

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ BIẾN ĐỔI BỆNH LÝ VÀ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA FELINE PANLEUKOPENIA VIRUS PHÂN LẬP TRÊN MÈO Ở HÀ NỘI

Nguyễn Thị Yến*, Nguyễn Vũ Sơn, Nguyễn Thị Ngọc,
Lê Văn Hùng, Nguyễn Thị Giang, Phạm Quang Hưng

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: ntyen@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 20.10.2020

Ngày chấp nhận đăng: 03.06.2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định các biến đổi bệnh lý và đặc tính sinh học của FPV gây bệnh trên mèo nuôi ở Hà Nội. Tổng số 8 con mèo từ 2 tháng tới 1 năm tuổi đã được quan sát triệu chứng, mổ khám và thu mẫu để nhuộm HE. Kết quả nghiên cứu cho thấy mèo bị bệnh giảm bạch cầu do FPV có các triệu chứng nôn mửa, mất nước, tiêu chảy... Bệnh tích đại thể ở dạ dày, ruột gồm sung huyết, niêm mạc xuất huyết, chất chứa trong lòng ruột có mùi tanh máu. Bệnh tích vi thể rõ nhất ở ruột với nang lympho thành ruột tăng sinh, thoái hóa tế bào biểu mô, lông nhung đứt gãy. Số lượng bạch cầu lympho giảm mạnh ở vùng vỏ các nang hạch màng treo ruột; bạch cầu đơn nhân lớn và đại thực bào tăng mạnh. Kết quả phân lập virus trên tế bào CRFK đã thu được 5 chủng virus khác nhau với hiệu giá dao động từ $1,77 \times 10^8$ đến $1,77 \times 10^9$ TCID₅₀/ml. Kết quả nghiên cứu về đường cong sinh trưởng của virus cho thấy với liều gây nhiễm MOI = 0,001, hiệu giá virus đạt giá trị cao nhất là $10^{10,5}$ TCID₅₀/ml sau 36 giờ gây nhiễm virus.

Từ khóa: Bệnh giảm bạch cầu mèo, bệnh lý, FPV, parvovirus, phân lập virus.

Pathological Features and Biological Characteristics of Feline Panleukopenia Virus Isolate from Cat in Hanoi

ABSTRACT

The study was conducted in order to determine the pathological and biological features of the feline panleukopenia virus causing disease in domestic cats in Hanoi. In the present study, eight cats from 2 months to 1 year-old-age were observed for clinical symptoms, and collected samples were collected for a histopathology examination. The results showed that feline leukopenia caused by FPV had symptoms of vomiting, dehydration, and diarrhea, etc. Gastrointestinal lesions included congestion, mucosal hemorrhage, bloody substance contents. The major microscopic lesions were proliferation of the intestinal lymphatic nodules, with epithelial cell degeneration, collapsed villi of the intestine. The number of lymphocytes decreased sharply in the mesenteric lymph nodes, whereas monocytes and macrophages increased. The virus isolation results on CRFK cells have obtained 5 different virus strains with titers ranging from 1.77×10^8 to 1.77×10^9 TCID₅₀/ml. The present findings on the growth curve of the virus showed that with the multiplicity of infectious dose MOI = 0.001, the highest viral titration was $10^{10,5}$ TCID₅₀/ml after 36 hours post-infection.

Keywords: Feline panleukopenia, pathology, FPV, parvovirus, virus isolation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh giảm bạch cầu truyền nhiễm ở mèo (Feline panleukopenia) hay còn gọi là bệnh viêm ruột truyền nhiễm ở mèo (Feline infectious

enteritis) là một trong các bệnh nguy hiểm trên mèo, đặc biệt là mèo con (Bentinck-Smith, 1949). Bệnh do Feline panleukopenia virus (FPV), một prototype parvovirus thuộc họ *Parvoviridae* trên động vật ăn thịt gây ra

(Truyen & cs., 2009). Bệnh được ghi nhận lần đầu tiên vào những năm đầu của thế kỉ XX (Verge & Christoforoni, 1928). FPV là một loại virus DNA mạch đơn, không có vỏ bọc, bộ gen khoảng 5,1kb. Mèo nhiễm bệnh thường xuất hiện một số triệu chứng lâm sàng điển hình như nôn mửa, mất nước, tiêu chảy và thường có tỉ lệ mắc và tỉ lệ tử vong trên 90% ở mèo con (Truyen & cs., 2009).

Trong chẩn đoán lâm sàng, số lượng bạch cầu trong chỉ tiêu huyết học giảm rõ rệt rất thường gặp trên các mèo mắc FPV (Bennet & Gaskell, 1996; Cave & cs., 2002; Greene, 2006). Đồng thời, các biến đổi bệnh tích đại thể, vi thể là một trong những cơ sở khoa học được ứng dụng trong quá trình chẩn đoán lâm sàng cho mèo mắc FPV. Cùng với việc chẩn đoán FPV, phân lập và xác định đặc tính sinh học của các chủng FPV lưu hành có vai trò quan trọng, là tiền đề cho các nghiên cứu chuyên sâu như phát triển vaccin, chế phẩm sinh học. Đến nay, các nghiên cứu phân lập virus trên môi trường tế bào MYA - 01, CRFK (Crandell feline kidney cells) đã được thực hiện bởi nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới (Goto, 1974; Konishi, 1975; Truyen & cs., 2009; Yang & cs., 2010; Fei-Fei & cs., 2017; Leal & cs., 2020). Tuy nhiên, FPV vẫn chưa được quan tâm nghiên cứu cũng như chưa từng được phân lập thành công từ mẫu phân hay ruột tại Việt Nam. Do đó, đặc tính sinh học của các chủng FPV tự nhiên, phân lập tại Việt Nam là rất cần thiết, làm cơ sở khoa học cho việc xây dựng ngân hàng chủng giống virus phục vụ cho các nghiên cứu chuyên sâu về bệnh. Với mục đích như trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu một số biến đổi bệnh lý, phân lập và kiểm tra đặc tính sinh học của virus gây bệnh giảm bạch cầu truyền nhiễm trên mèo ở khu vực Hà Nội.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu mổ khám được thu từ 8 con mèo 2 tháng tới 1 năm tuổi biểu hiện các triệu chứng đường tiêu hoá như bỏ ăn, ỉa chảy, nôn... Những mèo này được khám tại Bệnh viện Thú y, Học

viện Nông nghiệp Việt Nam trong khoảng thời gian từ tháng 6/2019 đến tháng 9/2020. Đồng thời, mẫu ruột và phân của mèo nghi nhiễm cũng được thu thập khẳng định nhiễm bằng phương pháp PCR. Ngoài ra, mẫu phân (3 con) hoặc ruột (2 con) của 5 con mèo mổ khám ngay sau khi chết được dùng để phân lập FPV.

Tế bào CRFK (CRFKATCC® CCL-94™) được nuôi cấy trên khay hoặc bình nuôi cấy để phục vụ cho quá trình phân lập virus. Môi trường tế bào được sử dụng là môi trường DMEM có chứa 5% FBS, 1% antibiotic - antimycotic (penicilline, streptomycine, amphotericine).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp làm tiêu bản bệnh lý

Mẫu bệnh phẩm từ các cơ quan: hạch màng treo ruột, phổi, tim, lách, ruột, thận... của 8 mèo được ngâm cố định trong dung dịch formol trung tính 10% ngay sau khi mổ khám. Với mỗi cơ quan, ba vị trí khác nhau được thu vào 3 block sau đó được xử lý theo quy trình tẩm đục khối parafin cắt tiêu bản (độ dày 2-4µm), nhuộm bằng Hematoxylin - Eosin (HE). Các tổn thương vi thể được quan sát và đánh giá dưới kính hiển vi quang học.

2.2.2. Phương pháp PCR

Phương pháp PCR bao gồm bước tách chiết DNA của virus và các bước thực hiện kỹ thuật PCR. DNA tổng số được tách chiết từ mẫu ruột và phân của các mèo mổ khám bằng Kit WizPrep™ Viral DNA/RNA Mini kit (Wizbiosolution, Hàn Quốc). Quy trình tách chiết DNA của virus theo hướng dẫn của nhà sản xuất sau đó được bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

Phản ứng PCR được thực hiện theo hướng dẫn của bộ kit. Cặp mồi được sử dụng gồm: FM (FM-F: 5' GCTTTAGATGATACTCATGT 3' và FM-R: 5' GTAGCTTCAGTAATATAGTC 3') (Mochizuki & cs., 1996), nhằm xác định một đoạn 698bp từ nt 3.113 đến 3.810. Chu trình phản ứng PCR bao gồm giai đoạn 94°C trong 2 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 55°C trong 2 phút, 72°C trong 2 phút) và 72°C trong 10 phút, cuối cùng là kết thúc ở 4°C. Sản phẩm được điện di trên thạch agarose 2% ở hiệu

điện thế 100V trong 30 phút. Quan sát và chụp ảnh kết quả điện di sản phẩm PCR trên máy chụp ảnh gel.

2.2.3. Phân lập virus

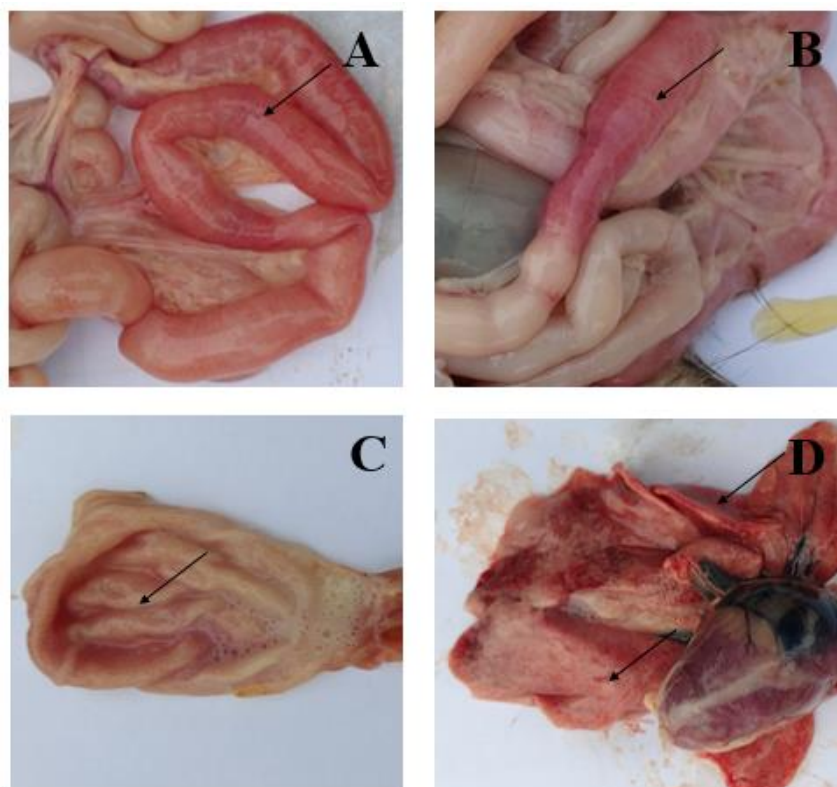
Môi trường DMEM có 5% FBS, 1% antibiotic - antimycotic được làm ấm trong tủ 37°C/30 phút trước khi lấy tế bào ra nuôi cấy. Tế bào CRFK bảo quản trong nitơ lỏng được giải đông nhanh chóng và chuyển sang ống ly tâm đã chứa sẵn 5ml môi trường DMEM. Ống tế bào được ly tâm ở 1.500 vòng trong 5 phút để loại bỏ hoàn toàn dung dịch bảo quản và giữ lại cặn tế bào. Cặn tế bào sau ly tâm được hòa tan trong 5ml môi trường đã chuẩn bị trước và chuyển vào bình T25, nuôi cấy trong điều kiện 37°C, 5% CO₂ và hàng ngày theo dõi sự phát triển của tế bào. Sau khi tế bào mọc và bao phủ 90% diện tích bề mặt đáy sẽ chia ra khay nuôi cấy 12 giếng để tiến hành gây nhiễm virus.

Khi tế bào CRFK mọc được một lớp trên bề

mặt nuôi cấy được gây nhiễm virus với mẫu bệnh phẩm được nghiền nhỏ, pha loãng trong môi trường DMEM và lọc qua màng lọc 0,22µm. Mẫu bệnh phẩm đã được xử lý ở trên được cho vào khay chứa tế bào CRFK, ủ ở 37°C trong 1 giờ, sau đó loại bỏ dịch gây nhiễm và rửa tế bào bằng dung dịch PBS 1X có bổ sung antibiotic - antimycotic. Cuối cùng, bổ sung môi trường nuôi cấy DMEM chứa 5% FBS và 1% antibiotic - antimycotic. Bệnh tích tế bào được quan sát hàng ngày bằng kính hiển vi soi ngược. Virus đạt yêu cầu thu hoạch khi bệnh tích tế bào chiếm khoảng 80-90% diện tích bề mặt nuôi cấy.

2.2.4. Xác định hiệu giá virus

Các chủng virus phân lập được pha loãng theo cơ số 10. Mỗi nồng độ virus pha loãng khác nhau sẽ gây nhiễm trên 8 giếng tế bào của đĩa 96 giếng. Bệnh tích tế bào được ghi chép lại và tính hiệu giá virus TCID₅₀ theo phương pháp Spearman và Karber (Karber, 1931; Spearman, 1908).



Ghi chú: A, B: Ruột sung huyết, xuất huyết rải rác hoặc từng đoạn ngắn; C: Dạ dày sung huyết chứa nhiều dịch; D: Phổi viêm nhẹ.

Hình 1. Bệnh tích đại thể của mèo mắc FPV

Bảng 1. Tổn thương vi thể của mèo mắc bệnh giảm bạch cầu

Cơ quan	Bệnh tích	Số quan sát (tiêu bản)	Số bệnh tích (tiêu bản)	Tỉ lệ (%)
Ruột	Xung huyết	24	24	100,0
	Niêm mạc xuất huyết	24	24	100,0
	Lông nhung ngắn	24	24	100,0
	Bong tróc các tế bào biểu mô	24	24	100,0
Hạch lympho	Teo các nang lympho	24	20	83,33
Dạ dày	Xung huyết	24	19	79,17
Lách	Tăng sinh vùng tủy trắng	24	15	62,50
Cơ quan khác	Phổi thâm nhiễm tế bào viêm	24	6	25,00
	Thận xuất huyết	24	4	16,67

2.2.5. Xác định đường cong sinh trưởng

Tế bào được chuẩn bị vào bình T25 (5×10^6 tế bào/bình) với liều gây nhiễm MOI = 0,001. Sau 1 giờ ủ trong điều kiện 37°C, 5% CO₂, dịch gây nhiễm virus được loại bỏ bằng dung dịch PBS 1X, bổ sung môi trường nuôi cấy DMEM, với 5% FBS và 1% antibiotic - abimycotic. Virus được thu tại các thời điểm khác nhau sau khi gây nhiễm theo thứ tự: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 và 44 giờ. Đường cong sinh trưởng của virus được xác định dựa vào giá trị hiệu giá log₁₀TCID₅₀/ml tại mỗi thời điểm thu virus.

2.2.6. Xử lý số liệu

Các số liệu tính toán hiệu giá virus được thực hiện bằng phần mềm Excel với hàm LOG10 được sử dụng để xác định giá trị ID₅₀ dựa trên lô-ga-rit cơ số 10 tại mỗi thời điểm thu virus. Giá trị TCID₅₀ được tính dựa theo phương pháp Spearman-Kärber với $10^{(-\log ID_{50} - \log(\text{liều gây nhiễm}))}$ (Kärber, 1931; Spearman, 1908). Đường cong sinh trưởng được dựng trong phần mềm Excel dựa trên các giá trị TCID₅₀ thu được.

chủ yếu ở ruột non và dạ dày như dạ dày sung huyết ở 6 mèo (75%). Ruột non sung huyết gặp ở 8 mèo (100%) (Hình 1A, B); xuất hiện các điểm loét trên niêm mạc ruột ở 6 mèo (75%) và xuất huyết ở 7 mèo (87,5%), chất chứa bên trong ruột có mùi tanh lẫn máu ở 7 mèo (87,5%). Dạ dày sung huyết ở 6 mèo (75%) (Hình 1C). Các hạch lympho ở màng treo ruột của 7 mèo sưng to (87,5%). Lách của 3 mèo (37,5%) có hiện tượng nhồi huyết. Ngoài ra một số cơ quan khác có biểu hiện nhẹ, không điển hình như phổi viêm ở 2 mèo (25%) (Hình 1D), túi mật sưng, thận xuất huyết điểm ở 1 mèo (12,5%). Hiện tượng teo tuyến ức gặp trên 1 mèo (chiếm 12,5%).

Theo Greene & Addie (2006), triệu chứng lâm sàng cũng như bệnh tích đại thể ở mèo nhiễm FPV tự nhiên thường ít và không điển hình. Theo Ichijo & cs. (1976), ủ rũ và mệt mỏi xuất hiện ở thời kỳ đầu của tất cả các mèo mắc FPV trước khi 85% số mèo bị tiêu chảy, 70% số mèo bị nôn mửa và 26% số mèo có biểu hiện mất nước trong tổng số 13 con mèo. Trong một nghiên cứu với hơn 200 mẫu, Kruse & cs. (2010) cho thấy triệu chứng lâm sàng của mèo nhiễm FPV rất đa dạng, từ nhẹ đến thể cấp tính. Mèo mắc bệnh do FPV thường chết do các biến chứng liên quan đến mất nước, mất cân bằng điện giải, hạ đường huyết, xuất huyết hoặc nhiễm khuẩn huyết và nội độc tố trong máu (Sykes, 2014). Ngoài ra, DNA của virus cũng được phát hiện trong cơ tim của một số mèo chết do bệnh lý tim cho thấy rằng còn có cơ chế tác động của FPV còn chưa được khẳng định (Meurs & cs., 2000). Bệnh tích đại thể của mèo nhiễm FPV chủ yếu tập trung ở hệ thống hạch lympho và ruột do

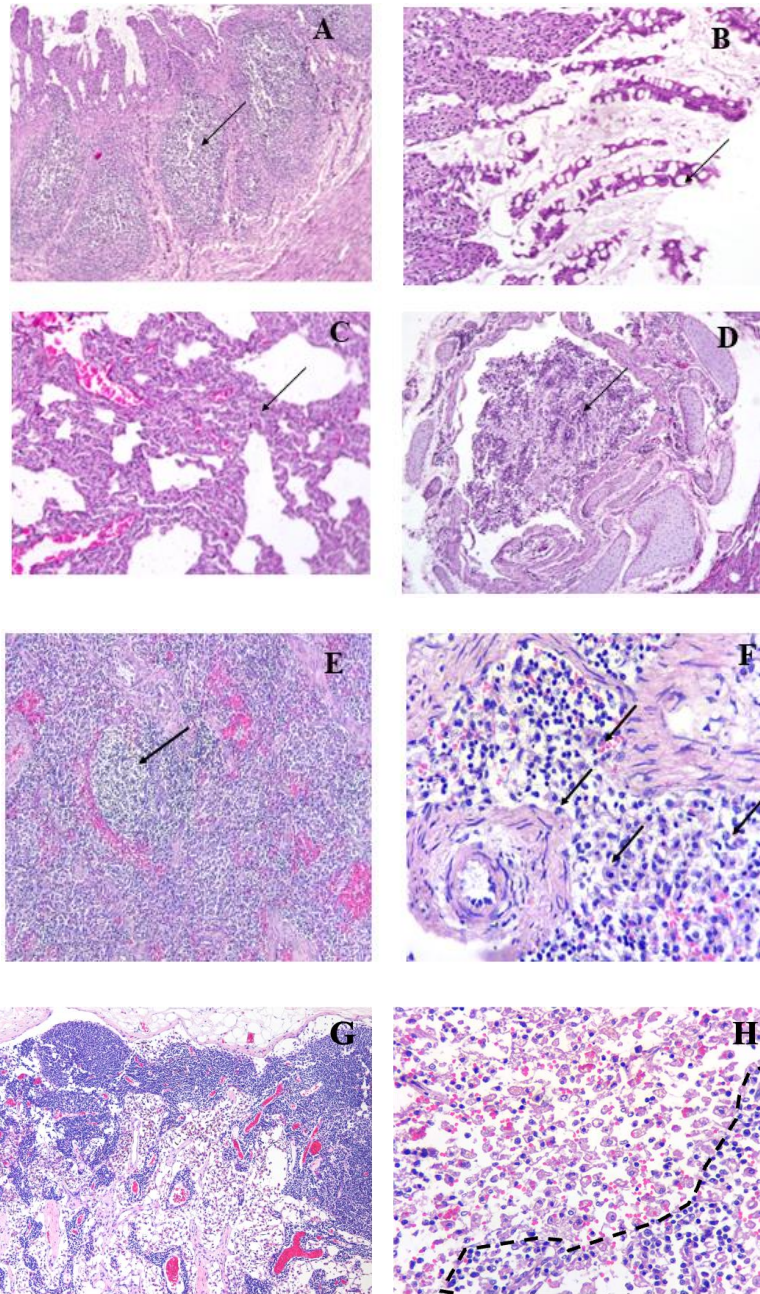
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Triệu chứng và bệnh tích của mèo mắc bệnh giảm bạch cầu

Kết quả nghiên cứu về triệu chứng lâm sàng chủ yếu của mèo mắc bệnh giảm bạch cầu cho thấy mèo bệnh ủ rũ, mệt mỏi, sốt, bỏ ăn, nôn, tiêu chảy và mất nước. Kết quả mổ khám 8 mèo bệnh cho thấy bệnh tích đại thể tập trung

virus có tính hướng đối với các mô lympho và biểu mô đường ruột (Barrs, 2019). Bệnh tích đại thể thường gặp như ruột giãn rộng, sung huyết, xuất huyết và hoại tử do viêm từng đoạn hoặc toàn bộ ruột (Barrs, 2019). Hệ thống các hạch mạc treo

thường sưng to, xuất huyết và phù nề (Csiza & cs., 1971). FPV gây tổn thương hệ thần kinh trung ương như não úng thủy, giảm sản tiểu não ở một số mèo con (Sharp & cs., 1999; Url & cs., 2003).



Ghi chú: A: Nang lympho thành ruột tăng sinh (X100); B: Tế bào biểu mô ruột thoái hóa (X400); C: Viêm phổi kẽ, vách phế nang dày (X200); D: Viêm phế quản, trong lòng phế quản chứa tế bào viêm (X100); E: Lách tăng sinh ở vùng tủy trắng với sự rộng ra của các nang lympho (X100); F: Số lượng tế bào lympho suy giảm rõ ở vùng tủy trắng và các tế bào tăng sinh chủ yếu là bạch cầu đơn nhân lớn và đại thực bào (X400); G: Các nang lympho ở hạch mạc treo ruột giảm số lượng và kích thước (X100); H: Số lượng tế bào lympho giảm rõ ở vùng vỏ các nang hạch mạc treo ruột (dưới đường đứt nét). Các bạch cầu đơn nhân lớn và đại thực bào tăng (trên đường đứt nét) (X400).

Hình 2. Biến đổi bệnh lý vi thể của mèo mắc FPV

3.2. Tổn thương vi thể ở một số cơ quan của mèo mắc bệnh giảm bạch cầu

Kết quả nghiên cứu bệnh tích vi thể ở mèo mắc bệnh giảm bạch cầu khá phù hợp với tổn thương đại thể khi các tổn thương do FPV trên mèo tập trung chủ yếu ở ruột non, hạch lympho và lách được tổng hợp ở bảng 1. Tại ruột non, các bệnh tích chủ yếu được ghi nhận ở tất cả các tiêu bản là tế bào biểu mô ruột bị thoái hóa, nang lympho của thành ruột tăng sinh; lông nhung ruột gãy nát, ngắn lại, sự bong tróc, đứt nát của các tế bào biểu mô niêm mạc ruột cùng với sự xuất huyết tại các mô ruột (Hình 2A, B). Lách tăng sinh ở vùng tủy trắng với sự rộng ra của các nang lympho, số lượng tế bào lympho suy giảm mạnh ở vùng tủy trắng và các tế bào tăng sinh chủ yếu là bạch cầu đơn nhân lớn và đại thực bào (Hình 2E, F). Bệnh tích của hạch lympho là cạn kiệt tế bào lympho (lymphoid depletion) đặc trưng với sự giảm số lượng và kích thước của các nang lympho cùng với xoang hạch lympho giãn rộng (Hình 2G). Khi quan sát ở độ phóng đại lớn hơn cho thấy số lượng tế bào lympho giảm rõ ở vùng vỏ các nang hạch màng treo ruột. Các bạch cầu đơn nhân lớn và đại thực bào tăng mạnh (Hình 2H). Kết quả cũng cho thấy mèo trong nghiên cứu bị viêm phổi kẽ. Tế bào viêm thâm nhiễm tại nhiều vị trí của phổi với vách phế nang sưng dày, trong lòng phế quản chứa các tế bào viêm (Hình 2C, D). Tổn thương thận cũng được phát hiện trong nghiên cứu này chủ yếu là xuất huyết và thâm nhiễm tế bào viêm (16,67%).

Theo Greene & Addie (2006), các bất thường về mô học trong ruột bao gồm các mô đệm giãn ra, với sự bong tróc của các tế bào biểu mô và các mảnh vụn hoại tử trong lòng ruột. Các lông nhung ngắn lại sau quá trình hoại tử của các tế bào crypt. Thể vùi (intranuclear inclusion) thường ít gặp ở tổn thương vi thể và thường gặp trên các mèo mắc bệnh thể cấp tính do FPV (Sykes, 2014). Trong một số trường hợp, tế bào biểu mô có thể bong ra hoàn toàn chỉ còn lại màng đáy. Tổn thương mô học nặng nhất được tìm thấy ở không tràng và hồi tràng, trong

khi tá tràng và kết tràng ít bị ảnh hưởng hơn (Sykes, 2014; Barrs, 2019). Tổn thương khu trú nổi bật nhất xung quanh các nang lympho ở lớp dưới niêm mạc của ruột non. Không có tế bào bạch cầu lympho trong tất cả các mô và sự suy giảm tế bào bạch huyết có trong các nang của các hạch bạch huyết, các mảng Peyer và lách (Barrs, 2019). Teo bạch huyết có kèm theo tăng sản thực bào đơn nhân.

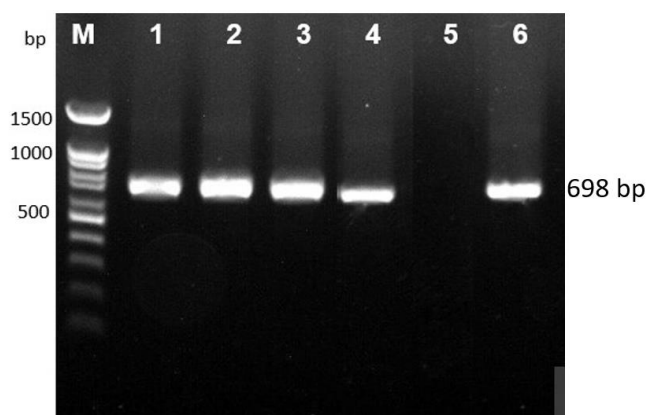
Theo nghiên cứu của Fei-Fei & cs. (2017) khi nghiên cứu gây nhiễm virus Feline panleukopenia cho chồn tại Trung Quốc cũng cho thấy các tổn thương mô học bao gồm giảm bạch cầu và hoại tử ở lách, giảm bạch cầu và tăng hồng cầu lưới ở các hạch bạch huyết ở mạc treo, vùng tổn thương của ruột và các tế bào viêm xâm nhập vào lớp đệm của niêm mạc ruột.

Viêm phổi cũng có thể gặp ở mèo mắc FPV do kể phát các vi khuẩn đường hô hấp khi hệ miễn dịch bị suy yếu (Sykes, 2014; Porporato & cs., 2018).

3.3. Kết quả phân lập Feline panleukopenia virus trên môi trường tế bào CRFK

Bằng kỹ thuật PCR, đã khẳng định chắc chắn sự có mặt của virus gây bệnh giảm bạch cầu mèo. Sau đó, các chủng virus được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm khác nhau của mèo mắc bệnh trên môi trường tế bào một lớp CRFK.

Kết quả phân lập FPV trên môi trường tế bào CRFK cho thấy, sau 8 giờ gây nhiễm, tất cả 5 chủng virus phân lập đều xuất hiện bệnh tích tế bào (CPE) (Bảng 2). Các tế bào gây nhiễm ở thể rounding - tế bào co tròn lại, tạo thành khoảng trống rộng tách ra và cuối cùng nổi lên trên bề mặt đáy sau khoảng 24-40 giờ gây nhiễm virus. Trong đó, VNUA-FPV02 có bệnh tích tế bào xuất hiện sớm nhất (sau 4 giờ). Kết quả quan sát bệnh tích tế bào sau khi gây nhiễm virus trong nghiên cứu này tương tự như bệnh tích tế bào sau khi gây nhiễm virus đã được mô tả gần đây (Leal & cs., 2020). Các chủng FPV phân lập đã được chẩn đoán xác nhận bằng phản ứng PCR và đều cho kết quả dương tính với virus FPV.



Chú thích: M: Marker; 1, 2, 3, 4: Các mẫu phân lập FPV; 5: Đối chứng âm, 6: Đối chứng dương.

Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR

Bảng 2. Kết quả phân lập FPV trên môi trường tế bào CRFK

Mèo	Bệnh phẩm	CPE	Tên virus phân lập
M1	Phân	+	VNUA-FPV01
M2	Ruột	+	VNUA-FPV02
M3	Phân	+	VNUA-FPV03
M4	Phân	+	VNUA-FPV04
M5	Ruột	+	VNUA-FPV05

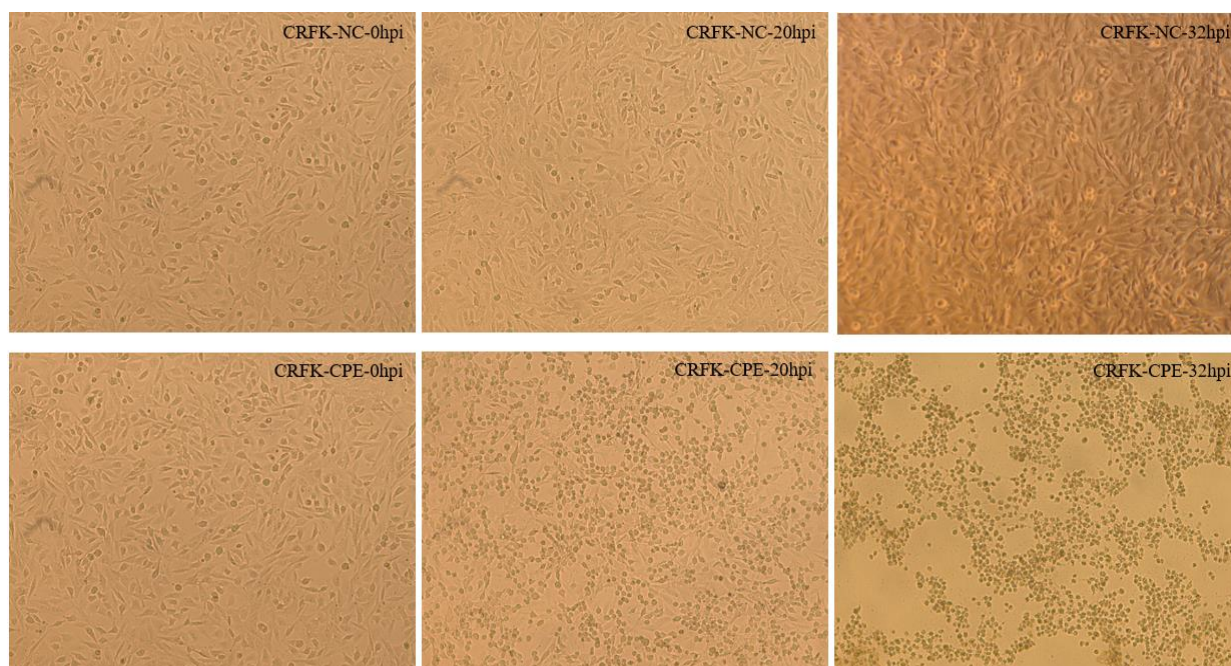
Bảng 3. Kết quả nghiên cứu khả năng gây bệnh tích tế bào

Chủng virus		Thời gian xuất hiện bệnh tích tế bào sau gây nhiễm (giờ)									
		4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
CPE (%)	VNUA-FPV01	*	15	30	35	45	60	85	95	100	
	VNUA-FPV02	5	20	30	45	65	90	100	B		
	VNUA-FPV03	-	10	20	35	60	75	85	95	100	B
	VNUA-FPV04	*	10	25	40	55	70	90	100	B	
	VNUA-FPV05	-	5	15	30	45	60	75	90	100	B

Ghi chú: (-): Chưa có bệnh tích tế bào (CPE - Cytopathologic Effects); (*): CPE dưới 5%; 5%: % số lượng tế bào bị phá hủy so với tổng diện tích bề mặt nuôi cấy; B: Tế bào bong tróc hoàn toàn khỏi bề mặt nuôi cấy; hpi: Hour post infection (giờ sau gây nhiễm virus).

Kết quả bảng 3 cho thấy, khoảng 10-15% tế bào bị phá hủy sau 8 giờ gây nhiễm với chủng virus VNUA-FPV01, sau 24 giờ, tỉ lệ này tăng trên 60-75%, sau 36 giờ là 90-100%. Tế bào bị phá hủy, bong tróc hoàn toàn và tách khỏi bề mặt chai nuôi cấy sau 36 giờ ở tất cả các chủng. Riêng với chủng VNUA-FPV02, khả năng và thời gian gây bệnh tích tế bào nhanh và ngắn hơn so với các chủng còn lại,

sau 4 giờ gây nhiễm đã có 5% số lượng tế bào bị phá hủy, tỉ lệ này tăng mạnh và đạt khoảng 65% sau 20 giờ gây nhiễm và sau 28 giờ tỉ lệ này đạt 100%. Quá trình phá hủy tế bào của chủng VNUA-FPV04 tương tự với VNUA-FPV01. Chủng VNUA-FPV03 và VNUA-FPV05 có quá trình phá hủy tế bào bắt đầu từ 8 giờ gây nhiễm và sau 36 giờ gây nhiễm tế bào bị phá hủy hoàn toàn.

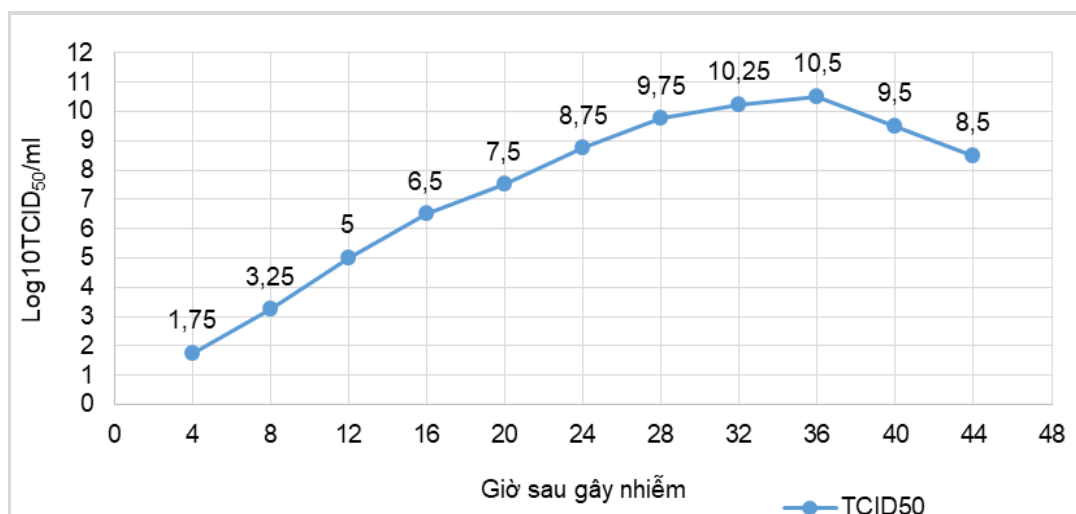


Ghi chú: NC: đối chứng tế bào thời điểm bắt đầu thí nghiệm (0 giờ), sau 20 giờ và sau 32 giờ gây nhiễm; CPE: bệnh tích tế bào thời điểm bắt đầu gây nhiễm, sau 20 giờ và sau 32 giờ gây nhiễm.

Hình 3. Chủng virus VNUA-FPV02 trên dòng tế bào CRFK

Bảng 4. Kết quả hiệu giá virus ở đời thứ 5

Chủng Virus	TCID ₅₀ /ml
VNUA-FPV01	$1,77 \times 10^9$
VNUA-FPV02	$3,16 \times 10^8$
VNUA-FPV03	$5,6 \times 10^8$
VNUA-FPV04	$1,77 \times 10^8$
VNUA-FPV05	$6,3 \times 10^8$



Hình 4. Đường cong sinh trưởng của chủng virus VNUA-FPV01 ở đời thứ 5

3.4. Hiệu giá virus

Để xác định hiệu giá của FPV, nghiên cứu tiến hành cấy truyền đồi virus đến đồi thứ 5 để virus ổn định, thích nghi với môi trường tế bào. Sau đó xác định hiệu giá virus của các chủng FPV phân lập ở đồi thứ 5, kết quả hiệu được trình bày ở bảng 4.

Kết quả nghiên cứu cho thấy tại đồi thứ 5, tất cả các chủng VNUA-FPV01, VNUA-FPV02, VNUA-FPV03, VNUA-FPV04 và VNUA-FPV05 đều có khả năng phát triển, nhân lên trên môi trường tế bào CRFK, hiệu giá của virus thu được dao động từ $1,77 \times 10^8$ - $1,77 \times 10^9$ TCID₅₀/ml.

3.5. Xác định đường cong sinh trưởng của chủng virus phân lập

Từ 5 chủng virus đã phân lập thành công, chủng virus VNUA-FPV01 có hiệu giá virus ($1,77 \times 10^9$ TCID₅₀/ml) đạt giá trị cao nhất ở đồi thứ 5 đã được lựa chọn để xác định đường cong sinh trưởng của virus trên tế bào CRFK. Virus gây nhiễm lên tế bào CRFK với liều MOI = 0,001. Dịch virus được thu theo các khoảng thời gian khác nhau để xác định hiệu giá virus nhân lên. Kết quả chuẩn độ FPV ở các thời điểm khác nhau cho thấy hiệu giá virus tăng dần theo thời gian và đạt giá trị cao nhất sau 36 giờ gây nhiễm. Kết quả ở biểu đồ 1 cho thấy sau 4 giờ gây nhiễm đạt giá trị $10^{1,75}$ TCID₅₀/ml và sau 36 giờ gây nhiễm đạt giá trị cao nhất $10^{10,5}$ TCID₅₀/ml. Theo hiệu giá virus ở các thời điểm gây nhiễm tiếp theo cho thấy hiệu giá virus có xu hướng giảm. Dựa vào đường cong sinh trưởng cho thấy, với liều gây nhiễm MOI = 0,001, hiệu giá virus đạt giá trị cao nhất sau 36 giờ gây nhiễm.

4. KẾT LUẬN

Mèo bị bệnh giảm bạch cầu do FPV có các triệu chứng nôn mửa, mất nước, tiêu chảy... Các bệnh tích đại thể ở dạ dày, ruột gồm sung huyết, niêm mạc xuất huyết, chất chứa trong lòng ruột có mùi tanh máu. Bệnh tích vi thể rõ nhất ở ruột với nang lympho thành ruột tăng sinh, thoái hóa tế bào biểu mô, lông nhung đứt gãy. Bệnh tích

của hạch lympho cho thấy số lượng bạch cầu lympho giảm mạnh ở vùng vỏ các nang hạch màng treo ruột; bạch cầu đơn nhân lớn và đại thực bào tăng mạnh. Các bệnh tích khác quan sát được gồm viêm kê phổi, viêm phế quản phổi và tăng sinh các vùng tủy trắng trong mô lách.

Năm chủng virus gây giảm bạch cầu mèo được phân lập với hiệu giá virus sau 5 lần truyền đồi trên môi trường tế bào CRFK giao động từ $1,77 \times 10^8$ đến $1,77 \times 10^9$ TCID₅₀/ml; virus đạt hiệu giá cao nhất sau 36 giờ gây nhiễm và giảm dần sau 40 giờ gây nhiễm. Thời gian thích hợp để thu virus đạt hiệu giá cao nhất là sau 36 giờ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barrs V.R. (2019). Feline Panleukopenia: A Re-emergent Disease. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*. 49(4): 651-670.
- Bennet M. & Gaskell R. (1996). *Feline and Canine Infectious Diseases*. In: Berlin, Germany: Blackwell Wissenschafts-verlag.
- Bentinck-Smith J. (1949). Feline panleukopenia (feline infectious enteritis) - a review of 574 cases. *North Am Vet*. 30: 379-384.
- Cave T., Thompson H., Reid S., Hodgson D. & Addie D. (2002). Kitten mortality in the United Kingdom: a retrospective analysis of 274 histopathological examinations (1986 to 2000). *Veterinary Record*. 151(17): 497-501.
- Csiza C.K., De Lahunta A., Scott F.W. & Gillespie J.H. (1971). Pathogenesis of Feline Panleukopenia Virus in Susceptible Newborn Kittens II. Pathology and Immunofluorescence. *Infection and immunity*. 3(6): 838-846.
- Fei-Fei D., Yong-Feng Z., Jian-Li W., Xue-Hua W., Kai C., Chuan-Yi L., Shou-Yu G., Jiang S. & Zhi-Jing X. (2017). Molecular characterization of feline panleukopenia virus isolated from mink and its pathogenesis in mink. *Veterinary Microbiology*. 205: 92-98.
- Goto H. (1974). Feline panleukopenia in Japan. I. Isolation and characterization of the virus.
- Greene C. (2006). Canine brucellosis. *Infectious diseases of the dog and cat*. pp. 369-381.
- Greene C. & Addie D. (1998). Feline panleukopenia. *Infectious diseases of the dog and cat*. pp. 52-58.
- Ichijo S., Osame S., Konishi T. & Goto H. (1976). Clinical and hematological findings and myelograms on feline panleukopenia. *The Japanese journal of veterinary science*. 38(03): 197-205.

- Kärber G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Archiv f experiment Pathol u Pharmacol. 162: 480-483.
- Konishi S. (1975). Studies on feline panleukopenia. I. Isolation and properties of virus strains.
- Kruse B.D., Unterer S., Horlacher K., Sauter-Louis C. & Hartmann K. (2010). Prognostic factors in cats with feline panleukopenia. Journal of veterinary internal medicine. 24(6): 1271-1276.
- Leal É., Liang R., Liu Q., Villanova F., Shi L., Liang L., Li J., Witkin S. S. & Cui S. (2020). Regional adaptations and parallel mutations in Feline panleukopenia virus strains from China revealed by nearly-full length genome analysis. PloS one. 15(1): e0227705.
- Meurs K.M., Fox P.R., Magnon A.L., Liu S. & Towbin J.A. (2000). Molecular screening by polymerase chain reaction detects panleukopenia virus DNA in formalin-fixed hearts from cats with idiopathic cardiomyopathy and myocarditis. Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology. 9(2): 119-126.
- Mochizuki M., Horiuchi M., Hiragi H., San Gabriel M. C., Yasuda N. & Uno T. (1996). Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia. Journal of Clinical Microbiology. 34(9): 2101-2105.
- Parrish C.R. (1995). 3 Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. Bailliere's clinical haematology. 8(1): 57-71.
- Pedersen N.C. (2009). A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. Journal of feline medicine and surgery. 11(4): 225-258.
- Porporato F., Horzinek M.C., Hofmann-Lehmann R., Ferri F., Gerardi G., Contiero B., Vezzosi T., Rocchi P., Auriemma E., Lutz H. & Zini E. (2018). Survival estimates and outcome predictors for shelter cats with feline panleukopenia virus infection. Journal of the American Veterinary Medical Association. 253(2): 188-195.
- Sharp N.J., Davis B.J., Guy J.S., Cullen J.M., Steingold S.F. & Kornegay J.N. (1999). Hydranencephaly and cerebellar hypoplasia in two kittens attributed to intrauterine parvovirus infection. Journal of comparative pathology. 121(1): 39-53.
- Sykes J.E. (2014). Feline Panleukopenia Virus Infection and Other Viral Enteritides. Canine and Feline Infectious Diseases. pp. 187-194.
- Spearman C. (1908). The Method of "Right and Wrong Cases" (Constant Stimuli) without Gauss's Formula. Br J Psychol. 2: 227-242.
- Truyen U., Addie D., Belák S., Boucraut-Baralon C., Egberink H., Frymus T. & Lloret A. (2009). Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management. Journal of Feline Medicine & Surgery. 11(7): 538-546.
- Url A., Truyen U., Rebel-Bauder B., Weissenböck H., & Schmidt P. (2003). Evidence of parvovirus replication in cerebral neurons of cats. Journal of clinical microbiology. 41(8) : 3801-3805.
- Verge J., & Christoforoni N. (1928). La gastroenterite infectieuse des chats; est-elle due à un virus filtrable. CR Seances Soc Biol Fil. 99: 312.
- Yang S., Wang S., Feng H., Zeng L., Xia Z., Zhang R. & Xia X. (2010). Isolation and characterization of feline panleukopenia virus from a diarrheic monkey. Veterinary microbiology. 143(2-4): 155-159.