

PHÂN LẬP, ĐỊNH SEROTYPE VIRUT VIÊM PHẾ QUẢN TRUYỀN NHIỄM TỪ GÀ THỊT

Võ Thị Trà An¹, Nguyễn Thị Kim Yến¹ và Hồ Hoàng Dũng²

TÓM TẮT

Viêm phế quản truyền nhiễm (*Infectious bronchitis*, IB) là bệnh truyền nhiễm cấp tính, tốc độ lây lan cao và gây thiệt hại cho ngành chăn nuôi gà công nghiệp. Nghiên cứu này đã phân lập virus IB từ 100 mẫu bệnh tích khí quản sung huyết hoặc có nhiều dịch nhầy ở tại các trại gà công nghiệp tỉnh Lâm Đồng qua phương pháp tiêm xoang niệu mô. Kết quả cho thấy có 54% mẫu cho bệnh tích phổi lùn, một bệnh tích khá đặc trưng cho sự hiện diện của virus này. 54 mẫu dịch xoang niệu mô được sử dụng để thực hiện RT-PCR, phát hiện 9 mẫu dương tính với gene S của virus IB. Giải trình tự gene cho thấy 4 mẫu trong tương đồng với serotype 793B dòng 4/91 và 1 mẫu tương đồng với serotype Mass dòng H120. Kết quả của nghiên cứu này đã xác định sự lưu hành dòng virus IB phổ biến và làm cơ sở cho các nghiên cứu dịch tễ, sự biến đổi (tiến hóa) của virus tại Việt nam.

Từ khóa: Gà thịt, Viêm phế quản truyền nhiễm, Phân lập virus, Định serotyp

Isolation and serotyping the IB virus from broiler

Vo Thi Tra An, Nguyen Thi Kim Yen and Ho Hoang Dung

SUMMARY

Infectious bronchitis (IB) is an acute and highly contagious respiratory disease of chickens and causes remarkable loss in the intensive poultry production. This study has isolated IB virus from 100 congestive or mucus tracheas at broiler farms in Lam Dong province using inoculation of allantoic cavity of embryonic eggs. The results showed that lesions such as stunting (dwarfing) and curling of the embryo and its feet have been found in 54% infected embryos. These lesions are typical for the presence of this virus. 54 field isolates from allantoic fluid were used for RT-PCR and were detected 9 positive for S gene of IB virus. Nucleotide sequencing determined that 4 isolates were 88% identity to serotype 793B strain 4/91 and 1 isolate was 98% identity to serotype Mass strain H120. Therefore, this study has indicated the presence of IB serotypes in Lam Dong and is the basis of researches on IB epidemiology and its alternation in Vietnam.

Key words : Broiler, Infectious bronchitis (IB), Virus isolation, Serotyping

I. GIỚI THIỆU

Viêm phế quản truyền nhiễm (*Infectious bronchitis*, IB) là một trong những bệnh gây thiệt hại kinh tế lớn trong chăn nuôi gà công nghiệp. Đây là bệnh truyền nhiễm cấp tính, tốc độ lây lan cao, với tỷ lệ bệnh có thể lên đến 80% tổng đàn mặc dù tỷ lệ chết thấp 20% (Gelb và ctv, 1991). Trên gà thịt, bệnh không những làm giảm tăng trọng, tăng hệ số tiêu tốn thức ăn và chi phí thuốc thú y mà còn tạo điều kiện cho các bệnh khác phát triển. Trên gà đẻ sản lượng trứng cũng như chất lượng trứng sẽ giảm nếu đàn gà mắc bệnh này. Tỷ lệ đẻ giảm có thể lên tới 50% và sau đó khả năng phục hồi không hoàn toàn chỉ đạt 70 - 80% so với ban đầu (Nguyễn Thị Phước Ninh, 2008). Một đặc điểm đáng lưu ý nữa là virus gây bệnh này có nhiều serotype, biến đổi liên tục và một số serotype không tạo miễn dịch chéo với nhau (Roussan và ctv, 2008) gây khó khăn cho công tác kiểm soát bệnh. Do đó, phân lập và định danh serotype gây bệnh IB từ gà không chỉ là bước đầu tiên trong việc xác định sự lưu hành dòng virus gây bệnh mà còn làm cơ sở cho các nghiên cứu dịch tễ, sự tiến hóa của virus... để tìm ra giải pháp tốt cho chiến lược phòng và khống chế căn bệnh này.

¹Khoa Chăn nuôi Thú y, Đại học Nông Lâm TP. HCM

²Công ty Cargill Việt Nam

Chúng tôi đã tiến hành đề tài nghiên cứu “Phân lập, định serotype virus viêm phế quản truyền nhiễm từ gà thịt” của các trại chăn nuôi tỉnh Lâm Đồng.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Lấy mẫu bệnh phẩm từ những đàn gà có triệu chứng hô hấp

Tổng cộng 100 mẫu bệnh phẩm được lấy từ khí quản của 100 trại gà thịt. Mỗi mẫu bệnh phẩm thu thập từ 5 con gà ở 1 - 45 ngày tuổi có triệu chứng bệnh hô hấp như thở khó, há miệng vươn cổ thở, âm rale khí quản, chảy nước mũi; hoặc/và có tiêu chảy phân trắng nhiều nước trong vòng 7 ngày đầu khi bắt đầu bệnh (chỉ lấy mẫu những gà bệnh không chủng ngừa vaccine IB hoặc đã chủng ngừa trước đó 21 ngày). Mẫu bệnh phẩm là một đoạn (5 - 7 cm) khí quản có nhiều dịch nhầy hoặc có bệnh tích sung huyết cho vào trong các túi nylon vô trùng, bảo quản lạnh (4°C) và vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm trong vòng 24h và dùng để phân lập virus qua phôi trứng (OIE, 2008).

2.2 Phân lập virus từ mẫu bệnh phẩm bằng cách tiêm phôi trứng theo qui trình của OIE (2008)

Khí quản gà bệnh được nghiền nát, cho vào dung dịch nước muối 0,9% tạo huyền dịch 10-20%, ly tâm 3.000 vòng trong 5 phút. Loại bỏ vi khuẩn, nấm và tạp chất bằng cách cho hỗn hợp kháng sinh penicillin 10.000 UI/ml, streptomycin 100 mg/ml vào huyền dịch (Gelb, 1989). Sau đó lọc qua lưới lọc có đường kính 0,22 µm. Lấy 0,1 - 0,2 ml nước trong nổi trên mặt của dung dịch dưới lưới lọc tiêm vào xoang niệu mô phôi gà 09 ngày tuổi. Phôi trứng gà dùng để nuôi cấy virus từ nguồn gà tự nuôi theo qui trình khép kín, cách ly với môi trường ngoài, gà không nhiễm bệnh cũng như không tiêm phòng bệnh IB và đã được test huyết thanh âm tính với IB bằng phương pháp ELISA. Mỗi mẫu bệnh phẩm tiêm vào 5 phôi trứng. Trước khi tiêm soi trứng đánh dấu vị trí đầu phôi và tiêm tại vị trí ngược lại phía đầu phôi. Kế tiếp dùng paraffin bịt lỗ tiêm, ấp trứng 37°C trong 36 – 48 h để toàn bộ bào thai nước trứng có hàm lượng virus cao nhất. Phôi được kiểm tra hàng ngày, những phôi chết xảy ra trong vòng 24 h có mùi thối được xem là nhiễm tạp và được loại ra. Bệnh tích do IB làm phôi chậm phát triển, cuộn tròn cùng với chứng suy nhược các bắp cơ và lắng đọng urate trong thận, nước xoang niệu mô trong. Dịch xoang niệu mô của những phôi lùn được thu hoạch sau 3 ngày tiêm. Trước khi thu hoạch, để trứng trong tủ lạnh 6h. Dịch xoang niệu mô được giữ ở -20°C và dùng cho phản ứng RT-PCR.

2.3 Xác định sự hiện diện của virus IB phân lập được bằng kỹ thuật RT – PCR

Sử dụng đoạn môi trên đoạn gen S IB-F (5'-GATTATAATACTGGTAATTTTCA-3') và IB-R (5'- GCAGCTTTATTAAAGGADGCA-3'). Quy trình ly trích RNA từ dịch xoang niệu mô và RT - PCR được thực hiện tại Công ty Cổ phần Công nghệ Việt Á. Thành phần các phản ứng PCR gồm 12,5 µl hỗn hợp PCR Master mix (2 UI Ampli Taq gold; 0,2 mM dNTP; buffer 10X; 1,5 mM MgCl₂); 0,5 µl mỗi đoạn môi (nồng độ 0,625 µ M); 2,5 µl cDNA mẫu và nước cất khử ion hai lần vừa đủ thể tích 25 µl. Quy trình nhiệt của các phản ứng PCR: 95°C/3 phút (1 chu kỳ); 94°C/30 giây, 45°C /1 phút, 72°C /1 phút 30 giây (40 chu kỳ); 72 °C/15 phút (1 chu kỳ). Sau đó, 3 µl dung dịch loading dye (Promega) và 7 µl sản phẩm PCR cho vào mỗi giếng điện di trên gel agarose 1% (Promega). Quá trình điện di được thực hiện với dung dịch TAE 1X, thời gian điện di là 50 V/5 phút; 75 V/45 phút. Sau khi điện di, băng gel agarose được nhuộm bằng dung dịch ethium bromide 1/10.000 và nhận diện nhờ đèn chiếu tia UV. Độ dài các sản phẩm PCR được xác định bằng cách so với thang DNA chuẩn, đối chứng âm (nước cất) và đối chứng dương. Đối chứng dương chính là sản phẩm của nghiên cứu được giải trình tự xác định là thuộc gen S của virus IB.

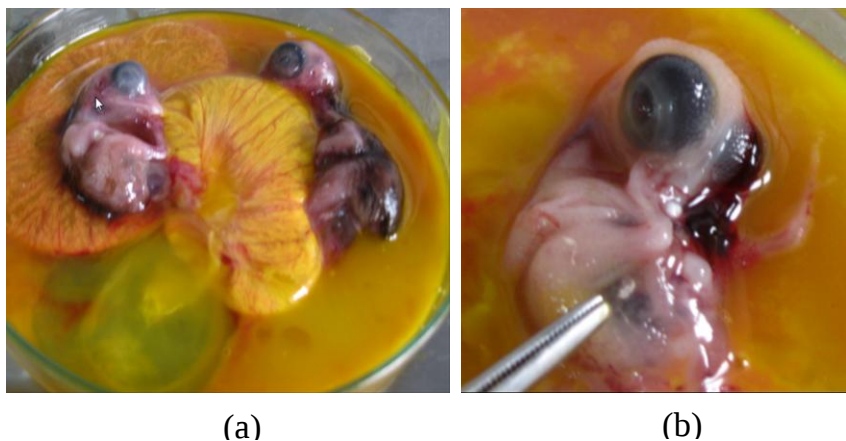
2.4 Định serotype IB phân lập được bằng phương pháp giải trình tự gen

Các mẫu dương tính với PCR được gửi để giải trình tự tại công ty Macrogen Hàn Quốc. Kết quả trình tự nucleotid được Blast trên NCBI, xác định được kiểu serotype IB dựa vào các trình tự này bằng phần mềm Annhyb. Trình tự nucleotid của các mẫu được sắp giống cột và xây dựng cây sinh dòng với

trình tự gen S của một số serotype Mass (M41, H20, H120); Ark; 793B(4/91, 4/91-A2); Cla ... bằng chương trình ClustalX và đọc cây sinh dòng bằng phần mềm Bioedit.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

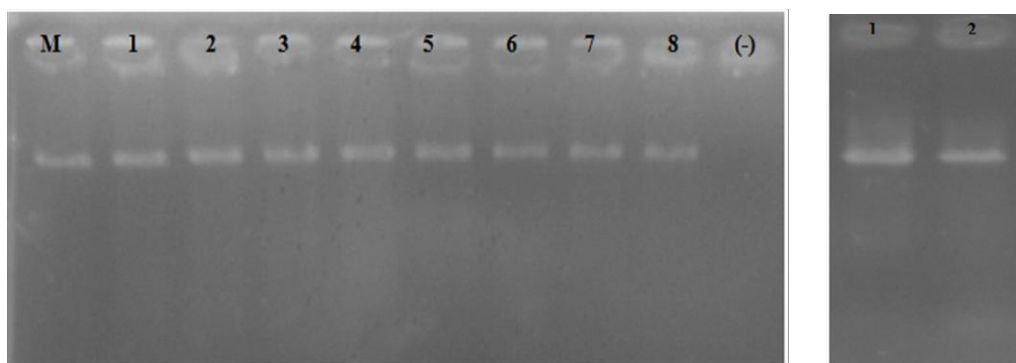
Sau khi khuếch đại virus qua phôi trứng, chúng tôi ghi nhận bệnh tích phôi đặc trưng của bệnh IB như phôi còi cọc, cơ thể uốn cong hình cầu, hai chân ép lên đầu còn gọi là phôi lùn chiếm 54%. Trong số đó có 33/54 phôi còn có thêm bệnh tích tích urate trong thận (Hình 1). Kết quả này giống với mô tả của Gaba và ctv (2010).



Hình 1. Bệnh tích tích urate trong thận

1a: Phôi lùn (trái) Phôi gà bình thường (phải); 1b: Phôi lùn và tích urate)

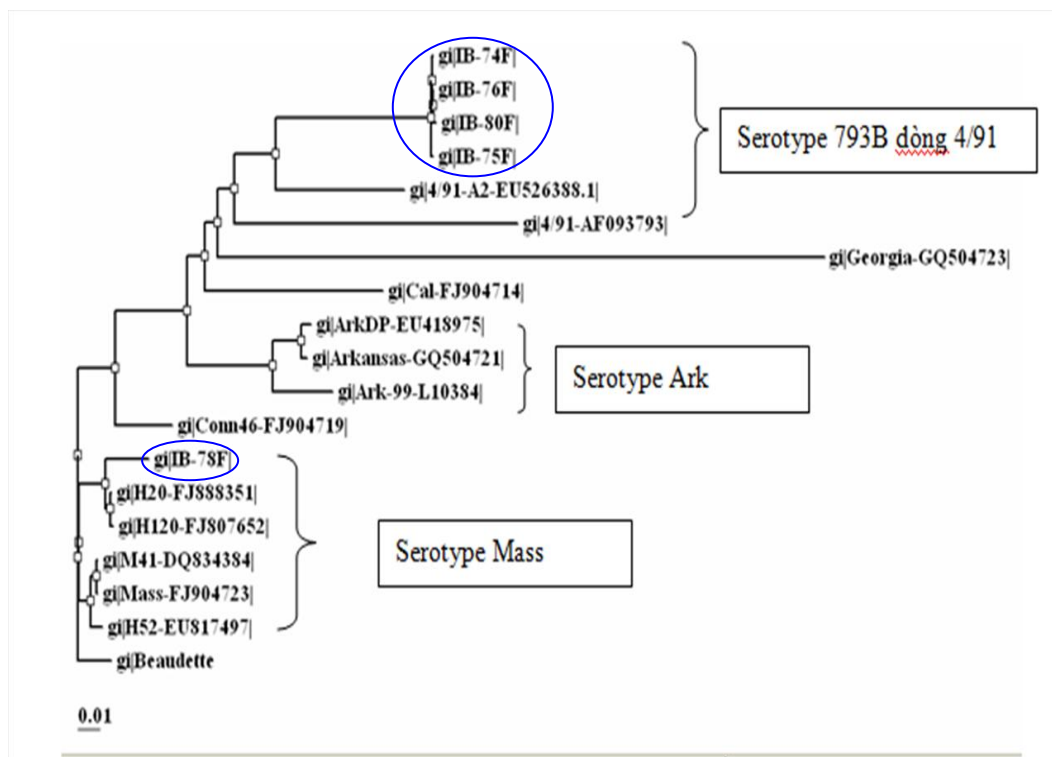
Tổng số 54 mẫu nước trứng có bệnh tích phôi lùn được dùng để xác định sự hiện diện virus IB bằng kỹ thuật RT - PCR với cặp mồi IB-F và IB-R nhằm khuếch đại đoạn gen S của virus IB. Kết quả cho thấy có 9 mẫu dương tính với RT - PCR (Hình 2). Như vậy, có 16,6% mẫu dương tính với IB. Kết quả này tương tự kết quả của Kumar và ctv (2007); Chen và ctv (2010) phát hiện tỉ lệ dương tính bệnh IB lần lượt là 21% và 17% khi dùng phương pháp RT – PCR. Theo De Wit (2000), khi dùng kỹ thuật RT - PCR phải sử dụng đoạn mồi thích hợp nhằm khuếch đại vùng bảo tồn hiện diện tất cả các chủng nếu không hiện tượng âm tính giả xảy ra. Mục đích của nghiên cứu này là xác định serotype gây bệnh IB nên chúng tôi sử dụng phương pháp RT - PCR với đoạn mồi khuếch đại đoạn gen bảo tồn S chung các serotype từ dịch nước trứng chứa virus.



(a) Hình 2 Các sản phẩm RT - PCR (b)

(Hình a: Giếng M mẫu chứng dương, Giếng 1-8 mẫu dương tính, Giếng (-) chứng âm; Hình b: Giếng 1 thang chuẩn, Giếng 2 mẫu dương tính).

Tổng số 9 mẫu dương tính với RT-PCR được gửi giải trình tự gene. Kết quả Blast trên NCBI và Annhyb cho thấy có 6 mẫu có trình tự tương đồng với virus *Infectious Bronchitis*. Kumar và ctv (2007) cũng ghi nhận kết quả tương tự khi giải trình tự 10 mẫu dương tính với IB nhưng chỉ có 7 mẫu chất lượng tốt có thể xác định được serotype. Khi sử dụng chương trình ClustalX sắp giống cột và xây dựng cây phát sinh dòng với trình tự gen S1 và S2 của một số serotype Mass (M41, H20, H120, H52); Ark; 793B (4/91, 4/91-A2); Cla, Georgia, Conn46, Beaudette, QX, LX₄ ... và đọc cây sinh dòng bằng phần mềm Bioedit, chúng tôi xác định được serotype của 5 mẫu (74, 75, 76, 78 và 80). Kết quả được trình bày qua Sơ đồ 1



Sơ đồ 1 Cây sinh dòng mẫu virus gây bệnh IB thực địa so với mẫu từ ngân hàng dữ liệu

Như vậy, có 4 mẫu trong nghiên cứu này tương đồng 88 % với serotype 793B dòng 4/91 và 1 mẫu tương đồng 98% với serotype Mass dòng H120. Kết quả của chúng tôi tương tự kết quả của Trần Thanh Vân (2000) khi xét nghiệm bằng phương pháp trung hoà virus ở đàn gà bố mẹ tại Việt Nam cho thấy sự hiện diện của kháng thể trung hoà đối với hai biến chủng IB 4/91 (serotype 793B) và CR 88 (serotype Mass). Sự phổ biến của 2 serotype này cũng được minh chứng qua các báo cáo của Shapouri (2002) cho biết 14 mẫu ở Iran tương đồng serotype Mass, 2 mẫu tương đồng dòng 4/91; Abdel-Moneim (2006) công bố 16 mẫu ở Hy Lạp tương đồng 97% dòng H120; Blichars và ctv (2007) đã cho biết 8 trong 9 mẫu phân lập tại Ba Lan là serotype 793/B; Rousan và ctv (2008) cho biết serotype Mass và dòng 4/91 là phổ biến nhất trên 50% số lượng mẫu IB ở Jordan; Gaba và ctv (2010) phân lập từ thận gà bệnh tại Ấn Độ phát hiện các mẫu giống 99% trình tự gen dòng 4/91 serotype 793/B; Villarreal và ctv (2010) giải trình tự 20 mẫu dương tính với IB được phân lập từ năm 2007-2008 ở Brazil có 2 mẫu thuộc serotype 793B và 3 mẫu thuộc serotype Mass. Điều cần lưu ý nữa là 4 mẫu thuộc serotype 4/91 được lấy từ đàn gà chỉ chủng vaccine H120 lúc 1 ngày tuổi còn mẫu thuộc serotype H120 được lấy từ đàn gà chỉ chủng 4/91 lúc 1 tuần tuổi. Như vậy, khả năng bảo vệ chéo giữa các chủng rất thấp và nếu chỉ chủng một loại vaccine IB thì không bảo vệ được đàn gà chống lại bệnh IB.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này ghi nhận 54% bệnh tích phôi còi cọc, cơ thể uốn cong, hai chân ép lên đầu (phôi lùn) và 33% phôi tích urate ở thận từ mẫu khí quản xuất huyết ở các trại gà có triệu chứng hô hấp. RT – PCR phát hiện 9 mẫu dương tính với IB. Giải trình tự gen xác định được 1 mẫu IB thuộc serotype Masschusett (dòng H120), 4 mẫu thuộc serotype 793B (dòng 4/91).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdel- Moneim A. S., El-Kady M. F., Ladman B. S., and Gelb J. Jr., 2006. S₁ gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. *Virology journal* 3:78-86.
2. Blicharz K. D., Smietanka K. and Minta Z., 2007. Molecular studies on infectious bronchitis virus isolated in Poland. *Bull veterinary inst pulawy* 51: 449-452.
3. Chen H. W., Huang Y. P., and Wang C. H., 2010. Identification of intertypic recombinant infectious bronchitis viruses from slaughtered chickens. *Poultry science* 89: 439-446.
4. De Wit J. J., 2000. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian pathology* 29: 71- 93.
5. Gaba A., Dave H., Pal J. K., and Prajapati K. S., 2010. Isolation, identification and molecular characterization of IBV variant from out breaks of visceral gout in commercial broilers. *Veterinary world* 3 (8): 375-377.
6. Gelb J. Jr., Wolff J. B. and Moran C. A., 1991. Variant serotype of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian diseases* 35: 82-87.
7. Kumar K. S., Raj G. D., Raja A., and Ramadass P., 2007. Genotypic characterization of infectious bronchitis viruses from India. *Indian journal of biotechnology* 6: 41-44.
8. OIE, 2008. Avian infectious bronchitis. *OIE Terrestrial Manual 2008*. chapter 2.3.2, pp 443-450
9. Roussan D. A., Totanji W. S. and Khawaldeh G. Y., 2008. Molecular subtype of infectious bronchitis virus in broiler flocks in Jordan. *Poultry science* 87: 661-664.
10. Shapouri S. A., Mayahi M. R. M., Charkhkar S., Assasi K., 2002. Serotype identification of recent Iranian isolates of infectious bronchitis virus by type-specific multiplex RT-PCR. *Arch Razi Ins* 53: 79-84.
11. Trần Thanh Vân, 2000. Khảo sát ảnh hưởng của các biến chủng virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm đến tỷ lệ chết và sản xuất trứng ở đàn gà bố mẹ giống thịt Hubbard HI-YIELD tại hai trại Ando và Bắc Sơn. Luận án thạc sĩ khoa học Nông nghiệp, trường đại học Nông lâm TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam.