

XÁC ĐỊNH SỰ LÂY TRUYỀN DỤC CỦA VIRUT GÂY BỆNH DỊCH TẢ VỊT TỪ ĐÀN VỊT SINH SẢN SANG VỊT CON BẰNG KỸ THUẬT PCR VÀ RT-PCR

Trần Ngọc Bích¹ và Jean-Luc GUERIN²

TÓM TẮT

Để xác định sự lây truyền dọc của virus gây bệnh dịch tả vịt (DTV) từ đàn vịt sinh sản mắc bệnh sang đàn vịt con của chúng, chúng tôi đã sử dụng phương pháp xét nghiệm sinh học phân tử PCR và RT-PCR. Kết quả nghiên cứu đã khẳng định có sự truyền dọc của DEV từ đàn vịt sinh sản mắc bệnh dịch tả vịt sang con của chúng. Kết quả này đã được kiểm chứng qua triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đặc trưng và xét nghiệm bằng kỹ thuật PCR (Hansen, 2000). 148 mẫu vịt con một ngày tuổi và trứng chết phôi thu thập từ trại sản xuất giống vịt Bắc Kinh mắc bệnh DTV đã được xét nghiệm bằng kỹ thuật PCR. Kết quả xét nghiệm cho thấy tỷ lệ nhiễm DEV biến động từ 0 đến 4,6% bằng PCR và từ 79 đến 97,3% bằng RT-PCR với chất đánh dấu - SYBR Green Master Mix (Applied Bio Systems).

Từ khóa: Vịt, Virus dịch tả vịt, Lây truyền, PCR, RT-PCR

DETERMINATION OF THE VERTICAL TRANSMISSION OF DUCK ENTERITIS VIRUS FROM DUCK BREEDERS TO DUCKLINGS BY USING PCR AND RT-PCR TECHNIQUES.

Tran Ngoc Bich and Jean-Luc GUERIN

SUMMARY

To confirm the vertical transmission of Duck Enteritis Virus (DEV) from duck breeders to their ducklings, we have used methods of molecular biology tests (PCR and RT-PCR). The result of investigation was confirmed to have the vertical transmission of DEV from infected duck breeders to their ducklings. This result was verified through clinical symptoms, disease characteristics and PCR tests (Hansen, 2000). 148 samples of one day old ducklings and dead embryos collecting from DEV infected Peking duck reproduction farm were tested by PCR techniques. Testing results indicated that DEV infected ratio varied from 0 to 4.6 % by classical PCR technique, and from 79 to 97.3% by PCR-RT technique, with marking substance - SYBR Green Master Mix (Applied Bio Systems).

Key words: Duck, DEV, Transmission, PCR, RT-PCR

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dịch tả vịt (Duck virus enteritis, Duck plague) là bệnh truyền nhiễm lây lan rất mạnh và gây chết cho loài thủy cầm (vịt, ngan, ngỗng và một số loài thủy cầm hoang dã khác), tỷ lệ chết có thể lên đến 100%.

Virus DTV thuộc loài *Herpesvirus* hoặc *Anatid Herpesvirus 1*, giống *herpesvirus* phụ họ *Alpha Herpesvirinae*, họ *Herpesviridae* (OIE, Terrestrial Manual 2010). Virus có cấu tạo kháng nguyên đồng nhất nhưng có rất nhiều chủng độc lực khác nhau (Hess et Dardiri, 1968).

Bệnh DTV thường truyền lây do tiếp xúc trực tiếp giữa đàn vịt bệnh và vịt khỏe, hoặc có thể do tiếp xúc gián tiếp qua môi trường có mầm bệnh như các nguồn nước, người chăn nuôi, dụng cụ chăn nuôi,... Sự truyền dọc của virus DTV từ đàn vịt giống sinh sản mắc bệnh DTV đến vịt con luôn là chủ đề gây tranh cãi (Burgess *et al.*, 1981).

Hiện nay, phương pháp chẩn đoán bằng kỹ thuật sinh học phân tử (PCR) đã được nhiều

-
1. Khoa Nông nghiệp và sinh học ứng dụng-Đại học Cần Thơ
 2. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse (France)

nhóm nghiên cứu quốc tế và Việt Nam sử dụng trong chẩn đoán bệnh DTV trên thực địa từ bệnh phẩm nội tạng và phân của thủy cầm nghi mắc bệnh DTV (Pritchard L.I *et al.*, 1999 ; Samia Shawky *et al.*, 2002, Kim Van Phuc *et al.*, 2004 ; Han Xian-jie *et al.*, 2006 ; Trần Đình Từ *et al.*, 2004...) Tuy nhiên chưa có một nghiên cứu chính thức nào về sự truyền dọc của virus DTV từ đàn vịt giống sinh sản mắc bệnh DTV đến vịt con.

II. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nội dung nghiên cứu

Khảo sát sự truyền dọc của virus gây bệnh DTV từ đàn vịt giống sinh sản mắc bệnh sang con bằng cách sử dụng phương pháp xét nghiệm PCR và RT-PCR.

2.2 Vật liệu

- Mẫu phân của đàn vịt giống sinh sản Bắc Kinh nghi mắc bệnh do virus DTV.
- 51 trứng vịt ấp ở ngày thứ 28 và 30 trứng ấp bị chết phôi được lấy cùng lô từ đàn vịt giống Bắc Kinh đã được xét nghiệm xác định mắc bệnh DTV trước đó bằng phương pháp PCR, được mang về phòng thí nghiệm của trường Thú y Quốc gia Toulouse – Cộng hòa Pháp để tiến hành xét nghiệm.
- 110 mẫu bệnh phẩm (phân, gan và lách) thu được từ 51 vịt con 1 ngày tuổi nở ra từ 51 trứng và 38 mẫu bệnh phẩm (phân-nước trứng và gan) của 30 trứng chết phôi (thai). Tổng số 148 mẫu bệnh phẩm được trình bày trong bảng 1.
- Kit *High Pure PCR template Preparation kit* (Roche, Germany).
- Taq DNA Polymerase recombinante (Invitrogen) được sử dụng trong phản ứng PCR, với cặp mồi DEV F – DEV R đã Hansen *et al.*, (2000) sử dụng.
- Hoá chất đánh dấu là SYBR® Green Master Mix (Applied Bio Systems) được sử dụng trong kỹ thuật RT-PCR, cặp mồi (DEV SBF1 – DEV SBR) được thiết kế bằng phần mềm *Primer3 software* dựa trên đoạn gen 446 bp của virus DTV và sử dụng máy 5700 Sequence detector (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi công ty Eurogentec SA (Bỉ)

Mồi	Trình tự mồi (5' → 3')	Kích thước (bp)	Kỹ thuật xét nghiệm
DEV-F	GAAGGCGGGTATGTAATGTA	446	Xác định DEV bằng phản ứng PCR
DEV-R	CAAGGCTCTATTCGGTAATG		
DEV-SBF1	CTCCTCCTCGCTGAGTGG	76	Xác định DEV bằng phản ứng RT-PCR
DEV-SBR	AACCGCAGCACTGCTATCTT		

2.3 Phương pháp nghiên cứu

- **Kỹ thuật ly tách ADN:** Việc ly tách ADN của virus được tiến hành tại phòng thí nghiệm bằng cách sử dụng bộ Kit *High Pure PCR template Preparation kit* (Roche, Germany).
- **Phản ứng PCR:** Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng cặp mồi DEV F – DEV R đã được Hansen *et al.*, (2000) mô tả, với Taq DNA Polymerase recombinante (Invitrogen), sản phẩm thu được từ phản ứng PCR này sau khi được chạy điện di (electrophoretis) trên môi trường thạch 1% và đọc kết quả dưới đèn cực tím (UV).
- **Phản ứng RT-PCR:** Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hoá chất đánh dấu là SYBR® Green Master Mix (Applied Bio Systems), cặp mồi được thiết kế bằng phần mềm *Primer3 software* dựa trên đoạn gen 446 bp đặc thù của virus DEV và sử dụng máy 5700 Sequence detector (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

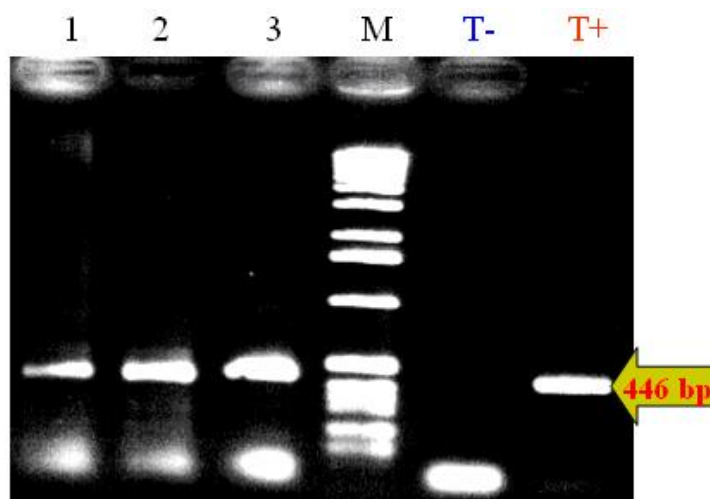
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Từ đàn vịt giống sinh sản Bắc Kinh tại trại chăn nuôi thực nghiệm của Trường nông nghiệp Périgueux thuộc vùng Aquitaine-Pháp, nghi bị nhiễm bệnh DTV với các triệu chứng và bệnh tích đặc trưng của bệnh như tỷ lệ chết cao và kéo dài, bại liệt, chảy nước mắt, tiêu chảy lỏng có màu xanh nhạt, giảm tỷ lệ đẻ.... Vịt chết bị xuất huyết ở nhiều cơ quan, đặc biệt loét ở dạ dày cơ, xuất huyết vòng nhẫn ở ruột non, xuất huyết xoang miệng... (hình 1).



Hình 1. Triệu chứng và bệnh tích của đàn vịt giống Bắc Kinh nghi nhiễm virus DTV

Để xác định đàn vịt giống này nhiễm bệnh do virus DTV, chúng tôi đã lấy 3 mẫu phân của 3 con vịt giống trong đàn có các triệu chứng và bệnh tích điển hình của bệnh dịch tả vịt để mang về phòng thí nghiệm thực hiện phản ứng PCR, và kết quả đã chứng minh cả 3 mẫu đều dương tính với virus DTV (Hình 2).



Ghi chú:

- 1, 2, 3: mẫu xét nghiệm
- T⁺: đối chứng dương
- T⁻: đối chứng âm
- M: thang đo kích thước của gen 1kpb(Invitrogen)
- 446 bp: là kích thước đoạn gen của virus DEV được phát hiện khi sử dụng cặp mồi miêu tả ở trên

Hình 2. ADN của virus DTV chẩn đoán bằng PCR từ đàn vịt giống nghi nhiễm bệnh

Để theo dõi sự truyền dọc của virus DTV từ đàn vịt giống mắc bệnh sang con chúng tôi tiến hành xét nghiệm 148 mẫu bệnh phẩm của vịt con 1 ngày tuổi và của trứng chết phôi (thai) được lấy từ đàn vịt giống Bắc Kinh đã được xác định bị nhiễm DEV, bằng phản ứng PCR và RT-PCT, kết quả được trình bày trong trong bảng 3, 4 và hình 3.

Bảng 3. Kết quả xét nghiệm bằng PCR và RT-PCR theo loại mẫu

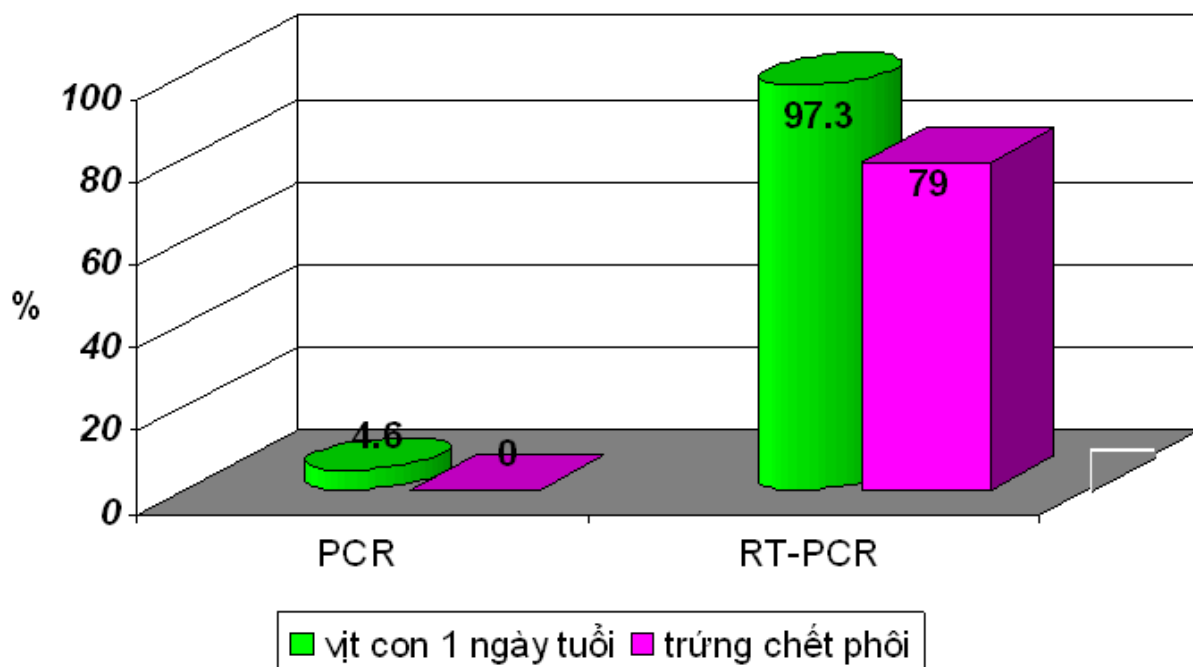
	Mẫu	Số lượng	Dương tính PCR		Dương tính RT-PCR	
			Số lượng (mẫu)	Tỷ lệ (%)	Số lượng (mẫu)	Tỷ lệ (%)
Vịt con 1 ngày tuổi	Phân	51	5	9,80	51	100
	Lách	51	0		50	98,04
	Gan	8	0		6	75
Trứng chết phôi (thai)	Phân-nước trứng	30	0		23	76,67
	Gan	8	0		7	87,50
Tổng		148	5	3,38	137	72,30

Bảng 4. Kết quả xét nghiệm bằng PCR và RT-PCR trên vịt con và trứng chết phôi

	Số mẫu	Dương tính PCR		Dương tính RT-PCR	
		Số lượng (mẫu)	Tỷ lệ (%)	Số lượng (mẫu)	Tỷ lệ (%)
Vịt con 1 ngày tuổi	110	5	4,60	107	97,30
Trứng chết phôi (thai)	38	0	0	30	79.00
Tổng	148	5	3,38	137	72,30

Qua bảng 3; 4 và hình 3 cho thấy tỷ lệ nhiễm virus DTV của vịt con 1 ngày tuổi và trứng chết phôi (thai) từ đàn vịt giống mắc bệnh DTV dao động từ 4,6 đến 97,3% ở vịt con 1 ngày tuổi và từ 0 đến 79% ở trứng chết phôi (thai) tùy theo phương pháp xét nghiệm. Tỷ lệ nhiễm của vịt con 1 ngày tuổi luôn cao hơn so với trứng chết phôi ở cả 2 phương pháp xét nghiệm đó là do virus DTV có sức đề kháng kém, dễ bị giảm mật độ virus do quá trình phân hủy của trứng chết phôi (thai), do đó trong xét nghiệm PCR không thể phát hiện được (0%) tuy nhiên khi sử dụng phương pháp RT-PCR thì tỷ lệ nhiễm DTV được phát hiện tăng lên cao (79%), là do Real-time PCR là

phương pháp PCR định lượng hiện đại hoàn toàn tự động đang được sử dụng phổ biến để xác định số lượng virus hiện diện trong mẫu phân tích và có độ nhạy rất cao, có thể phát hiện sự nhiễm virus DEV ở số lượng rất thấp (nhỏ hơn 10 bản sao/mẫu).



Hình 3. Kết quả xét nghiệm PCR và RT-PCR giữa vịt con và trứng chết phôi

Tỷ lệ nhiễm theo từng loại mẫu trong bảng 3 thì mẫu phân luôn chiếm tỷ lệ cao nhất, kể đến là gan và lách của vịt con 1 ngày tuổi và trứng chết phôi, tuy nhiên với kỹ thuật PCR chỉ phát hiện được virus DTV trong mẫu phân của vịt con 1 ngày tuổi với tỷ lệ 9,8% còn các loại mẫu khác thì không phát hiện được do mật số virus quá thấp, với kỹ thuật RT-PCR thì cả 3 loại mẫu (phân, gan, lách) đều phát hiện được virus DTV ở vịt con 1 ngày tuổi và trứng chết phôi (thai) từ đàn vịt giống bị nhiễm virus DTV với tỷ lệ dao động từ 75-100% và tỷ lệ nhiễm DTV trung bình là 72,3%.

Kết quả này hoàn toàn phù hợp với giả thuyết của một số nhà nghiên cứu trước đây về bệnh dịch tả vịt là virus DTV có khả năng lây truyền dọc từ mẹ sang con (Burgess *et al.*, 1981; JL. Guerin *et al.*, 2005).

IV. KẾT LUẬN

Qua kết quả nghiên cứu này đã khẳng định có sự truyền dọc của virus DTV gây bệnh dịch tả vịt từ đàn vịt giống sinh sản mắc bệnh đến vịt con (vịt 1 ngày tuổi và trứng chết phôi) với tỷ lệ nhiễm trung bình là 72,3% bằng kỹ thuật xét nghiệm RT-PCR. Do đó, phương pháp PCR, đặc biệt RT-PCR đã được chứng minh được độ nhạy và sự hiệu quả trong việc phát hiện ADN của virus DTV với mật số thấp và hiện nay RT-PCR được khuyến cáo nên sử dụng trong nghiên cứu dịch tễ hoặc là một phương tiện tin cậy dùng trong chẩn đoán bệnh hoặc để xác định nguồn bệnh trong tự nhiên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Burgess, E. C *et al* (1981). "Vertical transmission of duck plague virus (DPV) by apparently healthy DPV carrier waterfowl." *Avian Dis* 25(4) : 795-800.
2. Duck virus enteritis. OIE terrestrial manual (2010). Chapter 2.7.10.
3. Hansen, W. R. *et al* (2000). "Diagnosis of duck plague in waterfowl by polymerase chain reaction". *Avian Dis* 44(2): 266-74.
4. Han Xian-Jie *et al* (2006). "Cloning and sequence of glycoprotein H of duck plague virus". *Agricultural sciences in china*, 5(5): 397-402.
5. Kim Van Phuc *et al* (2004) "Application of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of duck plague virus in Vietnam". ACIAR Proceedings N°:117.
6. Pritchard, L. I. *et al* (1999) "Development of a polymerase chain reaction to detect Vietnamese isolates of duck virus enteritis." *Veterinary Microbiology* 68(1-2) : 149-156.
7. Samia Shawky *et al* (2002) "Latency sites and reactivation of duck enteritis virus". *Avian diseases* 46:308-313.
8. Tran Dinh Tu *et al* (2004) "Isolation and identification of duck plague viruses from naturally infected ducks in Southern Viet Nam" ACIAR Proceedings N°: 117.
9. Vũ Đình Tiểu và Mai Anh (1969) "Bệnh dịch tả vịt ở vùng Hà Nội -*Tạp chí KHKT Nông nghiệp* 12, 723-724.

Nhận ngày 20-5-2012

Phản biện: 3-6-2012