích dựa trên mức độ DNA của virus DTLCP trong mẫu xét nghiệm thông qua giá trị chu kỳ ngưỡng (threshold cycle values: Ct, Ct <39 được coi là dương tính).

Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen P72 sử dụng cặp môi p72 theo quy trình đã được công bố và khuyến cáo trước đây (OIE, 2019; Agüero & cs., 2003). Thành phần phản ứng có thể tích 50µl bao gồm: 10µl 5X Q5 Reaction Buffer; 1 µl dNTPs (10mM); 2,5µl môi xuôi (10µM); 2,5µl môi ngược (10µM); 1µl High-Fidelity DNA Polymerase; 5µl DNA khuôn và H₂O lên đến

50µl, với các điều kiện phản ứng tuân theo nghiên cứu đã công bố. Sản phẩm PCR dương tính sẽ được tinh sạch trực tiếp bằng bộ sinh phẩm QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR tinh sạch sau đó sẽ được sử dụng để giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Trình tự nucleotide được phân tích bằng phần mềm Bioedit. Dựng các cây phát sinh chủng loài với các trình tự gen đã xác định bằng phần mềm MEGA 4.1 theo phương pháp Neighbor Joining với giá trị Bootstrap là 1.000. Các trình tự tham chiếu trên thế giới sẽ được thu nhận từ GenBank.

2.5. Gây nhiễm và đánh giá độc lực trên lợn thí nghiệm

Lợn thí nghiệm 6-7 tuần tuổi, khỏe mạnh, không nhiễm virus tai xanh, virus dịch tả lợn cổ điển, virus dịch tả lợn châu Phi, virus circo type 2.

Lợn thí nghiệm được chia làm 2 lô, lô thí nghiệm có 4 lợn, lô đối chứng 2 lợn tại 2 chuồng riêng biệt trong cùng 1 khu hành lang cách ly thuộc Khu nuôi động vật thí nghiệm Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Lợn được gây nhiễm với chủng virus VNUA - ASFV - L01 phân lập tại tỉnh Hà Nam, liều 2 ml/con, đường tiêm bắp gốc tai với hiệu giá virus 10⁴HAD₅₀. Sau gây nhiễm, hàng ngày theo dõi thân nhiệt, quan sát và ghi chép các triệu chứng lâm sàng của lợn thí nghiệm và lợn đối chứng trong thời gian thí nghiệm. Lấy mẫu máu và mẫu swab để xác định sự có virus huyết trong máu, sự bài thải virus theo dịch tiết nước bọt (oral fluid swab) và phân (rectal swab) bằng kỹ thuật realtime PCR trong thời gian nghiên cứu tính từ ngày tiến hành gây nhiễm. Lợn chết được mổ khám để kiểm tra bệnh tích đại thể và lấy mẫu kiểm tra.

2.5. Xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm về triệu chứng lâm sàng, thân nhiệt, bệnh tích đại thể và các kết quả realtime PCR được thu thập và xử lý trên phần mềm Excel.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Triệu chứng lâm sàng của lợn thí nghiệm sau gây nhiễm

Trong nghiên cứu này, thực hiện gây nhiễm chủng virus DTLCP ký hiệu VNUA - ASFV - L01 được phân lập từ 01 ổ dịch DTLCP tại tỉnh Hà Nam. Virus thuộc genotype II và có gen di truyền gần với virus DTLCP gây bệnh tại Trung

Quốc (kết quả không được trình bày); hiệu giá của virus gây nhiễm 10^6 HAD₅₀/ml.

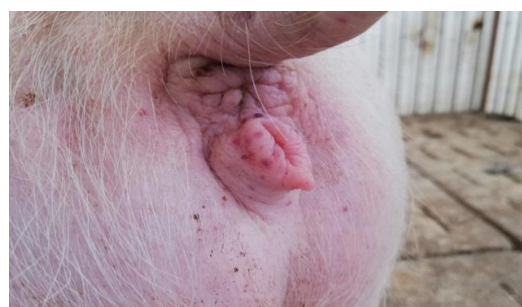
Kết quả ở bảng 1 cho thấy lợn thí nghiệm có biểu hiện triệu chứng lâm sàng đặc trưng như bỏ ăn, mệt mỏi, sốt cao, khó thở sau gây nhiễm 2-4 ngày và xuất huyết ngoài da sau 5-6 ngày sau gây nhiễm. Lợn ở lô đối chứng khỏe mạnh bình thường.

Bảng 1. Triệu chứng lâm sàng của lợn thí nghiệm được gây nhiễm chủng virus VNUA - ASFV - L01

Triệu chứng lâm sàng	Số con biểu hiện	Tỷ lệ (%)
Sốt cao	4/4	100
Mệt mỏi	4/4	100
Bỏ ăn	4/4	100
Biểu hiện thần kinh	3/4	75
Nổi xuất huyết trên da	3/4	75
Khó thở, suy hô hấp	3/4	75
Hậu môn có xuất huyết	2/4	50



1. Xuất huyết ngoài da



2. Xuất huyết hậu môn



3. Lợn có triệu chứng thần kinh



4. Lợn có biểu hiện hôn mê trước khi chết

Hình 1. Triệu chứng lâm sàng của lợn thí nghiệm sau gây nhiễm với chủng virus VNUA - ASFV - L01

Sốt là biểu hiện đầu tiên ghi nhận được trên lợn gây nhiễm virus chủng VNUA - ASFV - L01, thân nhiệt lợn tăng cao, dao động trong khoảng 40-42°C. Tỷ lệ lợn có triệu chứng sốt cao chiếm 100%. Đồng thời 100% lợn mắc bệnh DTLCP đều xuất hiện triệu chứng mệt mỏi, ủ rũ, kém ăn, bỏ ăn. Ngoài ra, lợn thí nghiệm có triệu chứng xuất huyết ngoài da ở vùng tai, hông (75,0%), đây là triệu chứng điển hình thường gặp ở lợn mắc bệnh DTLCP ngoài thực địa. Đáng chú ý, lợn nhiễm bệnh có triệu chứng khó thở, suy hô hấp điển hình chiếm tỷ lệ 75,00% và 50% số lợn có xuất huyết điểm ở hậu môn.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy sau gây nhiễm với chủng virus VNUA - ASFV - L01, 04 lợn thí nghiệm bắt đầu có biểu hiện sốt cao (40,1-41,2°C) sau 2 ngày gây nhiễm, đỉnh điểm ở ngày thứ 6 và thứ 7 (41,7-42,2°C), sau đó thân nhiệt lợn thí nghiệm giảm kèm triệu chứng thần kinh ở 1-2 ngày cuối, hôn mê và chết. Lợn ở lô đối chứng thân nhiệt ổn định (37,1-38,2°C).

3.2. Biểu hiện bệnh tích đặc trưng của lợn thí nghiệm sau gây nhiễm

Bốn lợn thí nghiệm được gây nhiễm với chủng virus VNUA - ASFV - L01 đã chết trong vòng 6-9 ngày sau gây nhiễm với những tổn thương bệnh tích đại thể đặc trưng là xuất huyết và thối dịch ở các cơ quan nội tạng, kết quả tổng hợp được trình bày ở bảng 3.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy lợn thí nghiệm gây nhiễm chủng virus VNUA - ASFV - L01 có biểu hiện bệnh tích đại thể điển hình như 100% xuất huyết ở các hạch lympho ở dưới hàm, dạ dày, gan, thận, phổi, màng treo ruột. Phổi phù nề và xuất huyết (50%), màng não xuất huyết (100%), xuất huyết cơ tim (75%). Lách sưng to, thối dịch màu đen (100%). Thận sưng, có xuất huyết điểm (100%). Ruột và dạ dày xuất huyết điểm trên bề mặt (75%). Có viêm tích dịch xoang bao tim và xoang ngực hoặc xoang bụng (100%).

Bảng 2. Thân nhiệt của lợn thí nghiệm gây nhiễm chủng virus VNUA - ASFV - L01

Lợn TN	1dpi	2dpi	3dpi	4dpi	5dpi	6dpi	7dpi	8dpi	9dpi
1	38,5	40,5	41,3	41,5	41,7	42,0	39,5	*	
2	38,5	40,2	41,2	41,6	41,9	42,2	41,8	38,6	*
3	38,4	40,7	41,6	42,0	41,1	*			
4	39,0	41,0	41,4	41,9	41,8	40,2	*		
ĐC 1	37,6	38,0	37,5	37,6	38,2	37,9	37,8	37,5	38,0
ĐC 2	37,1	37,2	37,5	37,8	38,1	37,8	37,5	37,8	38,1

Ghi chú: Dấu (*): Lợn thí nghiệm chết; Dpi: Ngày post infection - ngày sau gây nhiễm

Bảng 3. Bệnh tích đại thể của lợn thí nghiệm được gây nhiễm chủng virus VNUA - ASFV - L01

Bệnh tích đại thể	Số con biểu hiện	Tỷ lệ (%)
Hạch lympho sưng đen, xuất huyết	4/4	100
Lách sưng to, thối dịch màu đen	4/4	100
Thận sưng, xuất huyết điểm vùng vỏ thận	4/4	100
Màng não xuất huyết	4/4	100
Dạ dày, ruột xuất huyết điểm trên bề mặt	3/4	75
Phổi xuất huyết	2/4	50
Tim và cơ tim xuất huyết	3/4	75
Gan và túi mật sưng	3/4	75
Viêm tích dịch xoang bao tim và xoang ngực hoặc xoang bụng	4/4	100



1. Hạch lympho sung, xuất huyết



2. Hạch màng treo ruột non sung, xuất huyết



3. Lách sung to, thấm dịch màu đen



4. Dạ dày xuất huyết



5. Gan sung



6. Túi mật sung



7. Thận xuất huyết điểm



8. Não xuất huyết

Hình 2. Bệnh tích đại thể của lợn thí nghiệm sau gây nhiễm với chủng virus VNUA - ASFV - L01

Có một số bằng chứng *in vivo* cho biết các tế bào nội mô mạch máu có vai trò ảnh hưởng đến sự tăng tính thấm thành mạch và tổng hợp fibrin gây hiện tượng xuất huyết của bệnh DTLCP (Valle & cs., 2001). Các yếu tố liên quan đến giảm bạch cầu lympho và giảm tiểu cầu, phá hủy các tế bào nội mô mạch máu và khởi phát đông máu nội mạch lan tỏa. Biểu hiện tổn thương ở hạch bạch huyết là phổ biến trong tất cả các thể của bệnh dịch tả lợn châu Phi. Các hạch lympho có các tổn thương từ tụ máu vừa phải đến xuất huyết lan tỏa (Galindo-Cardiel & cs., 2013; Sánchez-Vizcaíno & cs., 2015). Xuất huyết trong vỏ thận là tổn thương phổ biến ở bệnh DTLCP (Gómez-Villamandos & cs., 1997). Phù quanh thận cũng xảy ra với các hình thức bán cấp. Xuất huyết ở bàng quang đôi khi được quan sát dọc theo bề mặt niêm mạc. Những thay đổi này không thường dẫn đến hiện tượng đái ra máu (Galindo-Cardiel & cs., 2013; Sánchez-Vizcaíno & cs., 2015). Trong tim, xảy ra hiện tượng tụ máu tại bề mặt ngoại tâm mạc và nội tâm mạc, cũng như mạch vành (Ayoade & Adeyemi, 2003; Wilkinson & cs., 1981). Tràn dịch màng bao tim được tìm thấy ở thể bệnh bán cấp tính, trong khi thể bệnh mạn tính có thể dẫn đến viêm màng ngoài tim (Sánchez-Vizcaíno & cs., 2015). Hiện tượng phù túi mật là phổ biến (Galindo-Cardiel & cs., 2013; Sánchez-Vizcaíno & cs., 2015). Tổn thương ít phổ biến hơn bao gồm xuất huyết tụ và hoại tử. Tổn thương xuất huyết ít được quan sát thấy trong các dạng ASF mãn tính. Sự biến đổi bệnh tích đại thể tại các cơ quan chính là sự tăng sinh và cạn kiệt các tế bào thực bào trong nhiều cơ quan, chẳng hạn như các tế bào Kupffer trong gan hoặc thực bào phế nang và đại thực bào kẽ trong phổi (Fernandez & cs., 1992b). Điều này được đi kèm với tổn thương ở mạch máu như sung huyết, xuất huyết và huyết khối.

Nhiều nghiên cứu sử dụng đường gây nhiễm bằng tiêm bắp đã cho thấy lách là cơ quan đầu tiên bị ảnh hưởng (Childerstone & cs., 1998); trong khi đó nghiên cứu tiêm truyền qua đường miệng, mũi và khí dung báo cáo amidan và/hoặc các hạch bạch huyết ở đầu và cổ là vị trí chính của nhiễm virus (Wilkinson & Donaldson,

1977). Những nghiên cứu về tổn thương bệnh lý chủ yếu của bệnh dịch tả lợn châu Phi cho biết các tổn thương bệnh lý xuất huyết toàn thân, lách sưng to và xuất huyết, hạch sưng to gặp ở thể cấp tính (Gómez-Villamandos & cs., 2003; Sánchez-Vizcaíno & cs., 2015). Những thay đổi này có thể khác nhau về mức độ nghiêm trọng tùy thuộc vào dạng bệnh. Bệnh tích trên lách to vừa phải trong thể bệnh mạn tính đến to rõ rệt, xuất huyết và lá lách dễ vỡ trong bệnh cấp tính. Nhiễm huyết ở lách là tổn thương phổ biến trong nhiễm trùng bán cấp (Sánchez-Vizcaíno & cs., 2015).

Thời gian ủ bệnh của DTLCP khác nhau phụ thuộc độc lực của các chủng virus và các loài động vật, thường dao động từ 3 đến 19 ngày. Trong nghiên cứu này, lợn được gây nhiễm bắt đầu có dấu hiệu triệu chứng lâm sàng của bệnh sớm từ ngày 2-3 sau gây nhiễm, và tất cả các động vật đã chết trong khoảng 7-9 ngày sau gây nhiễm. Kết quả nghiên cứu tương đồng với thử nghiệm độc lực của chủng virus DTLCP Pig/HLJ/18 phân lập từ ổ dịch tại thành phố Jiamusi, tỉnh Hắc Long Giang, Trung Quốc vào ngày 2/9/2018 trên lợn thí nghiệm (Zhao & cs., 2019). Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy chủng virus Dịch tả lợn Châu Phi VNUA - ASFV - L01 có độc lực cao với lợn, có khả năng gây bệnh ở thể cấp tính.

3.3. Kết quả xác định virus huyết và sự bài thải virus của lợn thí nghiệm sau gây nhiễm

Kết quả kiểm tra virus huyết trong máu xác định bằng giá trị Ct trong phương pháp Realtime PCR (Zani & cs., 2018) được trình bày ở bảng 4.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy 04/04 lợn thí nghiệm sau 48h gây nhiễm đã phát hiện thấy sự có mặt của virus DTLCP trong mẫu máu bằng phương pháp Realtime PCR, giá trị Ct dao động từ 34,13-32,16. Điều này chứng tỏ đã gây nhiễm thành công virus DTLCP VNUA - ASFV - L01 cho lợn thí nghiệm. Kết quả phân tích giá trị Ct mẫu máu của 04/04 lợn thí nghiệm sau gây nhiễm đều tăng lên và đạt ngưỡng cao ở ngày thứ

4 và thứ 5 với giá trị Ct dao động 20,68-17,11 và đạt ngưỡng cao nhất ở thời điểm 6-8 ngày sau gây nhiễm với giá trị Ct dao động 17,84-15,73. Điều này chứng tỏ virus DTLCP bắt đầu nhân lên mạnh trong máu trong cơ thể động vật thí nghiệm từ ngày thứ 3 trở đi sau gây nhiễm với chủng virus VNUA - ASFV - L01. Phân tích kết quả realtime PCR đối với virus huyết và thân

nhật của lợn thí nghiệm sau gây nhiễm cũng cho thấy mối tương quan giữa triệu chứng sốt cao và khả năng nhân lên của chủng virus VNUA - ASFV - L01 trong máu ở lợn thí nghiệm. Kết quả này tương đồng với những nghiên cứu gần đây đối với chủng virus DTLCP Georgia 2007/1 tại Mỹ và Pig/HLJ/18 tại Trung Quốc (Ramirez-Medina & cs., 2019; Zhao & cs., 2019).

Bảng 4. Kết quả giá trị Ct của realtime PCR trên mẫu máu lợn thí nghiệm theo thời gian sau gây nhiễm chủng virus VNUA - ASFV - L01

Lợn thí nghiệm	Giá trị Ct ở các thời điểm sau gây nhiễm								
	1 dpi	2 dpi	3 dpi	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi	9 dpi
TN1	N/A	33,25	22,54	19,41	18,14	16,59	16,08	Chết	
TN2	N/A	35,16	24,15	20,46	18,22	16,29	16,04	15,93	Chết
TN3	36,42	30,05	20,39	17,52	16,38	15,89	Chết		
TN4	N/A	32,13	21,15	18,68	16,71	16,22	16,35	Chết	
ĐC1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
ĐC2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Ghi chú: Giá trị N/A: Âm tính; Giá trị Ct <39: Dương tính; Dpi: Day post infection - ngày sau gây nhiễm

Bảng 5. Kết quả giá trị Ct của realtime PCR trên mẫu swab phân và swab dịch nước bọt lợn thí nghiệm theo thời gian sau gây nhiễm chủng virus VNUA - ASFV - L01

Ngày sau gây nhiễm	Mẫu dịch swab	Lợn gây nhiễm				Lợn đối chứng	
		TN1	TN2	TN3	TN4	ĐC1	ĐC2
2 dpi	Phân	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Dịch nước bọt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
3 dpi	Phân	36,42	37,51	35,47	36,29	N/A	N/A
	Dịch nước bọt	34,21	34,89	33,08	33,62	N/A	N/A
4 dpi	Phân	34,16	35,47	33,26	34,32	N/A	N/A
	Dịch nước bọt	32,14	32,72	31,54	32,07	N/A	N/A
5 dpi	Phân	30,94	32,68	30,24	31,17	N/A	N/A
	Dịch nước bọt	31,25	31,42	28,16	30,11	N/A	N/A
6 dpi	Phân	29,03	30,42	29,35	29,56	N/A	N/A
	Dịch nước bọt	27,29	28,37	26,41	26,84	N/A	N/A
7 dpi	Phân	28,67	29,51	Chết	28,31	N/A	N/A
	Dịch nước bọt	26,51	27,16		26,04	N/A	N/A
8 dpi	Phân	Chết	29,82		Chết	N/A	N/A
	Dịch nước bọt		25,73			N/A	N/A
9 dpi	Phân		Chết			N/A	N/A
	Dịch nước bọt					N/A	N/A

Ghi chú: Giá trị N/A: Âm tính; Giá trị Ct <39: Dương tính; Dpi: Day post infection - ngày sau gây nhiễm..

Theo các nghiên cứu trước đây, virus huyết được định nghĩa là thời kỳ virus có mặt trong máu và có sự nhân lên của virus trong cơ thể động vật, giai đoạn nhiễm virus DTLCP được ghi nhận sớm nhất là sau 2 ngày sau gây nhiễm bệnh (Wilkinson & cs., 1981) hoặc 1-2 ngày trước khi có biểu hiện sốt (Greig & Plowright, 1970). Tùy thuộc vào độc lực của chủng virus liên quan, liều gây nhiễm vi rút, triệu chứng bệnh tích lâm sàng của mỗi chủng virus DTLCP có thể khác nhau. Virus DTLCP đặc trưng tấn công hệ bạch huyết, nhân lên trong tế bào bạch cầu (Gómez-Villamandos & cs., 2013), virus làm tăng tính thấm thành mạch, là nguyên nhân sự xuất huyết tràn lan ở các cơ quan tổ chức, làm con vật chết nhanh chóng.

Kết quả kiểm tra sự có mặt của virus DTLCP trong dịch tiết (swab phân và swab dịch nước bọt) của lợn thí nghiệm được xác định bằng giá trị Ct trong phương pháp Realtime PCR, trình bày ở bảng 5. Kết quả bảng 5 cho thấy vào ngày thứ 5 sau gây nhiễm bắt đầu có sự xuất hiện virus trong dịch tiết (Swab dịch nước bọt và swab phân) của lợn thí nghiệm. Sự bài thải virus liên tục các ngày sau đó, đến khi lợn thí nghiệm chết.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu bước đầu xác định được chủng virus DTLCP ký hiệu VNUA - ASFV - L01 có độc lực cao đối với lợn, biểu hiện triệu chứng lâm sàng và bệnh tích đại thể đặc trưng thể bệnh cấp tính trong tự nhiên. Kết quả kiểm tra virus huyết cho thấy vào ngày thứ 2 sau gây nhiễm bắt đầu có sự xuất hiện virus DTLCP trong máu, và virus nhân lên mạnh trong máu từ ngày 3-6 sau gây nhiễm. Khả năng bài thải virus ra ngoài môi trường qua dịch nước bọt và phân bắt đầu từ ngày thứ 3 sau gây nhiễm, tương đồng với những mô tả trước đây tại Trung Quốc và trên thế giới, thời gian bài thải virus liên tục cho đến khi lợn thí nghiệm chết. Kết quả nghiên cứu là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về tạo chủng vi rút, phát triển các chế phẩm và vaccin phòng bệnh DTLCP.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài cấp Nhà nước “Nghiên cứu chế tạo vaccin nhược độc phòng bệnh dịch tả lợn châu Phi tại Việt Nam” mã số đề tài: ĐT.02/DAKH-01/19-HĐ/ĐTĐL.CN-CNN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aguero M., Fernandez J., Romero L., Sanchez Mascaraque C., Arias M. & Sanchez-Vizcaino J.M. (2003). Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 41(9):4431-4.
- Ayoade G. & Adeyemi I. (2003). African swine fever: an overview. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 56 (3-4):129-134.
- Childerstone A., Takamatsu H., Yang H., Denyer M. & Parkhouse R.M. (1998). Modulation of T cell and monocyte function in the spleen following infection of pigs with African swine fever virus. *Vet Immunol. Immunopathol.* 62 (4): 281-296.
- Greig A. & Plowright W. (1970). The excretion of two virulent strains of African swine fever virus by domestic pigs. *J. Hyg.* 68: 673-682.
- Gomez-Villamandos J. C., Hervas J., Moreno C., Carrasco L., Bautista M.J., Caballero J.M., Wilkinson P. J. & Sierra M. A. (1997). Subcellular changes in the tonsils of pigs infected with acute African swine fever virus. *Vet. Res.* 28: 179-189.
- Gomez-Villamandos J.C., Bautista M.J., Sanchez-Cordon P.J. & Carrasco L. (2013). Pathology of African swine fever: the role of monocyte-macrophage. *Virus Research.* 173:140-149.
- Gallardo C., Soler A., Rodze I., Nieto R., Cano-Gómez C., Fernandez-Pinero J. & Arias M. (2019). Attenuated and non-haemadsorbing (non-HAD) genotype II African swine fever virus (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017. *Transbound. Emerg. Dis.* doi: 10.1111/tbed.13132.
- Kipanyula M.J. & Nong'ona S.W. (2017). Variations in clinical presentation and anatomical distribution of gross lesions of African swine fever in domestic pigs in the southern highlands of Tanzania: a field experience. *Trop Anim Health Prod.* 49: 303-310.
- O'Donnell V., Risatti G.R., Holinka L.G., Krug P.W., Carlson J., Velazquez-Salinas L., Azzinaro P.A., Gladue D.P. & Borca M.V. (2017). Simultaneous deletion of the 9GL and UK Genes from the African swine fever virus Georgia 2007 isolate offers increased safety and protection against homologous challenge. *J. Virology.* 91: e01760-16.

- Sargsyan M.A., Voskanyan H.E. & Karalova E.M. (2018). Third wave of African swine fever infection in Armenia: virus demonstrates the reduction of pathogenicity. *Vet World*. 11: 5-9.
- Sánchez-Vizcaíno J.M., Mur L., Gomez - Villamandos J.C. & Carrasco L. (2015). An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J Comp Pathol*. 152(1): 9-21.
- Sánchez-Cordón P.J., Jabbar T., Berrezaie M., Chapman D., Reis A., Sastre P., Rueda P., Goatley L. & Dixon L.K. (2017b). Evaluation of protection induced by immunisation of domestic pigs with deletion mutant African swine fever virus BeninDMGF by different doses and routes. *Vaccine*. 36(5): 707-715.
- Reis A.L., Abrams C.C., Goatley L.C., Netherton C., Chapman D.G., Sanchez-Cordon P. & Dixon L.K. (2016). Deletion of African swine fever virus interferon inhibitors from the genome of a virulent isolate reduces virulence in domestic pigs and induces a protective response. *Vaccine*. 34: 4698-4705.
- Ramirez-Medina E., Vuono E., O'Donnell V., Holinka L.G., Silva E., Rai A., Pruitt S., Carrillo C., Gladue D.P. & Borca M.V. (2019). Differential Effect of the Deletion of African Swine Fever Virus Virulence-Associated Genes in the Induction of Attenuation of the Highly Virulent Georgia Strain. *Viruses*. 11(7). pii: E599. doi: 10.3390/v11070599.
- Rowlands R.J., Michaud V., Hutchings L.G., Oura C., Vosloo W., Dwarka R., Onashvili T., Albina E. & Dixon L.K. (2008). African Swine Fever Virus Isolate, Georgia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 14(12): 1870-1874.
- Tignon M., Gallardo C., Iscari C., Hutet E., Van der Y., Kolvasov D., De mia G.M., Le Potier M.F., Bishop R.P., Arias M. & Koenen F. (2011). Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. *J. Virol. Methods*. 178:161-167.
- Vallée I., Stephen W.G. Tait & Penelope P. Powell. (2001). African Swine Fever Virus Infection of Porcine Aortic Endothelial Cells Leads to Inhibition of Inflammatory Responses, Activation of the Thrombotic State and Apoptosis. *J Virol*. 75(21): 10372-10382.
- Zani L., Forth J.H., Forth L., Nurmoja I., Leidenberger S., Henke J., Viltrop A., Höper D., Beer M. & Blome S. (2018). Deletion at the 5'-end of Estonian ASFV strains associated with an attenuated phenotype. *Nature Scientific Reports*. 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-24740-1
- Zhao D., Liu R., Zhang X., Li F., Wang J., Zhang J., Liu X., Wang L., Zhang J., Wu X., Guan Y., Chen W., Wang X., He X. & Bu Z. (2019). Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China. *Emerging Microbes & Infections*. 8: 438-477.
- Wilkinson P.J., Wardley R.C. & Williams S.M. (1981). African swine fever virus (Malta/78) in pigs. *J. Comp. Pathol*. 91(2): 277-284.
- Wilkinson P.J. & Donaldson A.I. (1977). Transmission studies with African swine fever virus. The early distribution of virus in pigs infected by airborne virus. *J. Comp. Pathol*. 87(3):497-501.
- OIE terrestrial manual (2019). Section 3.8, Chapter 3.8.1. African swine fever virus (Infection with African swine fever virus. Retrieved from https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.01_ASF.pdf, on May 16, 2020.