

PHÁT HIỆN VIRUT GÂY BỆNH TIÊU CHẢY CẤP (PEDV) TRÊN HEO Ở CÁC TỈNH MIỀN ĐÔNG NAM BỘ

*Nguyễn Tất Toàn, Nguyễn Đình Quát, Trịnh Thị Thanh Huyền, Đỗ Tiến Duy,
Trần Thị Dân, Nguyễn Thị Phước Ninh, Nguyễn Thị Thu Năm
Đại học Nông Lâm TPHCM*

TÓM TẮT

Dịch tiêu chảy cấp xảy ra trên heo mọi lứa tuổi, lần đầu tiên được xác định là do porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) tại Việt Nam. Bệnh lan rộng nhanh chóng ở các tỉnh miền Đông Nam bộ, gây ảnh hưởng lớn đến kinh tế chăn nuôi heo do làm tăng tỷ lệ bệnh, tỷ lệ chết cao đặc biệt trên heo con theo mẹ từ 50 – 100%. Bước đầu đã xây dựng kỹ thuật nested RT-PCR để chẩn đoán phân biệt virus gây viêm dạ dày ruột truyền nhiễm (TGEV) và dịch tiêu chảy cấp trên heo (PEDV) trong các ổ dịch năm 2008-2010. Trong 284 mẫu ruột và phân được thu thập từ heo con có biểu hiện bệnh đặc trưng của dịch tiêu chảy, kết quả đã cho thấy 41,90% số mẫu dương tính với PEDV. Không phát hiện được mẫu dương tính với TGEV. Kết quả chẩn đoán cho thấy tỉ lệ mẫu dương tính với PEDV ở ruột (58,14%) cao hơn mẫu phân (16,96%).

Từ khóa: Heo, PEDV, TGEV, nested RT-PCR, Tỷ lệ nhiễm, Miền Đông Nam Bộ

Detection and identification of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) isolates from Southern-Eastern provinces of Vietnam

*Nguyễn Tất Toàn, Nguyễn Đình Quát, Trịnh Thị Thanh Huyền, Đỗ Tiến Duy,
Trần Thị Dân, Nguyễn Thị Phước Ninh, Nguyễn Thị Thu Năm*

SUMMARY

Acute diarrhea occurred in pigs of all ages and was first identified as the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Vietnam. The disease spread rapidly in the Southern-Eastern provinces and was a major influence on the economy losses in swine production caused by high morbidity and mortality particularly on the piglet from 50 to 100%. Initially, the nested RT-PCR technique was developed for differential diagnosis of viral causes of transmissible gastroenteritis and porcine epidemic diarrhea in pigs at the outbreak during 2008-2010. 284 samples were collected from pigs manifested the typical characteristics of acute diarrhea. The causative agent of acute diarrhea in pigs in different localities was identified as PEDV (41.9%). No detection of any positive cases with TGEV was recorded in the samples of acute diarrhea outbreaks. The results showed that the rate of positive samples for PEDV in the intestine (58.14%) was higher than in the feces (16.96%).

Keywords: Piglets, PEDV, TGEV, nested RT-PCR, Infected rate, Southern-Eastern Vietnam

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dịch tiêu chảy cấp trên heo (PED: porcine epidemic diarrhea) và bệnh viêm dạ dày ruột truyền nhiễm (TGE: transmissible gastroenteritis) là những bệnh truyền nhiễm lây lan rất nhanh, gây thiệt hại lớn với đặc điểm gây ói mửa và tiêu chảy trên heo ở mọi lứa tuổi, tỷ lệ bệnh và tỷ lệ chết cao (có thể lên đến 100%) ở heo con dưới hai tuần tuổi (Sestak và Saif, 2002; Pensaert và Yeo, 2006). Các virus này thuộc chi *Coronavirus*, một virus rất quan trọng trong thú y, gây nhiều dịch bệnh nghiêm trọng trên nhiều loài động vật (Murphy và ctv, 1999; Weber và Schmidt, 2005; Weiss và Navas-Martin, 2005). PED do porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) gây ra, được Wood phát hiện đầu tiên ở Anh quốc vào năm 1971, lúc đầu chỉ xảy ra trên heo cai sữa (phân loại là PED-type I). Năm 1976, PED được quan sát trên heo mọi lứa tuổi đặc biệt ảnh hưởng

nặng nề trên heo con theo mẹ (phân loại là PED-type II). PED khó phân biệt với TGE qua triệu chứng lâm sàng và bệnh học (Sestak và ctv, 2002; Pensaert và Yeo, 2006). Khi bệnh này bùng phát, những nhà chuyên môn mô tả bệnh giống như viêm dạ dày ruột truyền nhiễm (TGE-like). Tuy nhiên, căn bệnh PEDV được xác định là một *Coronavirus* khác với virus TGE. PED-type I và PED-type II cũng được chứng minh đều do cùng một virus gây ra vào năm 1982 (Pensaert và Yeo, 2006). PED đã gây thiệt hại nghiêm trọng trong chăn nuôi heo ở nhiều quốc gia Châu Âu và sau đó đến các nước ở Châu Á như Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Thái Lan và hiện tại đã đến Việt Nam trong những năm gần đây (Hwang và ctv, 1994; Pensaert và Yeo, 2006; Park và ctv, 2007; Puranaveja và ctv, 2009; Chen và ctv, 2010; Duy và ctv, 2011).

Cuối năm 2008, dịch bệnh tiêu chảy cấp tính trên heo mọi lứa tuổi xảy ra đầu tiên ở Đồng Nai, sau đó, bệnh lây lan rộng rãi khắp địa bàn tỉnh này cũng như nhiều tỉnh thành khác. Bệnh gây thiệt hại nặng nề trên đàn heo của các tỉnh Miền Đông Nam Bộ với tỷ lệ bệnh ở các lứa tuổi có thể đến 100%, tỷ lệ chết khác nhau giữa các lứa tuổi đặc biệt cao ở hạng heo con theo mẹ từ 50 – 100% (chưa công bố). Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là xác định chính xác sự hiện diện của căn nguyên gây ra dịch bệnh tiêu chảy cấp trên đàn heo ở Miền Đông Nam Bộ.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Thu thập mẫu

Mẫu được thu thập trên thực địa từ những heo có biểu hiện lâm sàng tiêu chảy cấp tại các trại chăn nuôi ở các địa phương thuộc Miền Đông Nam Bộ (bảng 1). Tổng cộng 172 mẫu ruột thu thập từ heo con 3-15 ngày tuổi, có triệu chứng tiêu chảy nghi ngờ do *Coronavirus*, bằng phương pháp mổ khám thường quy. Mẫu được lấy ở 3 đoạn của ruột non gồm tá tràng, không tràng và hồi tràng (mỗi đoạn 1 cm). Ngoài ra, 112 mẫu phân được lấy trên các hạng heo trưởng thành bị tiêu chảy bằng cách hứng khoảng 20 ml (khoảng 20 gram) phân bằng bọc ni lông vô trùng. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong điều kiện tiến hành ngay và dự trữ -20°C khi tiến hành vào các ngày sau đó.

Bảng 1. Nguồn gốc và số lượng mẫu thu thập

Nguồn gốc mẫu		Số lượng mẫu	Số lượng mẫu ruột	Số lượng mẫu phân
Đồng Nai	Ruột	73	172	112
	Phân	88		
Tp. HCM	Ruột	54		
	Phân	-		
Binh Dương	Ruột	29		
	Phân	-		
Bà Rịa-VT	Ruột	16		
	Phân	24		
Tổng		284		

2.2 Ly trích mẫu

Mẫu được đồng hóa (nghiền ruột bằng cối vô trùng hoặc khuấy đều phân) và pha loãng với dung dịch đệm PBS thành huyền dịch 10%. Tiếp đó, ly tâm lạnh huyền dịch ở 3000 vòng/phút, 4°C, trong 5-10 phút. Lấy 1ml dung dịch bên trên ống ly tâm cho vào ống nhựa vô trùng và sẵn sàng cho ly trích RNA theo hướng dẫn cụ thể của bộ kit Total RNA Isolation (Promega, Madison, Mỹ). Các bước ly trích mẫu, thực hiện kỹ thuật RT-PCR được thực hiện tại

phòng thí nghiệm Bộ môn Nội Dược, Khoa Chăn nuôi Thú y và Viện công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Tp.HCM.

2.3 Nested RT-PCR

Hai cặp đoạn mồi (primers) được thiết kế cho bắt cặp đặc hiệu với virus PED và TGE qua kỹ thuật RT-PCR (bảng 2). Trong đó, PED-R1 và PED-F1 được thiết kế theo nghiên cứu của Song và ctv (2006). TGE-R1, TGE-F1 được thiết kế dựa vào nghiên cứu của Kim và ctv (2001). Sau đó, các cặp primers thiết kế thêm là PED-R2, PED-F2 và TGE-R2, TGE-F2 cho nested-PCR theo phần mềm từ <http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/Default.aspx>.

Bảng 2. Tên và trình tự các đoạn mồi

Tên	Trình tự mồi	Kích thước sản phẩm
PED-R1	CATATGCAGCCTGCTCTGAA	651 bp, gien S
PED-F1	TTCTGAGTCACGAACAGCCA	
PED-R2	ACTACCGAACGCAGGGTAACCAAA	256 bp, gien S
PED-F2	TGCCAATCTCGTTGCATCTGACAC	
TGE-R1	CTTCTTCAAAGCTAGGGACTG	1006 bp, gien S
TGE-F1	GGGTAAGTTGCTCATTAGAAATAATGG	
TGE-R2	GGCTGTTTGGTAACATAATTACCA	874 bp, gien S
TGE-F2	TTGTGGTTTGGTTGTAATGCC	

Quy trình nested RT-PCR được thực hiện trong hai bước để phát hiện PED. Tuy nhiên, quy trình RT-PCR để phát hiện TGEV không được trình bày ở đây do không phát hiện mẫu dương tính trong nghiên cứu này. **Bước 1:** Thực hiện RT-PCR cho đoạn ngoài của PEDV theo bộ kit AccessQuick™ RT-PCR System (Promega, Mỹ). Dung tích hỗn hợp phản ứng là 20 µl, gồm 2 µl RNA mẫu đã ly trích, 2 µl PED-R1, 2 µl PED-F1, 10 µl AccessQuick™ Master Mix 2X, 0.4 µl AMV Reverse Transcriptase và cho thêm 3,6 µl Nuclease-Free Water. Hỗn hợp này được trộn đều và chạy trên máy luân nhiệt để khuếch đại đoạn gien đích. Chương trình chạy như sau, 55°C trong 45 phút, 95°C trong 5 phút, 94°C trong 1 phút, 60°C trong 1 phút 30 giây, 72°C trong 2 phút 30 giây, lặp lại bước 3 đến bước 5 trong 30 chu kỳ. Sau đó, 72°C trong 10 phút và giữ mẫu ở 4°C. **Bước 2:** Sau khi thực hiện phản ứng RT-PCR, sản phẩm được thực hiện phản ứng nested-PCR cho đoạn nucleid bên trong, theo bộ kit Green God Taq Master® PCR. Dung tích hỗn hợp phản ứng là 20 µl, gồm 2 µl DNA sản phẩm RT-PCR, 0.5 µl PED-R2, 0.5 µl PED-F2, 10 µl Green God Taq Master Mix 2X, và 7 µl Nuclease-Free Water. Hỗn hợp được trộn đều và chạy trên máy luân nhiệt với quy trình như sau: 95°C trong 2 phút, 95°C trong 30 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 45 giây, lặp lại bước 2 đến bước 4 trong 30 chu kỳ; sau đó, 72°C trong 10 phút và giữ mẫu ở 4°C. Sau khi thực hiện phản ứng nested-PCR xong, sản phẩm được chuyển qua điện di trên gel agarose khi đã nhuộm với ethidium bromide trong khoảng 20 phút, và được đọc kết quả bằng máy đọc gel với kích thước sản phẩm 256 bp (sản phẩm cuối cùng).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Xác định PEDV trong dịch tiêu chảy cấp trên heo

Dịch tiêu chảy cấp rất khó phân biệt nguyên nhân do TGEV hay PEDV nếu chỉ dựa vào triệu chứng lâm sàng và bệnh tích do biểu hiện giữa các bệnh này gần giống nhau (Sestak và Saif, 2002; Pensaert và Yeo, 2006). Do vậy, để xác định chính xác sự hiện diện của virus nào trong dịch tiêu chảy cấp đã làm giảm số lượng đàn heo đáng kể ở các tỉnh Miền Đông Nam Bộ,

kỹ thuật nested-RT-PCR đã được thiết lập trong phòng thí nghiệm sinh học phân tử để chẩn đoán phân biệt nguyên nhân gây bệnh (bảng 3).



Hình 1. Heo con mới sinh bị tiêu chảy, mất nước nặng và chết nhanh trong các ổ dịch tiêu chảy cấp. Biểu hiện thường gặp heo con nằm trên bụng mẹ để giữ ấm cơ thể.

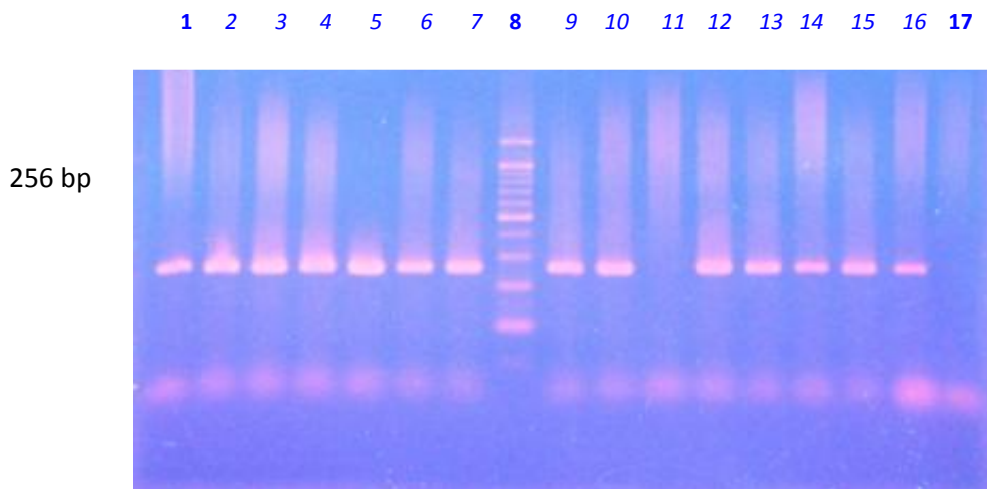
Bảng 3. Kết quả chẩn đoán mẫu bằng kỹ thuật nested RT-PCR

Nguồn gốc mẫu		Số lượng mẫu xét nghiệm	Dương tính PEDV		Dương tính TGEV
			Số mẫu +	Tỷ lệ (%)	Số mẫu +
Đồng Nai	Ruột	73	21	34,76	0
	Phân	88	19	21,59	0
Tp. HCM	Ruột	54	48	88,89	0
	Phân	-	-	-	-
Binh Dương	Ruột	29	21	72,41	0
	Phân	-	-	-	-
Bà Rịa-VT	Ruột	16	10	62,5	0
	Phân	24	0	0	0
Tổng		284	119	41,90	0

Kết quả cho thấy tỷ lệ mẫu dương tính khá cao (41,90%) với virus PED. Trong khi đó, không phát hiện được mẫu dương tính với virus gây bệnh viêm dạ dày ruột truyền nhiễm. Tỷ lệ phát hiện PEDV dương tính của các mẫu ruột non là 58,14% (100/172) cao hơn nhiều so với các mẫu phân 16,96% (19/112). Kết quả bước đầu này cho thấy chẩn đoán PEDV bằng nested RT-PCR trên mẫu ruột non cho kết quả tốt hơn mẫu phân.

PEDV được xác định ở 4 địa phương gồm Đồng Nai, Tp.HCM, Bình Dương và Bà Rịa – Vũng Tàu thuộc vùng Đông Nam Bộ. Tuy nhiên, tỷ lệ phát hiện virút PED từ mẫu ruột bằng nested RT-PCR là rất khác nhau, thấp nhất ở Đồng Nai (34,76%), Bà Rịa-Vũng Tàu (62,5%), Bình Dương (72,41%), và cao nhất ở Tp. HCM (88,89%) mặc dù mẫu được thu thập từ những trại có dịch đặc trưng với tiêu chảy cấp do *Coronavirus*. Điều này có thể do số mẫu khảo sát ở các địa phương chưa đồng đều nhau và cũng có thể diễn tiến bệnh ở mỗi nơi khác nhau. Nguồn mẫu thu thập chủ yếu là qua thông tin từ thú y viên và tại Bệnh viện thú y (trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM) cung cấp. Do vậy, số lượng mẫu thay đổi và cũng chưa thể đại diện hết cho các địa phương khảo sát. Kết quả bước đầu cho thấy PEDV hiện diện khá phổ biến ở các địa phương. Từ kết quả này, các nghiên cứu tiếp theo như tỷ lệ bệnh cũng như tình hình dịch tễ bệnh xảy ra tại các địa phương cũng được khảo sát.

Cùng với nghiên cứu của Duy D.T và ctv (2011), dịch bệnh tiêu chảy cấp trên heo xảy ra ở mọi lứa tuổi vào cuối 2008/2009, có thể khẳng định nguyên nhân gây ra là do PEDV, một căn nguyên lần đầu tiên được xác định tại Việt Nam. Những biểu hiện lâm sàng và bệnh tích được cho rằng là bệnh viêm dạ dày ruột truyền nhiễm (TGE) đã xảy ra tại Việt Nam trong nhiều năm trước đây. Tuy nhiên, kết quả chẩn đoán của 284 mẫu bệnh phẩm với TGEV là hoàn toàn âm tính.



Hình 2. Kết quả PCR trên mẫu ruột đối với PEDV. Giếng 8, lader 1500bp (Promega-Mỹ); giếng 1, đối chứng dương mẫu; giếng 17, đối chứng âm; giếng 2-16, các mẫu xét nghiệm và gửi giải trình tự)

Các chủng virút PED thu thập từ các ổ dịch trong nghiên cứu này tiếp tục nghiên cứu và so sánh với các chủng Trung Quốc (JS-2004-2), Thái Lan (07np01, Ku01cb08) và Hàn Quốc cũng như các chủng virút PED ở châu Âu để tìm thấy mối quan hệ quan trọng về dịch tễ học giữa các chủng (chưa công bố).

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Lần đầu tiên ở Việt Nam, PEDV được xác định bằng kỹ thuật nested RT-PCR là nguyên nhân gây bệnh tiêu chảy cấp trên các đàn heo ở các tỉnh Miền Đông Nam Bộ năm 2008-2010. Từ kết quả này, cần có nghiên cứu sâu hơn về nguồn gốc phát sinh, con đường lây lan và mối liên hệ dịch tễ phân tử của virút giữa các nước qua phân tích đặc trưng kiểu gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen, J., Wang, C., Shi, H., Qiu, H., Liu, S., Chen, X., Zhang, Z., and Fen, L. 2010. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China. *Arch Virol.* 155(9): 1471-1476.
2. Duy, D.T., Toan, N.T., Puranaveja, S., Thanawongnuwech, R. 2011. Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates from southern Vietnam during 2009- 2010 outbreaks. *Thai J Vet Med.* 41(2): 55-64.
3. Hwang, E. K., Kim, J. H., Jean, Y. H. and Bae, Y. C. 1994. Current occurrence of porcine epidemic diarrhoea in Korea. *RDA J Agric Sci.* 36: 587-596.
4. 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. *J Vet Diagnos Invest.* 13: 516-520.
5. Park, S.J., Moon, H.J., Yang, J.S., Lee, C.S., Song, D.S., Kang, B.K. and Park, B.K. 2007. Sequence analysis of the partial spike glycoprotein gene of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Genes.* 35(2): 321–332.
6. Pensaert, M.B. and Yeo, S.G. 2006. Porcine epidemic diarrhea. In: Diseases of swine. 9th ed. B.E. Straw., J.J. Zimmerman., S. D’Allaire. and D.J. Taylor (eds.). Oxford: Wiley-Blackwell. 367–372.
7. Puranaveja, S., Poolperm, P., Lertwatcharasarakul, P., Kesdaengsakonwut, S., Boonsoongnern, A., Urairong, K., Kitikoon, P., Choojai, P., Kedkovid, R., Teankum, K. and Thanawongnuwech, R. 2009. Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhea virus, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 15(7): 1112-1115.
8. Song D. S., Kang B. K., Oh J. S., Ha G. W., Yang J. S., Moon H. J., Jang Y.S., Park B. K., 2006. Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A Rotavirus. *J Vet Diagnos Invest.* 18: 278-281.

Nhận 24-5-12