

PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH VIRUS GÂY BỆNH VIÊM GAN VỊT TYPE I Ở TỈNH HẬU GIANG

Phạm Công Uân¹ và Hồ Thị Việt Thu²

¹ Trường Cao đẳng Cộng đồng Kiên Giang

² Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/9/2014

Ngày chấp nhận: 07/11/2014

Title:

Isolation and identification of duck hepatitis virus type I in Hau Giang Province

Từ khóa:

Virus, viêm gan vịt, Hậu Giang

Keywords:

Virus, duck, hepatitis, Hau Giang

ABSTRACT

A study on isolation and identification of duck hepatitis virus was performed on 25 liver samples from suspected viral hepatitis ducks collected in Hau Giang by inoculation on duck embryos and duck embryo fibroblasts. The results showed that all of duck embryos were died after inoculation from 48 to 72 hours. Typical lesions of inoculated embryo were stunt embryos with skin hemorrhage and orange or green livers covered with hemorrhagic. The cytopathic effect in embryo fibroblast cells are curled destroyed cell syncytiums and viral plaques. The results of RT-PCR technique showed that all 25 samples from suspected viral hepatitis ducks contained duck hepatitis virus A genotype 3 (DHAV-3).

TÓM TẮT

Nghiên cứu phân lập và định danh virus gây viêm gan vịt được thực hiện trên 25 mẫu gan vịt thu thập từ những đàn nghi ngờ mắc bệnh viêm gan do virus ở tỉnh Hậu Giang. Các mẫu bệnh phẩm được phân lập qua phôi vịt, sau đó gây nhiễm cho môi trường tế bào xơ phôi vịt. Kết quả cho thấy tất cả các mẫu bệnh phẩm đều gây chết phôi vịt với thời gian chết phôi từ 48-72 giờ. Bệnh tích điển hình trên phôi là phôi xuất huyết, chậm phát triển; gan xuất huyết, có màu vàng cam hoặc xanh lá cây. Trên môi trường tế bào, biến đổi bệnh lý thể hiện các tế bào co tròn và bị phá hủy tạo thành những vệt tan. Kết quả giám định virus từ các mẫu đã phân lập bằng kỹ thuật RT-PCR cho thấy trong 25 mẫu bệnh phẩm đều có chứa virus gây bệnh viêm gan vịt A thuộc genotype 3 (DHAV-3).

1 GIỚI THIỆU

Viêm gan vịt do virus (Duck Hepatitis Virus: DHV) là bệnh truyền nhiễm cấp tính, gây bệnh phổ biến ở vịt con từ 01 đến 28 ngày tuổi, tỷ lệ chết cao, với bệnh tích đặc trưng là gan nhạt màu, xuất huyết. Bệnh này được mô tả đầu tiên ở Long Island vào năm 1949 (Levine and Fabricant, 1950). Sau đó dịch bệnh này được báo cáo ở Anh, Canada, Đức, Nhật và các nơi khác, đặc biệt là ở các nước Châu Á. Bệnh viêm gan vịt gây ra bởi ba loại virus khác nhau gọi là virus viêm gan vịt type 1, type 2 và

type 3. Phổ biến nhất là virus viêm gan vịt type 1 (Kim *et al.*, 2006; Tseng *et al.*, 2007). Theo Tseng and Tsai (2007) thì virus viêm gan vịt type 1 được xếp vào chi mới *Avihepatovirus* thuộc họ *Picornaviridae*. Chi này gồm ba loài virus viêm gan A ở vịt (Duck hepatitis A virus: DHAV) là DHAV-1, DHAV-2 và DHAV-3. Virus viêm gan A type 1 (DHAV-1) là virus viêm gan vịt type 1 (DHV-1: viêm gan vịt do virus type 1 gốc ban đầu) và 2 kiểu gen bổ sung là DHAV-2 (Tseng and Tsai., 2007) và DHAV-3 (Kim *et al.*, 2007a).

Ở Việt Nam, Trần Minh Châu và ctv. (1985) đã ghi nhận có bệnh viêm gan vịt do virus, nhưng vào thời điểm này chưa phân lập được mầm bệnh. Những năm gần đây, cũng có nhiều nghiên cứu về bệnh viêm gan vịt ở nước ta, nhưng ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long chưa có nghiên cứu nào được thực hiện. Cho nên việc phân lập và định danh virus viêm gan vịt tại địa phương là hết sức cần thiết, nhằm xác định chính xác virus gây bệnh và tìm ra giải pháp phòng và trị bệnh đạt hiệu quả cao.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện nghiên cứu

Thu mẫu từ những đàn vịt con từ 01-28 ngày tuổi có biểu hiện triệu chứng như tỷ lệ bệnh và tỷ lệ chết cao, khi chết có tư thế đặc trưng là đầu ngửa lên lưng, hai chân duỗi thẳng, tiến hành mổ khám phát hiện gan sưng xuất huyết hay hoại tử, thận sưng thì tiến hành thu mẫu. Mỗi đàn thu từ 2-4 mẫu gan của vịt nhiễm bệnh sắp chết hoặc mới chết để làm xét nghiệm. Tổng cộng thu được 25 mẫu gan từ 8 đàn vịt nghi nhiễm bệnh viêm gan vịt do virus ở một số huyện như: Phụng Hiệp, Long Mỹ,

Vị Thủy thuộc tỉnh Hậu Giang.

Phôi vịt 11-14 ngày tuổi dùng để nuôi cấy tế bào, phân lập virus qua môi trường tế bào và phôi trứng.

Bộ kit tách chiết RNA và sử dụng trong phản ứng RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction).

Các cặp mồi sử dụng trong phản ứng RT-PCR: nghiên cứu này sử dụng 3 cặp mồi để xác định virus viêm gan vịt type 1 (DHAV):

Cặp mồi 1: mồi xuôi, ký hiệu: DHAV-1F và mồi ngược, ký hiệu: DHAV-1R dùng để xác định virus viêm gan A vịt type 1 (theo Chen *et al.*, 2012).

Cặp mồi 2: mồi xuôi, ký hiệu: DHAV-2F và mồi ngược, ký hiệu: DHAV-2R dùng để xác định virus viêm gan A vịt genotype 2 (theo Chou *et al.*, 2013).

Cặp mồi 3: mồi xuôi, ký hiệu: DHAV-3F và mồi ngược, ký hiệu: DHAV-3R dùng để xác định virus viêm gan A vịt genotype 3 (theo Chen *et al.*, 2012).

Bảng 1: Các trình tự mồi sử dụng trong phản ứng RT-PCR

Ký hiệu mồi	Trình tự mồi (5'→3')	Vị trí khuếch đại	Sản phẩm PCR
DHAV-1F	5'-CAACTCGACCAATACCTGG-3'	1880-2371	492 bp
DHAV-1R	5'-CCTGATGGACCATTGTGACTG-3'		
DHAV-2F	5'-TTG GGT GCA ATC CAGACA CT-3'	2741-3085	343 bp
DHAV-2R	5'-AGT AGG TCA TCA CCG TAG GC-3'		
DHAV-3F	5' -GAAATCTGCACTCAATGGAGAG-3'	2841-3126	286 bp
DHAV-3R	5' -CCCAGGAAATGATTGGTCAG-3'		

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phân lập virus viêm gan vịt qua môi trường phôi trứng vịt

Nghiên các mẫu gan thu thập cùng một đàn tạo thành một mẫu huyền dịch bệnh phẩm, có 8 mẫu huyền dịch bệnh phẩm để làm thí nghiệm.

Tiêm 0,2 ml huyền dịch bệnh phẩm vào túi niêu mô của phôi vịt 14 ngày tuổi. Sau đó tiếp tục đem

trứng ấp trong máy ấp ở 37°C, mỗi ngày kiểm tra sự hoạt động của phôi. Nếu phát hiện phôi chết thì ghi nhận thời gian phôi chết và bệnh tích biểu hiện trên phôi. Thu nhận dịch nước trứng và gan của phôi đem trữ đông ở -80°C để làm các thí nghiệm tiếp theo. Các chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ chết phôi theo thời gian, Tần suất xuất hiện bệnh tích trên phôi.

$$\text{Tỷ lệ chết phôi theo thời gian (\%)} = \frac{\text{Số phôi chết cùng thời điểm}}{\text{Tổng số phôi vịt thí nghiệm}} \times 100$$

$$\text{Tần suất xuất hiện bệnh tích trên phôi (\%)} = \frac{\text{Số phôi có cùng bệnh tích}}{\text{Tổng số phôi chết}} \times 100$$

2.2.2 Phân lập virus viêm gan vịt qua môi trường tế bào xơ phôi vịt

Tạo lớp tế bào xơ phôi vịt sơ cấp

Qui trình tạo lớp đơn tế bào DEF (Duck Embryo Fibroblast) được thực hiện theo phương pháp của Doyle and Griffiths (1998).

Cấy truyền và thu nhận dịch virus

Nước trứng, gan phôi sau khi phân lập virus được thu hoạch và gây nhiễm trên môi trường tế bào xơ phôi vịt sơ cấp. Quy trình được thực hiện theo phương pháp của Hussain and Rasool (2005).

2.3 Định danh virus viêm gan vịt bằng kỹ thuật RT-PCR

2.3.1 Phương pháp tách chiết RNA tổng số

RNA tổng số được tách chiết từ dịch virus thu nhận từ môi trường tế bào xơ phôi vịt. RNA tổng số bao gồm RNA hệ gen của virus viêm gan vịt và RNA của tế bào. Mục đích tách chiết là để thu nhận hệ gen của virus viêm gan vịt làm khuôn cho phản ứng RT-PCR. Tách chiết RNA tổng số được tiến hành bằng Bộ kit tách chiết RNA bằng Phenol/Chloroform: **^{N4}pRNA Extraction Kit (VA.A92-002B)** của Công ty cổ phần công nghệ Việt Á (qui trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất).

2.3.2 Thực hiện phản ứng RT-PCR

Phản ứng RT-PCR được tiến hành qua 2 giai đoạn, bao gồm giai đoạn RT (Reverse Transcription: phản ứng sao chép ngược chuyển mRNA thành cDNA) và giai đoạn PCR (Polymerase Chain Reaction: phản ứng nhân gen). Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng bộ Tetro cDNA Synthesis Kit của hãng BIOLINE để chuyển mRNA thành cDNA, sau đó thực hiện phản ứng PCR theo qui trình của Công ty cổ phần công nghệ Việt Á.

Thành phần phản ứng RT (Reverse Transcription) chuyển mRNA thành cDNA: Random Hexamer 1 µl, 10 mM dNTP mix 1µl, 5x RT Buffer 4 µl, Ribosafe RNase Inhibitor 1 µl, Tetro Reverse Transcriptase (200 u/µl) 1 µl, mRNA 12µl. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng RT lần lượt là 45°C trong 30 phút, 85°C trong 5 phút, thực hiện 01 chu kỳ. Kết thúc phản ứng trữ cDNA ở -20°C đến khi thực hiện phản ứng PCR.

Thành phần phản ứng PCR: H₂O Biopure 27 µl, iStandard PCR Master Mix 2X 20µl, Primer DHAV-Fs 0,5 µl, Primer DHAV-Rs 0,5 µl, cDNA 2 µl. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR: 94°C trong 5 phút, thực hiện 1 chu kỳ; bước biến tính 94°C trong 1 phút 30 giây, bước lai 52°C trong 1 phút, bước kéo dài 72°C trong 1 phút 30 giây, thực hiện 35 chu kỳ; 72°C trong 1 phút 30 giây, thực hiện 1 chu kỳ, cho kết thúc ở vòng cuối cùng. Sau khi kết thúc phản ứng RT-PCR, lấy sản phẩm đem điện di

trên gel agarose 1,5 % để phát hiện sản phẩm RT-PCR. Sau khi kết thúc điện di, lấy sản phẩm soi trên máy Dolphin-DOC và chụp ảnh lưu giữ mẫu để kiểm tra.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập virus viêm gan vịt qua phôi trứng vịt

3.1.1 Khảo sát tỷ lệ chết phôi theo thời gian

Tiêm huyền dịch bệnh phẩm vào túi niêu mô của trứng vịt có phôi lúc 14 ngày tuổi, sau đó tục ấp ở 37°C để theo dõi thời gian chết phôi và bệnh tích thể hiện trên phôi. Kết quả ghi nhận thời gian chết phôi trình bày qua Bảng 2.

Bảng 2: Thời gian chết phôi sau tiêm truyền (n = 8)

Số lượng mẫu	Tỷ lệ chết phôi theo thời gian		
	48 giờ	72 giờ	Tổng số phôi chết
8	3	5	8
Tổng	3/8	5/8	8/8
Tỷ lệ (%)	37,5	62,5	100

Qua Bảng 2 cho thấy, khi tiêm huyền dịch bệnh phẩm vào phôi trứng thì virus nhân lên và bắt đầu gây chết phôi lúc 48 giờ là 37,5%, lúc 72 giờ chiếm tỷ lệ cao là 62,5%; tất cả các mẫu huyền dịch bệnh phẩm khi tiêm vào phôi vịt khi virus nhân lên đều gây chết phôi. Theo nghiên cứu của Woolcock (1986), virus viêm gan vịt type 1 khi nuôi cấy trên môi trường phôi vịt 10-14 ngày tuổi, virus gây chết phôi trong vòng 24-72 giờ và kết quả nghiên cứu của Jin.X *et al.* (2008), khi phân lập virus viêm gan vịt trên môi trường phôi vịt cho thấy virus gây chết phôi lúc 48-96 giờ sau khi gây nhiễm. Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy, những mẫu bệnh phẩm chứa nhiều virus thì số lượng virus nhân lên trong phôi nhiều và gây chết phôi nhanh, những mẫu chứa ít virus thì cần phải có đủ thời gian để virus nhân lên với số lượng lớn nên gây chết phôi chậm, qua đó chứng tỏ rằng tất cả các mẫu bệnh phẩm thu thập từ 8 đàn vịt thuộc tỉnh Hậu Giang đều có khả năng chứa virus viêm gan vịt. Sau khi phát hiện phôi chết, tiến hành mổ khám và ghi nhận bệnh tích biểu hiện trên phôi.

3.1.2 Biểu hiện bệnh tích trên phôi vịt thí nghiệm

Sau khi kiểm tra phát hiện phôi chết, tiến hành mổ khám xác định bệnh tích trên phôi. Kết quả biểu hiện bệnh tích trên phôi được ghi nhận ở Bảng 3.

Bảng 3: Tần suất xuất hiện bệnh tích trên phôi (n= 8)

Bệnh tích	Tần suất xuất hiện bệnh tích	Tổng số	Tỷ lệ %
Phôi xuất huyết	8	8/8	100
Phù phôi, phôi tích nước	3	3/8	37,5
Gan sưng xuất huyết	5	5/8	62,5
Gan sưng có màu vàng cam	4	4/8	50,0
Gan sưng có màu xanh đen	3	3/8	37,5
Gan sưng có màu xanh lá cây	1	1/8	14,28
Cơ tim nhạt màu	5	5/8	62,5
Mật căng phồng	2	2/8	25,0

Qua Bảng 3 cho thấy, khi phôi chết có những biểu hiện bệnh tích rất đặc trưng của bệnh viêm gan vịt do virus. Biểu hiện bên ngoài, phôi xuất huyết, có nhiều trường hợp xuất huyết toàn thân, chiếm tỷ lệ cao 100%; hiện tượng gan sưng xuất huyết và cơ tim nhạt màu, tỷ lệ 62,5%; hiện tượng gan sưng có màu vàng cam, tỷ lệ 50%; gan sưng có màu xanh đen, tỷ lệ 37,5% và gan sưng có màu xanh lá cây, tỷ lệ 14,28%; ngoài ra còn có biểu hiện phù phôi, tỷ lệ 37,5% và mật căng phồng, tỷ lệ 25%. Theo nghiên cứu của Levine and Fabricant (1950), khi tiêm virus vào xoang niệu mô phôi vịt 10-14 ngày tuổi sau 24-72 giờ thì phôi chết với bệnh tích đặc trưng như phôi còi cọc, xuất huyết

dưới da đặc biệt là ở vùng đầu, bụng và chân, phù phôi, gan sưng có màu đỏ hoặc hơi vàng. Kết quả nghiên cứu của Jin.X *et al.* (2008), phân lập virus qua phôi trứng, khi phôi chết có biểu hiện bệnh lý điển hình trên phôi như phôi còi cọc, xuất huyết da, gan sưng và xuất huyết điểm, phôi chết dịch nước trứng có màu xanh nhạt. Như vậy, chúng tôi nhận thấy những mẫu bệnh phẩm đã thu thập có biểu hiện bệnh lý rất đặc trưng của bệnh viêm gan vịt do virus. Sau khi mổ khám ghi nhận biểu hiện bệnh lý trên phôi, thu hoạch nước trứng và bệnh phẩm là gan của phôi trữ lạnh ở -80°C để tiếp tục phân lập trên môi trường tế bào xơ phôi vịt sơ cấp.



Hình 1: Cơ tim nhạt màu và gan sưng xuất huyết



Hình 2: Phôi xuất huyết



Hình 3: Phôi phù tích nước



Hình 4: Gan màu xanh lá cây



Hình 5: Gan màu xanh đen

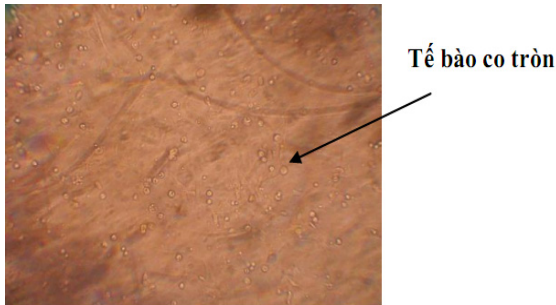


Hình 6: Gan màu vàng cam

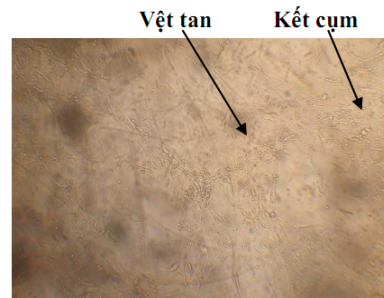
3.2 Kết quả phân lập trên môi trường tế bào xơ phôi vịt sơ cấp (DEF: Duck Embryo Fibroblast)

Sau khi nuôi và kiểm tra thấy tế bào đã phủ từ 80-90% bề mặt bình nuôi cấy, tiến hành cho huyền dịch bệnh phẩm (dịch nước trứng, gan của phôi) đã thu thập từ quá trình phân lập qua phôi trứng vào

môi trường tế bào. Sau đó ủ ở 37°C, 5% CO₂, ẩm độ 80%. Sau khi ủ được 24 giờ, virus nhân lên và xuất hiện CPE (bệnh tích tế bào). Virus nhân lên trong tế bào và tạo bệnh tích tế bào có nhiều dạng: tế bào co tròn, kết cụm hay tạo thành những vết tan. Khi phát hiện có bệnh tích tế bào rõ thì thu hoạch dịch tế bào bảo quản lạnh ở -80°C để tiến hành giám định virus bằng kỹ thuật RT-PCR.



Hình 7a: Tế bào co tròn



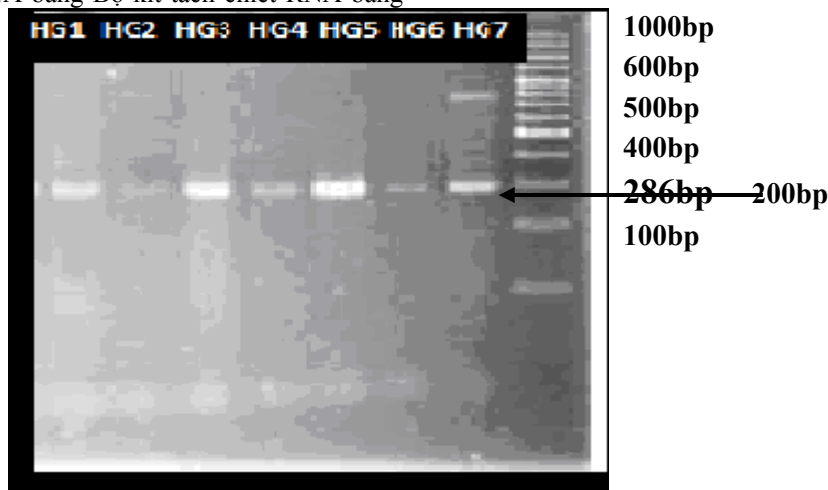
Hình 7b: Tế bào kết cụm và những vết tan

3.3 Kết quả định danh virus viêm gan vịt bằng kỹ thuật RT-PCR

Sau khi phân lập trên môi trường phôi trứng vịt và môi trường tế bào. Chọn 7 mẫu có gây bệnh tích điển hình trên phôi và bệnh tích tế bào để xác định virus gây bệnh.

Huyền dịch virus từ môi trường tế bào được tách chiết RNA bằng Bộ kit tách chiết RNA bằng

Phenol/Chloroform: ^{N4}pRNA Extraction Kit (VA.A92-002B); tiếp theo chuyển RNA thành cDNA bằng bộ Tetro cDNA Synthesis Kit của hãng BIOLINE, sau đó thực hiện qui trình PCR. Sau khi kết thúc qui trình RT-PCR, lấy sản phẩm điện di trên gel agarose 1,5 %, khi kết thúc điện di đem soi trên máy Dolphin-DOC và chụp ảnh. Kết quả điện di được thể hiện trên Hình 8.



Hình 8: Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR (~300bp) trên gel agarose 1,5 %

Qua Hình 8 cho thấy, sản phẩm RT-PCR xuất hiện một băng rõ nét, có độ dài khoảng 286 bp, đúng như dự kiến đoạn gen nhân lên của cặp môi DHAV-3F; DHAV-3R. Trong 7 mẫu huyền dịch virus từ môi trường tế bào được chạy qui trình RT-PCR, có 5 mẫu dương tính cặp môi DHAV-3F, DHAV-3R; chiếm (71,42%) và không có trường hợp nào dương tính với cặp môi DHAV-1F, DHAV-1R và DHAV-2F, DHAV-2R. Điều đó chứng tỏ virus viêm gan vịt được phát hiện từ các mẫu bệnh phẩm thu thập từ thực địa ở một số huyện thuộc tỉnh Hậu Giang là virus viêm gan vịt type 1, thuộc subtype 3 (DHAV-3).

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Kết quả phân lập các mẫu bệnh phẩm trên môi trường phôi trứng vịt lúc 14 ngày tuổi, gây chết phôi từ 48 đến 72 giờ, những phôi chết có biểu hiện bệnh tích rất điển hình của bệnh viêm gan vịt do virus. Khi phân lập trên môi trường tế bào đều thấy virus nhân lên và gây bệnh tích trên tế bào. Sau khi điện di sản phẩm RT-PCR cho thấy, virus phát hiện được từ những mẫu bệnh phẩm đã thu thập tại một số huyện thuộc tỉnh Hậu Giang đều là virus viêm gan vịt type 1, thuộc subtype 3 (DHAV-

3). Từ kết quả trên chúng tỏ rằng virus viêm gan vịt type 1, thuộc subtype 3 hiện đang lưu hành tại tỉnh Hậu Giang chiếm tỷ lệ rất cao (71,42%).

4.2 Đề xuất

Cần phân lập và định danh virus viêm gan vịt ở các địa phương thuộc khu vực Đồng bằng sông Cửu Long để đề ra phương pháp phòng và trị bệnh hiệu quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen.L.L, Q. Xu, R.H.Zhang, L.Yang, J.X.Li, Z.J.Xie, Y.L.Zhu, S.J.Jiang, X.K.Si, 2013. Improved duplex RT-PCR assay for differential diagnosis of mixed infection of duck hepatitis A virus type 1 and type 3 in ducklings. *Journal of Virological Methods* 192, 12-17.
2. Chou.C.H, Y.W.Ting, C.H.Tseng, Y.H.Dih, M.J.Pan, H.J.Tsai, 2013. Viral distribution and depress of body weight of a duck picornavirus in experimentally infected peking ducklings and serological survey among poultry species in Taiwan. *Vet J* 39 (2): 73-80.
3. Doyle A and J.B. Giffiths. (1998). Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology. Wiley, 57-61.
4. Hussain I and M.H. Rasool. (2005). Adaptation of an indigenous very virulent infectious bursal disease virus on Viro cell line. *Pakistan Veterinary Journal*, 25 (3): 103-106.
5. Jin X, W. Zhang, C. Gu, G. Cheng, X. Hu, 2008. Identification and molecular analysis of the highly pathogenic duck hepatitis virus type 1 in Hubei province of China. *Dec*: 85(3).
6. Kim M.C, Y.K. Kwon, S.J. Joh, A.M. Lindberg, J.H. Kwon, J.H. Kim, Kim S.J,2006. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus Parechovirus in the family *Picornaviridae*. *Virology* 3307-3316.
7. Levine. P. P, and J. Fabricant, 1950. A hitherto-undescribed virus disease of ducks in North America. *Cornell Vet.* 40:71-86.
8. Trần Minh Châu, Lê Thị Nông, Nguyễn Đức Tạo (1985). Thăm dò chế tạo vaccine viêm gan vịt và sử dụng. Kết quả nghiên cứu khoa học và kỹ thuật thú y (1985-1989). Viện thú y. NXB. Nông nghiệp Hà Nội, tr.41-45.
9. Tseng. C.H., N.J. Knowles, H.J. Tsai, 2007. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to new genus. *Virus Res*, 123, 190-203.
10. Tseng. C.H and H.J. Tsai, 2007. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus. *Virus Res.*, 126, 19-31.
11. Woolcock P.R, 1986. An assay for duck hepatitis virus type I in duck embryo liver cell and a comparison with other assay. *Avian Pathol*, 15, 75-82.