

SỰ ĐỒNG NHIỄM CỦA CIRCOVIRUS VÀ PARVOVIRUS Ở VỊT NUÔI TẠI HÀ NỘI NĂM 2021

Đồng Văn Hiếu, Lê Văn Phan, Đồng Thị Hồng Nhung, Lại Thị Lan Hương, Dương Văn Nhiệm, Vũ Thị Thu Trà, Lê Huỳnh Thanh Phương, Trần Thị Hương Giang
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Sự đồng nhiễm của duck circovirus (DuCV) và parvovirus có vai trò gây bệnh trong hội chứng rụt mỏ và còi cọc (beak atrophy and dwarfism syndrome – BADS) và rụng lông (feather shedding syndrome – FSS) ở vịt. Nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá tình hình đồng nhiễm cả hai loại virus này trên đàn vịt và bước đầu ứng dụng phương pháp duplex polymerase chain reaction (d-PCR) trong chẩn đoán. Tổng số 48 mẫu gộp phủ tạng được thu thập từ vịt có các biểu hiện lâm sàng như còi cọc, chậm lớn, tiêu chảy, và rụng lông nuôi tại một số trang trại thuộc các huyện Phú Xuyên, Ứng Hòa, Thường Tín và Gia Lâm từ tháng 4 đến tháng 7 năm 2021. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ mẫu dương tính với DuCV theo trang trại và theo cá thể lần lượt là 81,2% và 54,17%; với parvovirus là 45,45% và 27,08%; và với hai loại virus là 36,36% và 18,75%. Phương pháp d-PCR lần đầu được ứng dụng để chẩn đoán cùng lúc hai loại virus trong mẫu bệnh phẩm với độ nhạy và độ đặc hiệu là 100% so với phương pháp PCR đơn. Kết quả của nghiên cứu này góp phần bổ sung thông tin về tình hình nhiễm DuCV và/hoặc parvovirus ở vịt, làm cơ sở cho việc xây dựng các biện pháp chẩn đoán và phòng chống dịch bệnh trên đàn vịt.

Từ khóa: Vịt, circovirus, đồng nhiễm, parvovirus, Hà Nội.

Co-infection of circovirus and parvovirus in ducks farmed in Ha Noi, 2021

Dong Van Hieu, Le Van Phan, Dong Thi Hong Nhung, Lai Thi Lan Huong, Duong Van Nhim, Vu Thi Thu Tra, Le Huynh Thanh Phuong, Tran Thi Huong Giang

SUMMARY

Co-infection of duck circovirus (DuCV) and parvovirus plays an important role in beak atrophy and dwarfism syndrome (BADS) and feather shedding syndrome (FSS), causing economic loss in duck production. This research was conducted to evaluate co-infection of the two viruses in the duck flocks and utilize a duplex polymerase chain reaction (d-PCR) method in diagnosis. A total of 48 viscera pool tissue samples were collected from clinically suspected duck flocks and diseased ducks farmed in Phu Xuyen, Ung Hoa, Thuong Tin, and Gia Lam districts of Ha Noi during April to July 2021. The studied results indicated that the positive rates for the DuCV genome according to individual sample and farm levels were 81.82% and 54.17%, respectively; for the parvovirus genome were 45.45% and 27.08%, respectively; and for co-infection of the two viral genomes were 36.36% and 18.75%. d-PCR method was first optimized and utilized to detect both the DuCV and parvovirus genomes in the samples with a high sensitivity (100%) and specificity (100%), compared to single conventional PCR method. The finding of this study gains a better understanding of DuCV and/or parvovirus, leading to develop diagnostic methods and disease prevention strategies in duck farming.

Keywords: Duck, circovirus, co-infection, parvovirus, Ha Noi City.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Parvovirus thuộc nhóm các virus gây bệnh quan trọng đối với thủy cầm gồm có parvovirus gây bệnh ở ngỗng (Goose parvovirus – GPV), ở ngan (Muscovy duck parvovirus – MDPV) và ở vịt (Duck parvovirus – DPV) (Zadori *et al.*, 1995). Trong đó, MDPV thường gây bệnh với các biểu hiện rối loạn chức năng vận động, rối loạn tạo lông, còi cọc và tử vong ở ngan 3 tuần tuổi (Le Gall-Recule và Jestin, 1994). GPV có khả năng gây bệnh Derzsy (Derzsy's disease) chủ yếu ở vịt và ngan một tháng tuổi với tỷ lệ chết có thể lên tới 90% (Takehara *et al.*, 1995). Gần đây, các nghiên cứu đã mô tả về một nhóm biến chủng GPV mới (novel GPV - N-GPV) có vai trò quan trọng gây ra các ổ dịch liên quan tới hội chứng lùn và còi cọc (Short beak and dwarfism syndrome – SBDS) hay hội chứng rút mỏ và còi cọc (Beak atrophy and dwarfism syndrome – BADS) ở vịt nuôi tại Trung Quốc (Chen *et al.*, 2015; Ning *et al.*, 2017; Palya *et al.*, 2009). Vịt mắc bệnh do N-GPV có biểu hiện giảm tăng trọng, lưỡi và đuôi nhỏ hơn bình thường, và tỷ lệ mắc bệnh cao (Chen *et al.*, 2015).

Một yếu tố gây bệnh khác cũng gây ra các triệu chứng tương tự parvovirus trên vịt trong hội chứng SBDS là duck circovirus (DuCV). DuCV được báo cáo lần đầu tiên trên đàn vịt 6 tuần tuổi tại Đức năm 2003 (Soike *et al.*, 2004). DuCV sau đó được báo cáo tại một số quốc gia châu Âu, châu Mỹ và châu Á (Banda *et al.*, 2007; Cha *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2006; Fringuelli *et al.*, 2005; Julian *et al.*, 2013; Wan *et al.*, 2011). Vịt nhiễm DuCV có biểu hiện chậm lớn, rối loạn tạo lông, và còi cọc (Soike *et al.*, 2004). DuCV tấn công và phá hủy hệ thống miễn dịch, từ đó vịt dễ bị nhiễm kế phát các loại mầm bệnh kế phát khác như *Staphylococcus aureus* (Banda *et al.*, 2007), *Escherichia coli* và/hoặc virus gây bệnh viêm gan vịt (duck hepatitis virus) (Zhang *et al.*, 2009), *Riemerella anatipestifer* (Bùi Hữu Dũng *et al.*, 2016), hoặc N-GPV (Yang *et al.*, 2020). DuCV còn được ghi nhận là một nguyên nhân gây ra chứng viêm xơ cứng túi mật nguyên phát ở vịt (Zhu *et al.*, 2019). Bên cạnh đó, sự đồng

nh nhiễm 2 loại virus đã được báo cáo ở Trung Quốc năm 2015 - 2016 (Li *et al.*, 2018). Hai loại virus này còn được cho rằng có tác động hiệp đồng gây ra giảm tăng trọng, còi cọc ở vịt và gây ra những tổn thương ở cơ quan phủ tạng nặng hơn khi chỉ nhiễm 1 trong 2 virus (Liu *et al.*, 2020).

Parvovirus và DuCV ở vịt đã được ghi nhận và ảnh hưởng tới chăn nuôi vịt ở nhiều nước trên thế giới trong đó có Việt Nam (Bùi Hữu Dũng *et al.*, 2016; Nguyễn Thị Kim Oanh *et al.*, 2020; Nguyễn Thị Thanh Hải *et al.*, 2020; Nguyễn Văn Giáp *et al.*, 2020). Nguyễn Thị Kim Oanh và cs. (2020) đã phát triển phương pháp PCR để chẩn đoán bệnh gây ra do parvovirus ở một số tỉnh miền Bắc. Sáu mẫu bệnh phẩm từ vịt với các triệu chứng tiêu chảy, còi cọc nghi mắc bệnh do parvovirus. Kết quả sau đó đã xác định 5/6 mẫu dương tính với parvovirus bằng phản ứng PCR. Kết quả phân tích một phần gen mã hóa protein không cấu trúc (627 bp) và gen VP1 (225 bp) bước đầu kết luận, chủng gây bệnh trên đàn vịt tại tỉnh Hưng Yên là N-GPV. Trong khi đó, tỷ lệ dương tính với DuCV biến động từ 6,09% (39/640) tại Bắc Giang (Nguyễn Thị Thanh Hải *et al.*, 2020); 6,58% (5/76) tại một số tỉnh miền Nam (Bùi Hữu Dũng *et al.*, 2016). Tới nay, chưa có nghiên cứu nào ở Việt Nam đề cập tới sự đồng nhiễm của cả hai loại virus này trên vịt. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích phát hiện sự có mặt đồng thời của parvovirus và DuCV, và bước đầu ứng dụng phương pháp d-PCR để xác định sự đồng nhiễm của 2 loại virus này ở vịt nuôi tại Hà Nội. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở khoa học hữu ích cho việc phát triển phương pháp chẩn đoán và biện pháp phòng các bệnh do parvovirus và DuCV ở vịt.

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

2.1. Nội dung

- Xác định DuCV hoặc/và parvovirus bằng phương pháp PCR trong mẫu bệnh phẩm vịt nuôi tại một số huyện trên địa bàn Hà Nội

- Bước đầu ứng dụng kỹ thuật duplex PCR (d-PCR) trong chẩn đoán DuCV hoặc/và parvovirus gây bệnh ở vịt.

2.2. Vật liệu

Tổng số 48 mẫu gộp phủ tạng gồm não, tim, phổi, gan, lách, thận, và túi Fabricius được thu thập từ 48 vịt 2 - 7 tuần tuổi tại các huyện Thường Tín, Ứng Hòa, Phú Xuyên và Gia Lâm thuộc Hà Nội trong thời gian từ tháng 4 tới tháng 7 năm 2021. Tất cả các trang trại trong nghiên cứu này đều không sử dụng vắc xin phòng bệnh do DuCV và parvovirus. Mẫu được thu thập từ vịt với các biểu hiện bệnh như còi cọc, chậm lớn so với các con khác trong đàn, ủ rũ, bỏ ăn, rụng lông vùng cổ. Mẫu sau khi thu thập được xử lý tại Bộ môn Thú y cộng đồng, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Địa điểm nghiên cứu: Nghiên cứu này được thực hiện tại Bộ môn Thú y cộng đồng và Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ sinh học thú y, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thu thập và xử lý mẫu

Tổng số 48 vịt từ 11 trang trại thuộc các huyện Phú Xuyên, Ứng Hòa, Thường Tín, Gia Lâm được lựa chọn ngẫu nhiên trên địa bàn thành phố Hà Nội. Bệnh phẩm là mẫu gộp phủ tạng (não, tim, phổi, lách, ruột, và túi Fabricius) được thu thập theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 01-83:2011. Mẫu bệnh phẩm sau đó được đồng nhất theo tỷ lệ 10% phosphate-buffered saline (PBS). Hỗn dịch đồng nhất được bảo quản ở -80 °C tới khi sử dụng.

2.3.2. Tách DNA và phản ứng PCR đơn xác định DuCV hoặc parvovirus

DNA tổng số trong mẫu đã được đồng nhất được chiết tách sử dụng kit thương mại Viral Genespin™ Viral DNA/RNA Extraction (Intron, Hàn Quốc). Quy trình tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA tổng số được hòa tan trong 50 µl và được bảo quản ở -30 °C cho tới khi sử dụng.

Các cặp mồi DuCV-3F/3R và PV-4F/4R (bảng 1) được sử dụng cho phản ứng PCR xác định DuCV và parvovirus genome trong mẫu bệnh phẩm được công bố trước đây (Fringuelli *et al.*, 2005; Zadori *et al.*, 1995).

Bảng 1. Thông tin các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự (5' – 3')	Sản phẩm PCR (bp)	Tài liệu tham khảo
DuCV-3F	CCC GCCGAA AACAAG TATTA	230	Fringuelli <i>et al.</i> (2005)
DuCV-3R	TCGCTCTTG TACCAATCACG		
PV-4F	CCAAGCTACAACAACCACAT	539	Zadori <i>et al.</i> (1995)
PV-4R	TGAGCGAACATGCTATGGAAGG		

Phản ứng PCR được thiết lập để khuếch đại sản phẩm PCR của DuCV có độ lớn 230 bp. 25 µl hỗn dịch phản ứng gồm có 12,5 µl GoTag® Green Master Mix (Promega, Mỹ); 1 µl mỗi loại mồi xuôi và mồi ngược (10 µM) (bảng 1); 8,5 µl nước tinh khiết và 2 µl DNA khuôn mẫu. Phản ứng PCR được thực hiện ở điều kiện 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ gồm 95°C trong 30 giây, 45°C (đối với cặp mồi DuCV-3F/3R) hoặc 55°C (đối với cặp mồi PV-4R/4R) trong 30 giây, 72°C trong 30 giây, và hoàn tất phản ứng ở 72°C trong 10 phút. Sản

phẩm PCR được điện di trên thạch 1% agarose có bổ sung thuốc nhuộm RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (Intron, Hàn Quốc). Do đây là nghiên cứu tương đối mới đối với nhóm tác giả, vì vậy mà không có đối chứng dương của DuCV và parvovirus nên nghiên cứu phải áp dụng phương pháp chạy PCR mù và xác định kết quả dương tính DuCV hoặc parvovirus bằng phương pháp giải trình tự sản phẩm PCR có được. DNA từ sản phẩm giải trình tự được sử dụng để làm đối chứng dương trong các phản ứng PCR kế tiếp. Sản phẩm

PCR sau đó được xác nhận bằng phương pháp giải trình tự gen. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit thương mại QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Mỹ) và gửi tới 1st BASE (Singapore) để giải trình tự gen. Loại parvovirus được xác định bằng phương pháp BLAST trên GenBank.

2.3.3. Tiến hành phản ứng duplex PCR (d-PCR)

Các mẫu dương tính và âm tính với DuCV hoặc/

và parvovirus bằng phản ứng PCR đơn được sử dụng cho việc bước đầu thiết lập và ứng dụng phản ứng d-PCR trong chẩn đoán 2 loại virus này ở vịt.

Thành phần phản ứng d-PCR (bảng 2) dùng để tối ưu hóa chu trình nhiệt với quy trình như sau: 94°C trong 5 phút; theo sau là 35 chu kỳ gồm 94°C trong 45 giây, 45°C - 55°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây; và kết thúc phản ứng ở 72°C trong 10 phút.

Bảng 2. Thành phần và hàm lượng của phản ứng d-PCR

STT	Thành phần phản ứng	Nồng độ cuối (pM)	Hàm lượng (μl)
1	GoTag® Green Master Mix		10
2	DuCV-3F	0,25	1
3	DuCV-3R	0,25	1
4	PV-4F	0,25	1
5	PV-4R	0,25	1
6	Nước tinh khiết (DW)		6
7	DNA		2*
Tổng			20

Ghi chú: Hàm lượng DNA tối thiểu được sử dụng là 250 nanogram/20μl hỗn dịch phản ứng được xác định bằng phương pháp quang phổ bằng máy SpectraMax® QuickDrop™ (Molecular Devices, LLC., California, Mỹ).

2.3.4. Xử lý số liệu

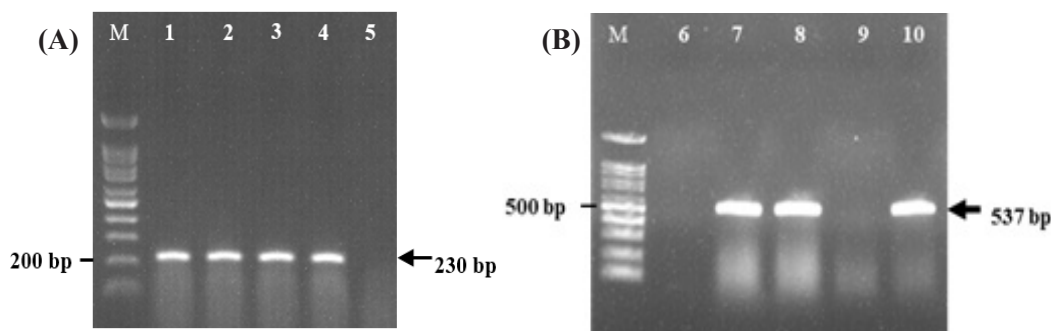
Độ nhạy, độ đặc hiệu và hệ số Kappa của phương pháp d-PCR so với phản ứng PCR đơn được xác định theo phương pháp đã được mô tả trước đây (Altman và Bland, 1994; Feuerman và Miller, 2008).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định DuCV và/hoặc parvovirus genome bằng phản ứng PCR

Phản ứng PCR được tiến hành với một số mẫu bệnh phẩm thu thập tại thực địa cho thấy, sản phẩm PCR được khuếch đại chỉ có duy nhất 1 vạch có kích thước bằng 230 bp, trong khi đó giếng đối chứng âm chỉ bổ sung nước tinh khiết không xuất hiện vạch (hình 1A và

1B). Như vậy, có thể sử dụng cặp mồi DuCV-3F/3R để xác định DuCV genome trong mẫu bệnh phẩm tại Việt Nam như nghiên cứu trước đó đã xác định được sự lưu hành của DuCV trên vịt ở một số tỉnh phía Nam (Bùi Hữu Dũng *et al.*, 2016). Tương tự như vậy, phản ứng PCR cũng được thiết lập để khuếch đại sản phẩm có kích thước bằng 539 bp khi sử dụng cặp mồi PV-4R/4R để xác định parvovirus genome trong mẫu bệnh phẩm. Kết quả ở hình 1B cho thấy, sản phẩm PCR với mẫu dương tính chỉ có duy nhất một vạch, trong khi đó mẫu đối chứng âm thì không. Các mẫu dương tính với DuCV và parvovirus đều được xác định bằng phương pháp giải trình tự gen. Kết quả BLAST (không thể hiện) cho thấy các parvovirus gây bệnh thuộc nhóm GPV.



Hình 1. Minh họa kết quả PCR phát hiện (A) DuCV và (B) parvovirus ở vịt

Ghi chú: M là thang ADN chuẩn với khoảng cách giữa các vạch là 100 bp, các mẫu thực địa được bố trí từ giếng 1 đến giếng 4, 7 đến 10, mẫu đối chứng âm chỉ bổ sung nước tinh khiết được bố trí ở giếng số 5 và 6. Vạch sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước 230 và 537 bp được đánh dấu bằng mũi tên màu đen.

Tỷ lệ mẫu dương tính với DuCV và/hoặc parvovirus được xác định bằng phản ứng PCR đơn (bảng 3). Cụ thể, tỷ lệ dương tính với DuCV ở các huyện thuộc Hà Nội dao động từ 30,77% (Thường Tín) đến 69,23% (Phú Xuyên); trong khi tỷ lệ dương tính với parvovirus dao động từ 0% (Ứng Hòa) đến 46,15% (Phú Xuyên). Tỷ lệ dương tính chung với DuCV và parvovirus

lần lượt là 54,17% và 27,08%. Nghiên cứu về sự đồng nhiễm của 2 loại virus này cho thấy, tỷ lệ mẫu dương tính với cả hai loại virus cao nhất ở huyện Phú Xuyên (6/13; 46,15%), tiếp đến là huyện Gia Lâm (2/10, 20%), Thường Tín (1/13; 7,69%), và Ứng Hòa (0/12, 0%). Tỷ lệ mẫu dương tính với cả hai loại virus tính chung là 18,75% (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả xác định DuCV hoặc/và parvovirus ở vịt theo địa điểm lấy mẫu tại Hà Nội bằng phản ứng PCR đơn

Địa phương	Số mẫu kiểm tra	DuCV		Parvovirus		DuCV + Parvovirus	
		Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Phú Xuyên	13	9	69,23	6	46,15	6	46,15
Ứng Hòa	12	9	75	0	0	0	0
Thường Tín	13	4	30,77	4	30,77	1	7,69
Gia Lâm	10	4	40	3	30	2	20
Tổng	48	26	54,17	13	27,08	9	18,75

Tỷ lệ dương tính theo trang trại cũng được đề cập trong nghiên cứu này (bảng 4). Kết quả cho thấy, có 9/11 (81,82%) trang trại dương tính với DuCV, 5/11 (45,45%) trang trại dương tính với parvovirus, và 4/11 (36,36%) trang trại có vịt dương tính với cả DuCV và parvovirus.

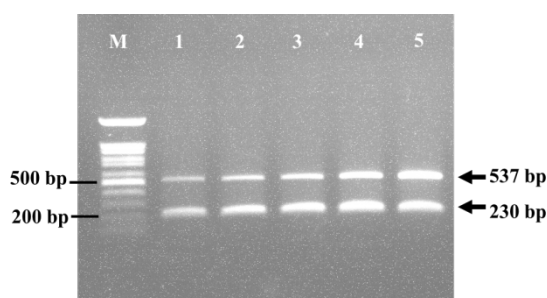
Tỷ lệ mẫu đồng nhiễm DuCV và parvovirus theo trang trại cao nhất được ghi nhận tại huyện Phú Xuyên (2/3; 66,67%), kế đến là Thường Tín (1/3; 33,33%) và Gia Lâm (1/1; 33,33%), và không ghi nhận tại huyện Ứng Hòa (0%) (bảng 4).

Bảng 4. Kết quả xác định DuCV hoặc/và parvovirus ở vịt theo trang trại tại Hà Nội

Địa phương	Số trại kiểm tra	DuCV		Parvovirus		DuCV + Parvovirus	
		Số trại dương tính	Tỷ lệ (%)	Số trại dương tính	Tỷ lệ (%)	Số trại dương tính	Tỷ lệ (%)
Phú Xuyên	3	2	66,67	2	66,67	2	66,67
Ứng Hòa	2	2	100	0	0	0	0
Thường Tín	3	3	100	2	66,67	1	33,33
Gia Lâm	3	2	66,67	1	33,33	1	33,33
Tổng	11	9	81,82	5	45,45	4	36,36

3.2. Kết quả bước đầu ứng dụng kỹ thuật duplex PCR (d-PCR) trong chẩn đoán DuCV hoặc/và parvovirus gây bệnh ở vịt

Để thiết lập phản ứng d-PCR phát hiện DuCV và/hoặc parvovirus, các mẫu dương tính với DuCV và/hoặc parvovirus ở mục 3.1 được sử dụng. Do nhiệt độ gắn mỗi của 2 cặp mồi DuCV-3F/3R và PV-4F/4R tương đối khác nhau lần lượt là 45°C và 55°C. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành tối ưu hóa chu trình nhiệt bằng cách sử dụng một dãy nhiệt từ 45°C tới 55°C. Kết quả phân tích điện di sản phẩm cho thấy, cả hai cặp mồi đều cho vạch PCR rõ nét ở nhiệt độ gắn mỗi là 55°C (hình 2).

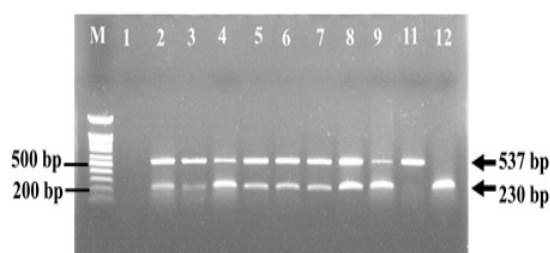


Hình 2. Minh họa tối ưu hóa nhiệt độ gắn mồi cho phản ứng d-PCR

Ghi chú: M là thang ADN chuẩn với khoảng cách giữa các vạch là 100 bp. Mẫu thực địa được bố trí theo thang nhiệt gắn mồi của phản ứng d-PCR ở các giếng 1, 2, 3, 4, và 5 lần lượt là 45°C; 45,9°C; 51,8°C; 54,3°C và 55°C.

Kết quả của phản ứng d-PCR được minh họa ở hình 3 cho thấy, các mẫu thực địa được bố trí

từ giếng 2 tới 9 cho 2 vạch đặc hiệu sáng rõ, biểu thị dương tính với cả DuCV và parvovirus, giếng 11 và 12 chỉ dương tính với parvovirus hoặc DuCV, trong khi giếng 1 đối chứng âm không xuất hiện vạch. Phản ứng d-PCR bước đầu cho thấy hiệu quả trong chẩn đoán DuCV và/hoặc parvovirus trong mẫu bệnh phẩm thu thập được (hình 3).



Hình 3. Minh họa kết quả d-PCR phát hiện DuCV và/hoặc parvovirus trong mẫu bệnh phẩm từ vịt tại thực địa

Ghi chú: M là thang ADN chuẩn với khoảng cách giữa các vạch là 100 bp, các mẫu thực địa được bố trí từ giếng 2 đến giếng 12, mẫu đối chứng chỉ bổ sung nước tinh khiết được bố trí ở giếng số 1. Vạch sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước 230 bp và/hoặc 537 bp được đánh dấu bằng mũi tên màu đen.

Độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng d-PCR so với PCR đơn được xác định dựa trên đánh giá trực tiếp 48 mẫu thực địa. Các mẫu này đã được xác định dương tính với DuCV (26), parvovirus (13), và đồng nhiễm DuCV + parvovirus (9) (kết quả được trình bày ở phần 3.1). Kết quả phân tích cho thấy, phản ứng

d-PCR có độ nhạy và độ đặc hiệu đều là 100% so với phản ứng PCR đơn. Thêm vào đó, hệ số đồng thuận Kappa đo được là 1 (bảng 5)

khi sử dụng d-PCR và PCR đơn để phát hiện sự đồng nhiễm DuCV + parvovirus trong mẫu bệnh phẩm từ vịt.

Bảng 5. Độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng d-PCR so với PCR đơn

d-PCR	PCR đơn						
	DuCV		Parvovirus		DuCV + Parvovirus		
	Số mẫu +	Số mẫu -	Số mẫu +	Số mẫu -	Số mẫu +/+	Số mẫu -/-	
Số mẫu +	26	0	13	0	9	0	Giá trị dự đoán dương: 100%
Số mẫu -/-	0	22	0	5	0	39	Giá trị dự đoán âm: 100%
	Độ nhạy 100%	Độ đặc hiệu 100%	Độ nhạy 100%	Độ đặc hiệu 100%	Độ nhạy 100%	Độ đặc hiệu 100%	
Kappa = 1							

Ghi chú: “+”: dương tính, “+/-”: dương tính với DuCV và parvovirus, “-”: âm tính, “-/-”: âm tính với DuCV hoặc/và parvovirus

Từ kết quả của nghiên cứu này thấy rằng, phản ứng d-PCR có thể sử dụng để phát hiện DuCV hoặc/và parvovirus trong mẫu bệnh phẩm của vịt nghi mắc bệnh với độ nhạy và độ đặc hiệu tuyệt đối so với phản ứng PCR. Hơn thế nữa, phản ứng d-PCR có ưu thế về mặt thời gian và tính kinh tế hơn phản ứng PCR đơn. Đây là nghiên cứu bước đầu về ứng dụng phản ứng d-PCR phát hiện sự đồng nhiễm hai loại virus DuCV và parvovirus. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chưa thiết lập được giới hạn nhận biết của d-PCR do những khó khăn về phân lập và xác định hiệu giá của DuCV. Chính vì vậy, để xác định giới hạn nhận biết của phương pháp d-PCR, kỹ thuật plasmid tái tổ hợp sẽ được sử dụng trong những nghiên cứu tiếp theo để hoàn thiện quy trình chẩn đoán hai loại virus này cùng lúc trong mẫu bệnh phẩm.

Những hiểu biết về tình hình nhiễm của DuCV hoặc parvovirus là cần thiết do khả năng gây bệnh và ảnh hưởng tới năng suất chăn nuôi. Những nghiên cứu về DuCV cho thấy, tỷ lệ nhiễm DuCV trên vịt đã được báo cáo với những số liệu khác nhau ở nhiều quốc gia như tỷ lệ cao ở Hungary chiếm 84% (Fringuelli *et al.*, 2005), ở Trung Quốc và Hàn Quốc lần lượt là 33,29% và 21,8% (Cha *et al.*, 2013; Wan

et al., 2011) và ở Mỹ là 6,06% (Banda *et al.*, 2007). Tỷ lệ dương tính với DuCV trong nghiên cứu hiện tại theo cá thể là 54,17%; cao hơn so với các tỷ lệ nhiễm DuCV ở một số tỉnh miền Nam (6,58%) và ở Bắc Giang (6,09%) (Bùi Hữu Dũng *et al.*, 2016; Nguyễn Thị Thanh Hải *et al.*, 2020). Nguyên nhân của sự khác biệt này có thể là do phương pháp lấy mẫu và dung lượng mẫu. Trong nghiên cứu này, các mẫu được lấy từ các trang trại được báo cáo tăng tỷ lệ chết, vịt có biểu hiện còi cọc, chậm lớn, tiêu chảy, rụng lông vùng cổ. Việc mở rộng vùng lấy mẫu và tăng dung lượng mẫu là cần thiết để có cái nhìn khái quát hơn về tỷ lệ nhiễm DuCV. Đối với parvovirus, những nghiên cứu ban đầu về xác định sự hiện diện của virus gây bệnh này được báo cáo năm 2020 (Nguyễn Thị Kim Oanh *et al.*, 2020; Nguyễn Văn Giáp *et al.*, 2020; Trần Đức Hoàn *et al.*, 2020). Nguyễn Văn Giáp và cs. (2020) đã ghi nhận một số ổ dịch vịt mắc bệnh gây ra do parvovirus ở tỉnh Hưng Yên. Kết quả phân tích sau đó chỉ ra vai trò gây bệnh của nhóm biến chủng của parvovirus gây bệnh ở ngỗng (Nguyễn Văn Giáp *et al.*, 2020). Tỷ lệ dương tính với parvovirus trong nghiên cứu này (27,08%) thấp hơn so với báo cáo trước đây của Trần Đức Hoàn và cs. (2020).

N-GPV có vai trò quan trọng trong hội chứng BADS được ghi nhận lần đầu tiên ở Trung Quốc năm 2015 (Chen *et al.*, 2015). Năm 2017, sự xuất hiện của các triệu chứng rụng lông rất phổ biến ở các đàn vịt mắc hội chứng BADS được ghi nhận ở miền Đông Trung Quốc (Yang *et al.*, 2020). Hội chứng rụng lông (feather shedding syndrome – FSS) được báo cáo lần đầu năm 2017, vịt mắc hội chứng này với tỷ lệ dao động trong khoảng 20 – 70%, tỷ lệ tử vong là 40%. DuCV và parvovirus được báo cáo là giữ vai trò quan trọng trong hội chứng FSS (Yang *et al.*, 2020). Ở nghiên cứu hiện tại, tỷ lệ đồng nhiễm 2 loại virus trên vịt là 18,75%; thấp hơn nhiều so với tỷ lệ được báo cáo ở Trung Quốc năm 2015 – 2016 (108/170; 63,53%) (Li *et al.*, 2018). Ở vịt gây nhiễm thực nghiệm, 2 loại virus có tác động hiệp đồng gây ra giảm tăng trọng và còi cọc ở vịt. Hơn thế nữa, các bệnh tích ở gan, lách, túi Fabricius, tủy xương, và tuyến ức đều có xu hướng tăng nặng ở vịt đồng nhiễm cả 2 loại virus hơn là chỉ nhiễm một loại virus (Liu *et al.*, 2020). Nghiên cứu về tác động hiệp đồng gây bệnh của DuCV và parvovirus ở vịt cần được chú ý nghiên cứu ở Việt Nam.

Cả DuCV và parvovirus đã được xác định có khả năng gây bệnh và gây ra những thiệt hại kinh tế cho ngành chăn nuôi vịt ở nước ta (Bùi Hữu Dũng *et al.*, 2016; Nguyễn Thị Kim Oanh *et al.*, 2020; Nguyễn Thị Thanh Hải *et al.*, 2020; Nguyễn Văn Giáp *et al.*, 2020; Trần Đức Hoàn *et al.*, 2020). Chính vì vậy, việc thiết lập và ứng dụng các phương pháp chẩn đoán vừa yêu cầu chính xác, nhanh, và tiết kiệm trở nên cấp thiết hiện nay. Phản ứng đa mồi multiplex PCR đã được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi để xác định cùng lúc 6 – 7 virus gây bệnh ở vịt (Wang *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2019). Ở nghiên cứu hiện tại, chúng tôi đã lần đầu thiết lập phản ứng d-PCR để chẩn đoán cùng lúc 2 loại virus gồm DuCV và parvovirus trong mẫu bệnh phẩm của vịt. Đánh giá sơ bộ trên các mẫu thực địa cho thấy, phản ứng d-PCR có độ nhạy và độ đặc hiệu đều là 100% với giá trị đồng thuận Kappa lý tưởng là 1. Phản ứng d-PCR có ưu thế giúp tiết kiệm thời gian và tính kinh tế cao hơn phản ứng PCR đơn. Chính vì vậy, các nghiên cứu tiếp theo cần tập trung đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu dựa trên dung lượng mẫu thực địa lớn hơn.

IV. KẾT LUẬN

Tỷ lệ dương tính theo cá thể với DuCV (54,17%), parvovirus (27,08%), và đồng nhiễm cả 2 loại virus (18,75%) đã được xác định ở nghiên cứu này. Trong khi đó, tỷ lệ dương tính theo trang trại với DuCV, parvovirus và với cả 2 loại virus này lần lượt là 81,82%; 45,45% và 36,36%.

Nghiên cứu này bước đầu ứng dụng phản ứng d-PCR chẩn đoán cùng lúc DuCV và parvovirus trên vịt với độ nhạy và độ đặc hiệu đều đạt 100% so với phương pháp PCR đơn.

Lời cảm ơn: Tập thể tác giả xin chân thành cảm ơn dự án Việt – Bỉ năm 2021 đã tài trợ nguồn kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Altman D. G., and Bland J. M., 1994. Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *BMJ*, 308: 1552.
- Banda A., Galloway-Haskins R. I., Sandhu T. S., and Schat K. A., 2007. Genetic analysis of a duck circovirus detected in commercial Pekin ducks in New York. *Avian Dis*, 51 (1): 90–95.
- Bùi Hữu Dũng, Đỗ Tiến Duy, Nguyễn Tất Toàn, Nguyễn Thị Thu Năm, Lê Thanh Hiền, and Nguyễn Thị Phước Ninh, 2016. Xác định sự hiện diện của Duck circovirus và *Riemerella anatipestifer* từ các ca bệnh bại huyết trên vịt bằng kỹ thuật PCR. *Khoa học kỹ thuật thú y XXIII*: 14–21.
- Cha S. Y., Kang M., Cho J. G., and Jang H. K., 2013. Genetic analysis of duck circovirus in Pekin ducks from South Korea. *Poult Sci*, 92 (11): 2886–2891.
- Chen C. L., Wang P. X., Lee M. S., Shien J. H., Shien H. K., Ou S. J., Chen C. H., and Chang P. C., 2006. Development of a polymerase chain reaction procedure for detection and differentiation of duck and goose circovirus. *Avian Dis*, 50 (1): 92–95.
- Chen H., Dou Y., Tang Y., Zhang Z., Zheng X., Niu X., Yang J., Yu X., and Diao Y., 2015. Isolation and Genomic Characterization of a Duck-Origin GPV-Related parvovirus from Cherry Valley Ducklings in China. *PLoS One*, 10: e0140284.
- Feuerman M., and Miller A. R., 2008. Relationships between statistical measures of agreement: sensitivity, specificity and kappa. *J Eval Clin Pract*, 14: 930–933.

8. Fringuelli E., Scott A. N., Beckett A., McKillen J., Smyth J. A., Palya V., Glavits R., Ivanics E., Mankertz A., Franciosini M. P., and Todd D., 2005. Diagnosis of duck circovirus infections by conventional and real-time polymerase chain reaction tests. *Avian Pathol*, 34 (6): 495–500.
 9. Julian L., Piasecki T., Chrzastek K., Walters M., Muhire B., Harkins G. W., Martin D. P., and A. V., 2013. Extensive recombination detected among beak and feather disease virus isolates from breeding facilities in Poland. *J Gen Virol*, 94 (Pt 5): 1086–1095.
 10. Le Gall-Recule G., and Jestin V., 1994. Biochemical and genomic characterization of muscovy duck parvovirus. *Arch Virol*, 139: 121–131.
 11. Li P., Li J., Zhang R., Chen J., Wang W., Lan J., Xie X., and Jiang S., 2018. Duck «beak atrophy and dwarfism syndrome» disease complex: Interplay of novel goose parvovirus-related virus and duck circovirus? *Transbound Emerg Dis*, 65: 345–351.
 12. Liu J., Yang X., Hao X., Feng Y., Zhang Y., and Cheng Z., 2020. Effect of goose parvovirus and duck circovirus coinfection in ducks. *J Vet Res*, 64: 355–361.
 13. Ning K., Wang M., Qu S., Lv J., Yang L., and Zhang D., 2017. Pathogenicity of Pekin duck- and goose-origin parvoviruses in Pekin ducklings. *Vet Microbiol*, 210: 17–23.
 14. Nguyễn Thị Kim Oanh, Vũ Thị Lan Hương, Nguyễn Đăng Thọ, Đàm Thị Vui, Hà Thị Hoa, Đào Kim Liên, Nguyễn Thị Nga, and Trịnh Đăng Quyết, 2020. Ứng dụng PCR chẩn đoán parvovirus gây bệnh ở thủy cầm tại một số tỉnh miền bắc Việt Nam. *Khoa học kỹ thuật thú y*, XXVII: 20–27.
 15. Nguyễn Thị Thanh Hải, Trần Đức Hoàn, Nguyễn Việt Dũng, Đoàn Thị Thảo, Bùi Thị Thương, Trịnh Xuân Đức, Trần Văn Sơn, and Nguyễn Thị Loan, 2020. Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học phân tử và sự lưu hành của virus Circo (DuCV) trên đàn vịt tại tỉnh Bắc Giang. *J Vet sci and tech*, 2: 20.
 16. Nguyễn Văn Giáp, Đặng Hữu Anh, Cao Thị Bích Phượng, Nguyễn Thị Bích, Nguyễn Hữu Huân, and Huỳnh Thị Mỹ Lệ, 2020. Kết quả bước đầu phát hiện parvovirus gây bệnh ở vịt tại Hưng yên năm 2019. *Vietnam J Agri Sci*, 17: 816–825
 17. Palya V., Zolnai A., Benyeda Z., Kovacs E., Kardi V., and Mato T., 2009. Short beak and dwarfism syndrome of mule duck is caused by a distinct lineage of goose parvovirus. *Avian Pathol*, 38: 175–180.
 18. Soike D., Albrecht K., Hattermann K., Schmitt C., and Mankertz A., 2004. Novel circovirus in mulard ducks with developmental and feathering disorders. *Vet Rec*, 154 (25): 792–793.
 19. Takehara K., Nishio T., Hayashi Y., Kanda J., Sasaki M., Abe N., Hiraizumi M., Saito S., Yamada T., Haritani M., and *et al.*, 1995. An outbreak of goose parvovirus infection in Japan. *J Vet Med Sci*, 57: 777–779.
 20. Trần Đức Hoàn, Đoàn Thị Thảo, and Bùi Thị Thương, 2020. Đặc điểm dịch tễ học, lâm sàng bệnh lý và bệnh tích đại thể bệnh Derzsy's ở vịt do parvovirus gây ra ở một số tỉnh phía Bắc, Việt Nam. *Khoa học kỹ thuật thú y*, XXVII: 24–32.
 21. Wan C. H., Fu G. H., Shi S. H., Cheng L. F., Chen H. M., Peng C. X., Lin S., and Huang Y., 2011. Epidemiological investigation and genome analysis of duck circovirus in Southern China. *Virol Sin*, 26 (5): 289–296.
 22. Wang Y., Zhu Z., Hong W., Wang A., and Zuo W., 2017. A multiplex PCR for detection of six viruses in ducks. *J Virol Methods*, 48: 172–176.
 23. Yang Y., Sui N., Zhang R., Lan J., Li P., Lian C., Li H., Xie Z., and Jiang S., 2020. Coinfection of novel goose parvovirus-associated virus and duck circovirus in feather sacs of Cherry Valley ducks with feather shedding syndrome. *Poult Sci*, 99 (9): 4227–4234.
 24. Yao M., Zhang X., Gao Y., Song S., Xu D., and Yan L., 2019. Development and application of multiplex PCR method for simultaneous detection of seven viruses in ducks. *BMC Vet Res*, 15: 103.
 25. Zadori Z., Stefancsik R., Rauch T., and Kisary J., 1995. Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2. *Virology*, 212: 562–573.
 26. Zhang X., Jiang S., Wu J., Zhao Q., Sun Y., Kong Y., Li X., Yao M., and Chai T., 2009. An investigation of duck circovirus and co-infection in Cherry Valley ducks in Shandong Province, China. *Vet Microbiol*, 133 (3): 252–256.
 27. Zhu D., Zhou D., Liu J., Hao X., and Cheng Z., 2019. Duck circovirus induces a new pathogenetic characteristic, primary sclerosing cholangitis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 63: 31–36.
- Ngày nhận 21-9-2021
 Ngày phản biện 23-10-2021
 Ngày đăng 1-5-2022