

MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU BƯỚC ĐẦU VỀ TEMBUSU VIRUS Ở VỊT BỆNH TẠI HÀ NỘI

Đặng Hữu Anh, Nguyễn Văn Giáp, Huỳnh Thị Mỹ Lệ
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định sự có mặt của Tembusu virus ở đàn vịt bệnh tại khu vực Hà Nội. Sử dụng phản ứng RT-PCR kết hợp với kết quả giải trình tự và phân tích trình tự gen NS5B đã khẳng định sự có mặt của Tembusu virus trong các mẫu vịt bệnh thu thập tại Hà Nội năm 2019. Triệu chứng lâm sàng và bệnh tích đại thể điển hình của vịt dương tính với Tembusu virus là hiện tượng mất điều hòa vận động, bại liệt, giảm đẻ mạnh đột ngột, buồng trứng xuất huyết, lách sưng, gan sưng. Bước đầu phân tích, 3 chủng Tembusu virus trong nghiên cứu này được xếp vào nhóm Thailand strains và gần gũi (về trình tự gen NS5B) với chủng virus phát hiện ở Thái Lan năm 2013 (KR061333).

Từ khóa: Tembusu virus, RT-PCR, NS5B, Hà Nội.

Some initial result of study on Tembusu virus in the infected ducks in Ha Noi

Dang Huu Anh, Nguyen Van Giap, Huynh Thi My Le

SUMMARY

This study was conducted to determine the presence of Tembusu virus in the duck flocks Ha Noi area. The result of RT-PCR combining with NS5B gene sequence analysis showed the presence of Tembusu virus in the infected duck samples collected in Ha Noi in 2019. The typical clinic symptoms and gross lesions of the infected ducks with Tembusu virus included phenomena on loss of moving ataxia, paralysis, reduction of laying egg suddenly and severely hemorrhagic ovary, swollen spleen and liver. The initial analysis result indicated that the 3 Tembusu virus strains in this study were classified as Thailand Tembusu virus strain and closely related (NS5B gene sequence) with the Tembusu virus strain that was detected in Thai Land in 2013 (KR061333).

Keywords: Tembusu virus, RT-PCR, NS5B, Ha Noi.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ tháng 6 đến tháng 11 năm 2010, một hiện tượng bệnh ở vịt đẻ được phát hiện ở Trung Quốc với biểu hiện giảm đẻ đột ngột trong vòng 1-2 tuần. Những biểu hiện khác bao gồm giảm ăn, uống, tiêu chảy phân xanh lá cây, chảy nước mũi, mất điều hòa vận động và bại liệt. Tỷ lệ mắc cao (lên đến 90%) và tỷ lệ chết dao động từ 5% đến 30%. Cao và cộng sự năm 2011 đã phân lập và nhận diện được virus có tên là Tembusu virus (TMUV) (Cao và cs., 2011). Tembusu virus, thuộc chi *Flavivirus*, họ *Flaviviridae* được phân lập lần đầu tiên vào năm 1955 ở loài muỗi *Culex tritaeniorhynchus* tại Malaysia, là

một ARN virus có độ dài khoảng 11 kilobases với một khung đọc mở (ORF) duy nhất mã hóa cho 3 protein cấu trúc cùng với 7 protein không cấu trúc (Zhang và cs., 2017). Virus không chỉ tác động đến vịt đẻ mà còn có thể lây nhiễm cho vịt thịt, gà, ngỗng và chuột (Sun và cs., 2019). Tembusu virus trước kia được cho là nhóm virus truyền lây thông qua vai trò của động vật trung gian là muỗi giống như virus gây bệnh viêm não Nhật Bản. Hiện tại người ta đã phát hiện ra Tembusu virus đã có thể được truyền lây theo những đường khác mà không cần thông qua vector truyền bệnh (Yan và cs., 2018). Chăn nuôi vịt tại Việt Nam đang phát triển mạnh, nhưng lịch

tiêm phòng vacxin cho đàn vịt nuôi chỉ tập trung vào bệnh viêm gan vịt, dịch tả vịt và cúm gia cầm. Thời gian gần đây ở nhiều địa phương đã xuất hiện vịt có biểu hiện nghi ngờ do Tembusu virus gây ra như giảm đẻ mạnh đột ngột, bại liệt, buồng trứng xuất huyết. Tuy nhiên chưa thấy có báo cáo khoa học xác nhận sự có mặt và xếp loại Tembusu virus gây bệnh. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khẳng định sự hiện diện của virus gây bệnh ở đàn vịt, từ đó giúp định hướng công tác chẩn đoán và phòng chống bệnh cho vịt hiệu quả.

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

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu một số đặc điểm triệu chứng, bệnh tích đại thể của vịt nghi mắc Tembusu virus.

- Xác định sự có mặt của Tembusu virus bằng phản ứng RT-PCR và giải trình tự gen NS5B.

2.2. Vật liệu

- Vịt ốm (2 - 7 tháng tuổi) có triệu chứng

nghi ngờ do Tembusu virus gây ra, thu thập tại các trang trại ở huyện Thạch Thất và Gia Lâm, Hà Nội.

- Mẫu gộp phủ tạng của vịt bệnh bao gồm: não, tim, phổi, gan, lách, buồng trứng.

- Hóa chất dùng tách và tinh sạch ARN tổng số gồm: (i) TRIzol reagent (15596026, Invitrogen); (ii) chloroform (102445, Merck Millipore); (iii) 2-Propanol (109634, Merck Millipore); (iv) cồn 70%; (v) nước cất đã xử lý bằng 0,1% diethylpyrocarbonate (IBS-BW004B, iNtRON Biotechnology).

- Tổng hợp cDNA được thực hiện bằng: (i) random hexamers (N8080127, Invitrogen) và (ii) kit M-MLV Reverse Transcriptase (28025013, Invitrogen).

- Sinh phẩm, hóa chất dùng cho phản ứng PCR: (i) 2X PCR Master mix solution (i-MAXII, 25266, iNtRON Biotechnology); (ii) cặp mồi đặc hiệu gen NS5 của virus được lấy theo nghiên cứu đã công bố (Liu và cs., 2012) với thông tin ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự mồi của phản ứng RT- PCR

Tên mồi	Trình tự mồi (5' – 3')	Kích thước (bp)
NS5f	TTTGGTACATGTGGCTCG	350
NS5r	ACTGTTTTCCCATCACGTCC	

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp thu thập mẫu

Phương pháp kiểm tra triệu chứng lâm sàng và mổ khám kiểm tra bệnh tích đại thể theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 8420:2010. Mẫu được thu thập theo Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia QCVN 01-83:2011.

2.3.2. Phương pháp tách và tinh sạch ARN tổng số

ARN tổng số được tách bằng TRIzol reagent

(theo hướng dẫn của nhà sản xuất), với các bước được tóm tắt như sau: (i) giải phóng ARN bằng cách bổ sung 750 µl TRIzol vào 250 µl huyền dịch mẫu 10%, đồng nhất bằng cách vortex ở tốc độ tối đa; (ii) tách pha ARN bằng 200 µl chloroform, vortex để đồng nhất; (iii) rửa ARN thu được ở bước (ii) bằng 500 µl 2-propanol, giữ ở -20°C/ 10 phút; (iv) rửa rửa ARN bằng 1ml cồn 75%. Các bước từ (ii) đến (iv) được ly tâm ở điều kiện 12.000 vòng/ phút trong 10 phút ở 4°C. Hòa tan rửa ARN bằng 30 µl nước (đã xử lý Dnase/Rnase) và bảo quản ở -70°C.

2.3.3. Phương pháp tổng hợp cDNA

ARN tổng số được chuyển thành cDNA bằng random hexamers, sử dụng bộ kit M-MLV Reverse Transcriptase với các thành phần được phối trộn theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng tổng hợp cDNA được thực hiện ở 37°C trong 60 phút.

2.3.4. Phương pháp PCR

Phản ứng PCR phát hiện Tembusu virus được thực hiện bằng cặp mồi NS5f/NS5r, theo quy trình đã công bố trước đây (Liu và cs., 2012). Phân tích sản phẩm PCR bằng điện di trong thạch agarose 2% có bổ sung thuốc nhuộm ADN (RedSafe) 1x.

2.3.5. Phương pháp phân tích trình tự gen

Sản phẩm PCR tinh sạch được giải trình tự theo hai chiều (xuôi và ngược) bằng phương pháp Sanger (thực hiện tại công ty Macrogen, Hàn Quốc). Trình tự nucleotide được phân tích bằng chương trình BioEdit v7.1.3.0 (Hall, 1999) trên cơ sở đối chiếu so sánh (i) giữa trình tự nucleotide được giải trình tự theo chiều xuôi và

chiều ngược, và (ii) với trình tự gen NS5 của chủng Tembusu virus tham chiếu (GenBank: KY626659).

Trình tự một phần gen NS5 thu được trong nghiên cứu này dùng để xác định mối liên hệ di truyền giữa các chủng Tembusu virus của Việt Nam với các chủng trên thế giới công bố ở GenBank. Các trình tự tham chiếu được chọn theo nghiên cứu trước đây (Yu và cs., 2018). Trình tự nucleotide được căn chỉnh (alignment) bằng phần mềm MAFFT (Katoh và Standley, 2013) với các tham số mặc định. Cây phát sinh chủng loại (phylogenetic tree) được xây dựng bằng thuật toán neighbor-joining, tích hợp trong chương trình MEGA phiên bản 7.0.26 (Kumar và cs., 2016). Mức tin cậy của các nhánh phân chia ở mỗi nút (node) được biểu thị bằng giá trị bootstrap. Biểu diễn và hiệu đính cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm FigTree phiên bản 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tình hình dịch bệnh ở một số đàn vịt nuôi tại Hà Nội



Hình 1. Triệu chứng lâm sàng và bệnh tích đại thể của vịt dương tính với xét nghiệm phát hiện Tembusu virus

A: Vịt có tỷ lệ mắc cao, mất điều hòa vận động, bại liệt; B: Phân xanh lá cây; C: Lách sưng; D: Túi mật sưng; E: Bồng trứng xuất huyết; F: Gan sưng

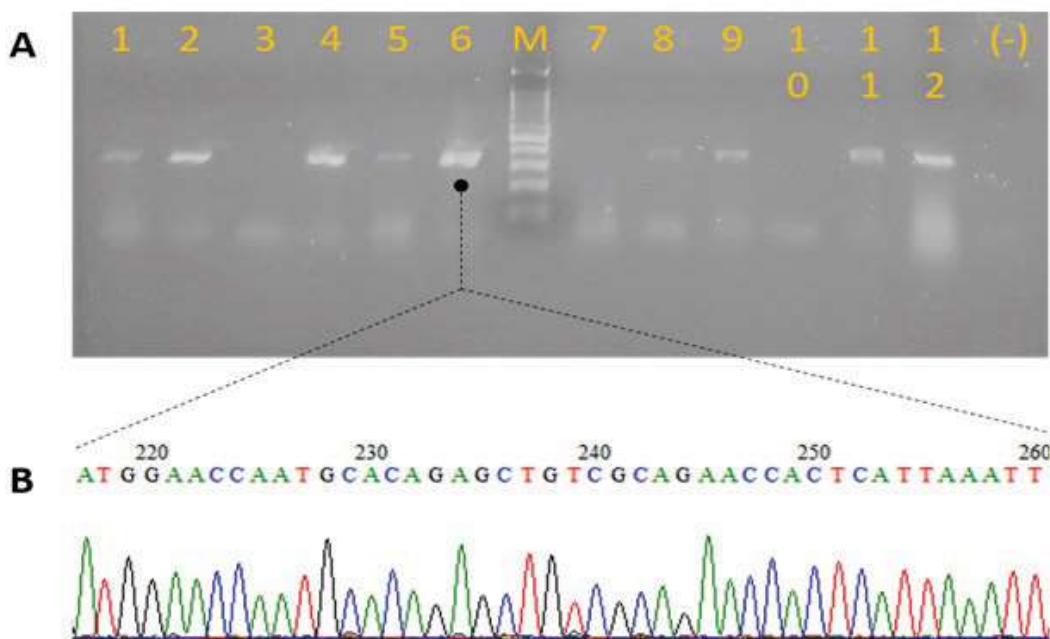
Trong khoảng thời gian từ tháng 3 đến tháng 10 năm 2019, một số đàn vịt nuôi tại Hà Nội có biểu hiện sốt, giảm ăn, uống. Vịt bị mất điều hòa vận động, đi đứng xiêu vẹo. Vịt thịt có hiện tượng chết với số lượng lớn trong vài ngày. Vịt đẻ giảm đẻ mạnh đột ngột. Khi mổ khám vịt thấy có biểu hiện gan sưng, lách sưng, buồng trứng xuất huyết.

Hình 1 mô tả một số triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đại thể của đàn vịt bệnh. Do ổ dịch ở vịt có thể do ghép nhiều nguyên nhân nên ngoài những đặc điểm trên, một số vịt còn có hiện tượng tiêu chảy phân màu xanh lá cây, gan hoại tử có phủ fibrin và túi mật sưng. Một số phác đồ can thiệp dịch đã được áp dụng gồm sử dụng kháng sinh (Ceftiofur, Gentamycin, Doxycycline, Florphenicol), bổ trợ bằng điện giải và tiêm lại vaccin dịch tả vịt nhưng chưa thấy hiệu quả. Một số trang trại đã gửi mẫu xét nghiệm dịch tả vịt và cúm gia cầm nhưng kết quả đều âm tính (kết quả không báo cáo). Theo thông tin ghi nhận từ biểu hiện lâm sàng và kết hợp với tình hình dịch tễ bệnh do Tembusu virus ở vịt trong

khu vực, chúng tôi đã sử dụng phương pháp RT-PCR để xác định xem liệu có sự hiện diện của Tembusu virus ở những đàn vịt này hay không.

3.2. Kết quả RT-PCR phát hiện Tembusu virus

Kết quả RT-PCR phát hiện Tembusu virus trong 12 mẫu bệnh phẩm (hình 2A) cho thấy mẫu đối chứng âm của phản ứng không có vạch đặc hiệu; có 9/12 mẫu xét nghiệm có vạch sản phẩm PCR trong khoảng kích thước 350 bp. Mẫu bệnh phẩm số 3, 10 không có vạch sản phẩm và được đánh giá là âm tính. Vì Tembusu virus chưa từng được phát hiện ở Việt Nam, để khẳng định tính đặc hiệu của phản ứng, sản phẩm RT-PCR đã được giải trình tự gen (hình 2B). Kết quả tìm kiếm trình tự tương đồng từ cơ sở dữ liệu của GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) cho biết: trình tự nucleotide đầu vào (350 nucleotide) giống 97,13% (JQ627864) đến 98,28% (KY623423) với các chủng Tembusu virus đã biết. Như vậy, phản ứng RT-PCR đặc hiệu và có 9/12 mẫu xét nghiệm dương tính với Tembusu virus.



Hình 2. Kết quả RT-PCR phát hiện Tembusu virus

A: giếng 1-12 là các mẫu xét nghiệm, M là 100bp DNA ladder, mẫu đối chứng âm (-);

B: giản đồ giải trình tự gen sản phẩm PCR (mẫu số 6)

3.3. Mức độ biểu hiện lâm sàng của đàn vịt dương tính với Tembusu virus

Kết quả hồi cứu từ những vịt có mẫu dương tính với Tembusu virus bằng phương pháp RT-PCR được trình bày ở bảng 2. Kết quả cho thấy những biểu hiện có tỷ lệ cao ở vịt bệnh gồm: Vịt mất điều hòa vận động (9/9 con), bại liệt (8/9 con), lách sưng (6/9 con). Ở vịt đẻ có hiện tượng giảm đẻ mạnh (từ 90% xuống còn 10% trong vòng 1 tuần theo thông tin từ trang trại) và xuất huyết buồng trứng chiếm tỷ lệ 5/5 con khi kiểm tra bệnh tích đại thể. Năm

2018, một nghiên cứu hồi cứu mẫu bệnh phẩm dương tính với Tembusu virus tại Thái Lan đã công bố những mẫu vịt bệnh từ năm 2007 có triệu chứng thần kinh, giảm đẻ mạnh đột ngột (Ninvilai và cs., 2018). Lu và cs. đã gây bệnh thực nghiệm Tembusu virus cho vịt và ghi nhận bệnh tích đại thể ở vịt 7, 18, 21 tuần tuổi gồm gan sưng, xuất huyết cơ tim, xuất huyết ruột và phù phổi (Lu và cs., 2016). Kết quả hồi cứu của chúng tôi về mẫu bệnh phẩm dương tính Tembusu virus phù hợp với những nghiên cứu của các tác giả trên.

Bảng 2. Tỷ lệ triệu chứng và bệnh tích của vịt dương tính với Tembusu virus

Biểu hiện	Vịt đẻ (con)	Vịt thịt (con)	Số có biểu hiện (con)	Tỷ lệ
Mất điều hòa vận động	5	4	9	9/9
Bại liệt	5	4	8	8/9
Buồng trứng xuất huyết	5	-	5	5/5
Lách sưng	5	4	6	6/9
Gan sưng	5	4	7	7/9

3.4. Kết quả phân tích mối liên hệ di truyền của các chủng Tembusu virus

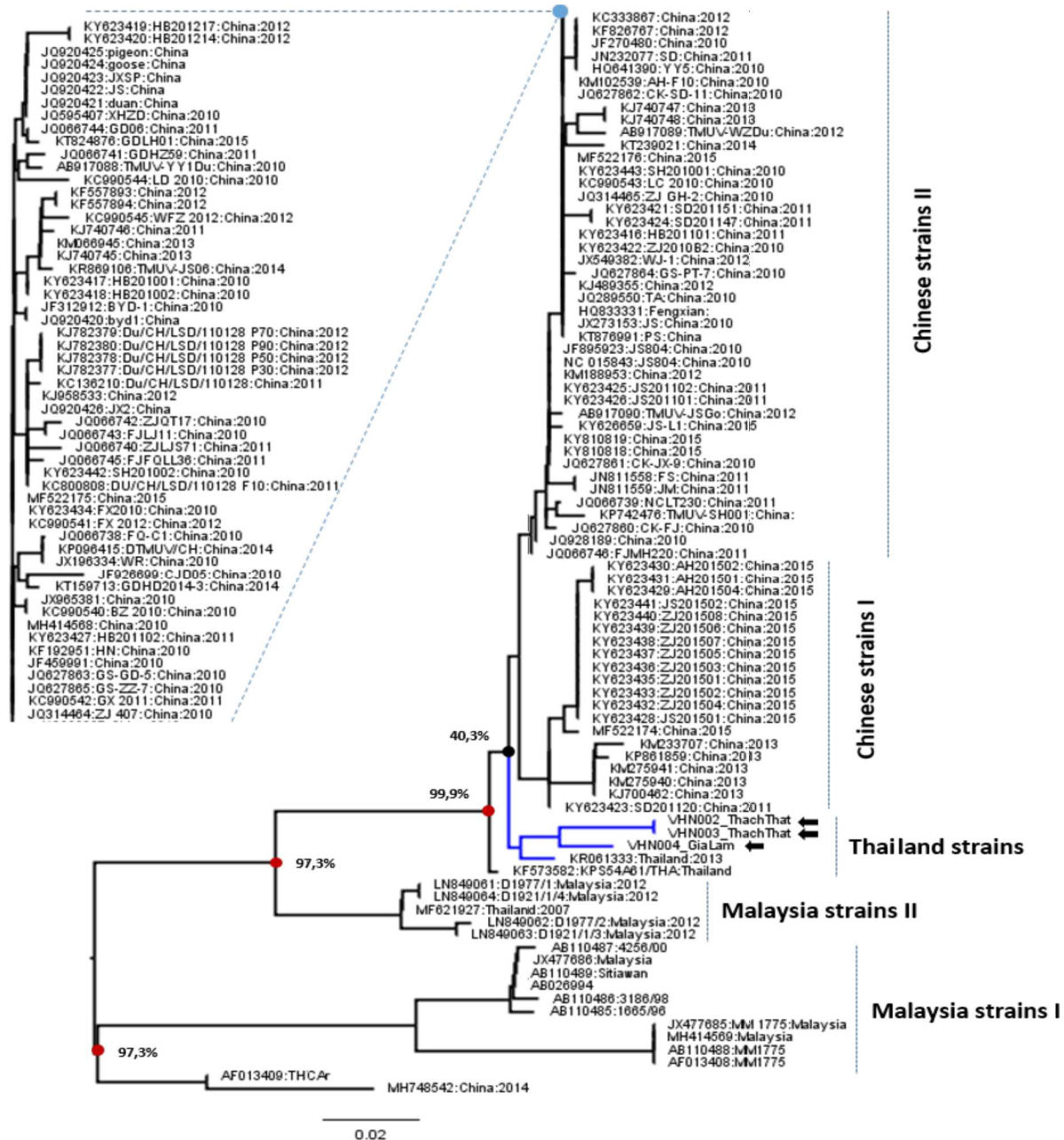
Dựa vào trình tự một phần gen NS5B (350 nucleotide), cây phát sinh chủng loại đã được xây dựng với 3 chủng của Việt Nam và 137 trình tự tương ứng công bố trên GenBank (hình 3).

Trình tự gen NS5B thường được dùng trong nghiên cứu mối liên hệ di truyền của giống *Flavivirus* (Kuno và cs., 1998), trong đó Tembusu virus là một thành viên. Kết quả xây dựng cây phát sinh chủng loại trong nghiên cứu này giống với công bố trước đây (Yu và cs., 2018) khi cũng chỉ ra có 5 nhóm di truyền của Tembusu virus với giá trị bootstrap > 90% (hình 3).

Dựa vào đặc điểm phân nhóm, các chủng

Tembusu virus của Trung Quốc tạo thành 2 nhánh lớn riêng biệt (Chinese strains I, II) và tách biệt với chủng virus phát hiện được ở Thái Lan và Malaysia. Cũng dựa vào đặc điểm trên, 3 chủng Tembusu virus trong nghiên cứu này được xếp vào nhóm Thailand strains và gần gũi (về trình tự gen NS5B) với chủng virus phát hiện ở Thái Lan năm 2013 (KR061333).

Kết quả phân tích trình tự gen cũng cho thấy, phản ứng RT-PCR đã được tối ưu và đạt độ tin cậy cao trong chẩn đoán bệnh do Tembusu virus gây ra. Trong số những mẫu dương tính với phản ứng RT-PCR, có cả mẫu của đàn vịt thịt bị bệnh ở giai đoạn 2 tháng tuổi, chứng tỏ Tembusu virus cũng có khả năng gây nhiễm cho vịt thịt ở Việt Nam.



Hình 3. Cây phát sinh chủng loại của Tembusu virus

Ghi chú: một phần trình tự NS5B (350 nucleotide) được dùng để xây dựng cây, giá trị bootstrap được trình bày cho các nhánh chính. Tembusu virus được phân thành 5 nhóm chính dựa vào nghiên cứu của Yu và cs. 2018. Nhánh của cây phát sinh chủng loại dẫn tới 3 chủng của Việt Nam (mũi tên) được đánh màu xanh.

IV. KẾT LUẬN

Như vậy, kết quả phát hiện virus bằng phản ứng RT-PCR kết hợp với kết quả giải trình tự và phân tích trình tự gen NS5B đã

khẳng định sự có mặt của Tembusu virus trong các mẫu vịt bệnh thu thập tại Hà Nội năm 2019. Vịt bệnh thường có biểu hiện giảm đẻ mạnh đột ngột (với vịt đẻ), mất điều hòa vận động, bại liệt. Bệnh tích đại thể khi

mổ khám thấy buồng trứng xuất huyết, gan sưng, lách sưng. Ba chủng Tembusu virus trong nghiên cứu này được xếp vào nhóm Thailand strains và gần gũi (về trình tự gen NS5B) với chủng virus phát hiện ở Thái Lan năm 2013 (KR061333). Những nghiên cứu kế tiếp cần thực hiện là xác định đặc điểm dịch tễ học, dịch tễ học phân tử của bệnh, phân lập virus gây bệnh và hướng tới giải pháp phòng chống bệnh hiệu quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cao Z., Zhang C., Liu Y., Ye W., Han J., Ma G., Zhang D., Xu F., Gao X. & Tang Y. (2011). Tembusu virus in ducks, China. *Emerging infectious diseases*. 17(10): 1873.
2. Hall T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
3. Katoh K. & Standley D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*. 30(4): 772-780.
4. Kumar S., Stecher G. & Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 33(7): 1870-4.
5. Kuno G., Chang G.-J. J., Tsuchiya K. R., Karabatsos N. & Cropp C. B. (1998). Phylogeny of the Genus Flavivirus. *Journal of Virology*. 72(1): 73.
6. Liu M., Chen S., Chen Y., Liu C., Chen S., Yin X., Li G. & Zhang Y. (2012). Adapted Tembusu-like virus in chickens and geese in China. *J Clin Microbiol.* 50(8): 2807-9.
7. Lu Y., Dou Y., Ti J., Wang A., Cheng B., Zhang X. & Diao Y. (2016). The effect of Tembusu virus infection in different week-old Cherry Valley breeding ducks. *Veterinary microbiology*. 192: 167-174.
8. Ninvilai P., Nonthabenjawon N., Limcharoen B., Tunterak W., Oraveerakul K., Banlunara W., Amonsin A. & Thontiravong A. (2018). The presence of duck Tembusu virus in Thailand since 2007: A retrospective study. *Transboundary and emerging diseases*. 65(5): 1208-1216.
9. Sun X., Liu E., Iqbal A., Wang T., Wang X., Haseeb A., Ahmed N., Yang P. & Chen Q. (2019). The dynamic distribution of duck Tembusu virus in the spleen of infected shelducks. *BMC veterinary research*. 15(1): 112.
10. Yan D., Shi Y., Wang H., Li G., Li X., Wang B., Su X., Wang J., Teng Q. & Yang J. (2018). A single mutation at position 156 in the envelope protein of Tembusu virus is responsible for virus tissue tropism and transmissibility in ducks. *Journal of virology*. 92(17): e00427-18.
11. Yu G., Lin Y., Tang Y. & Diao Y. (2018). Evolution of Tembusu Virus in Ducks, Chickens, Geese, Sparrows, and Mosquitoes in Northern China. *Viruses*. 10(9): 485.
12. Zhang W., Chen S., Mahalingam S., Wang M. & Cheng A. (2017). An updated review of avian-origin Tembusu virus: a newly emerging avian Flavivirus. *Journal of General Virology*. 98(10): 2413-2420.

Ngày nhận 5-12-2019

Ngày phản biện 21-12-2019

Ngày đăng 1-1-2020