

# Nghiên cứu khoa học

## KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU XÁC ĐỊNH REOVIRUS Ở GÀ NUÔI TẠI TỈNH BẮC GIANG NĂM 2022-2023

Trần Thị Hương Giang<sup>1</sup>, Vũ Thị Thu Trà<sup>1</sup>, Đỗ Mạnh Thắng<sup>2</sup>, Đồng Văn Hiếu<sup>1\*</sup>

\*Tác giả liên hệ email: dvhieuvet@vnua.edu.vn

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định sự có mặt của reovirus ở gà nuôi tại tỉnh Bắc Giang. Tổng số 27 mẫu gộp gồm dịch ổ khớp và gân của gà được thu thập từ gà có các biểu hiện như còi cọc, viêm khớp và viêm bao gân tại một số trang trại thuộc các huyện Tân Yên, Yên Thế và Hiệp Hoà, tỉnh Bắc Giang từ tháng 10/2022 đến 1/2023. Kết quả phản ứng PCR cho thấy, số mẫu dương tính với hệ gen của reovirus ở gà là 1/7 (14,29%) và 1/9 (11,11%) mẫu thu thập từ huyện Tân Yên và Yên Thế, trong khi đó không có mẫu dương tính nào được phát hiện đối với các mẫu thu thập tại huyện Hiệp Hoà. Kết quả giải trình tự một phần gen  $\sigma$ C cho thấy chủng virus thực địa ở gà có biểu hiện viêm khớp thuộc nhóm reovirus cluster I và gần với chủng reovirus đã được báo cáo ở Trung Quốc. Kết quả của nghiên cứu này bổ sung thông tin về tình hình nhiễm reovirus ở gà, làm cơ sở cho việc xây dựng các biện pháp chẩn đoán và phòng chống dịch bệnh trên gà và những nghiên cứu chuyên sâu về reovirus sau này.

*Từ khóa:* Bắc Giang, gà, PCR, reovirus.

### Preliminary result on detecting reovirus in chickens farmed in Bac Giang province, 2022-2023

Tran Thi Huong Giang, Vu Thi Thu Tra, Do Manh Thang, Dong Van Hieu

### SUMMARY

This study aimed to identify reovirus infection in chickens raised in several districts in Bac Giang province. A total of 27 pooled samples including synovial fluid and tendons were collected from chickens with clinical signs of running-stuning syndrome, arthritis and tenosynovitis raised in Tan Yen, Yen The and Hiep Hoa district of Bac Giang province from October 2022 to January 2023. Results of polymerase chain reaction (PCR) showed that the number of positive samples for the avian reovirus (ARV) genome were 1/7 (14.29%) and 1/9 (11.11%) samples collected in Tan Yen and Yen The districts, respectively; whereas no sample was positive for the viral genome from chickens farmed in Hiep Hoa district. Analysis of  $\sigma$ C gene sequences revealed that the field strains obtained in this study belonged to the cluster I and were genetically closed to the Chinese ARV strain. The finding of this study supplements information on reovirus infection is a basis for developing diagnostic and disease prevention measures in chickens and further study.

*Keywords:* Bac Giang province, chicken, PCR, reovirus.

<sup>1</sup> Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>2</sup> Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong chăn nuôi gia cầm, bệnh do reovirus là một trong những bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, gây ra nhiều tổn thất về kinh tế. Reovirus liên quan đến một số bệnh ở gà như hội chứng kém hấp thu, hội chứng thấp còi, các vấn đề về bệnh đường ruột, viêm khớp do virus và viêm bao gân (Kouwenhoven và cs., 1988). Reovirus ở gà (Avian reovirus, ARV) được cho là một tác nhân gây bệnh chính trong nhiều trường hợp bệnh lâm sàng. Mối liên quan giữa ARV với viêm động mạch hoặc viêm bao gân do virus ở gà đã được chứng minh rõ ràng. Gà bị bệnh do ARV gây ra có thể bị què, chuyên hoá thức ăn thấp, giảm tăng trọng, viêm khớp hoặc viêm bao gân, nặng có thể tử vong (Jones, 2013).

ARV được phân lập từ gà không có triệu chứng lâm sàng, nhưng chúng vẫn liên quan đến các tình trạng bệnh như viêm bao gân và hội chứng kém hấp thu ở gà (Kouwenhoven và cs., 1988). ARV là một ARN virus dạng trần, thuộc họ *Reoviridae*. Các virion ARV có đường kính 70-80 nm (Spandidos và Graham, 1976). Tương tự như các thành viên khác trong họ này, hệ gen của ARV gồm 10 phân đoạn, trong đó có 3 phân đoạn L gồm L1, L2, L3; 3 phân đoạn M gồm M1, M2, M3 và 4 phân đoạn S gồm S1, S2, S3, S4. Mỗi đoạn mã hoá một protein duy nhất ngoại trừ đoạn S1 mã hoá 3 loại protein. Gen S1 mã hoá hai protein phi cấu trúc (p10 và p17) và một protein cấu trúc ( $\sigma$ C) (Benavente và Martínez-Costas, 2007). Phân tích trình tự và khuếch đại 1 phần gen S1 mã hoá protein  $\sigma$ C thường được sử dụng để phân tích đặc điểm di truyền và phân loại ARV. Cho đến nay, 6 kiểu genotype cluster (I-VI) đã được mô tả dựa vào trình tự đoạn gen S1 mã hoá protein  $\sigma$ C (Lu và cs., 2015).

Trong những năm gần đây, một số chủng ARV mới đã được phân lập từ các đàn gà thịt được tiêm phòng bệnh viêm khớp hoặc viêm bao gân ở Bắc Mỹ và gây thiệt hại kinh tế lớn cho ngành chăn nuôi gia cầm (Crawford, 2000). Hội chứng viêm khớp và viêm bao gân do virus đã gia tăng ở các đàn gà thịt thương mại ở miền Bắc Trung Quốc (Zhong và cs., 2016). Ở Việt Nam, bệnh do ARV gây ra ở gà đã được biết đến trong những trại chăn nuôi liên quan đến hội chứng còi cọc trên đàn gà nuôi. Khảo sát huyết thanh trên đàn gà tại Long Khánh, tỉnh Đồng Nai cho thấy có 392 mẫu huyết thanh dương tính với kháng thể kháng

ARV; chiếm tỷ lệ 85,22% (Hò Thị Việt Thu và cs., 2014). Tuy nhiên cho tới nay, những công bố về sự có mặt của ARV trên đàn gà nuôi ở Việt Nam còn rất hạn chế. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm bước đầu xác định sự có mặt của ARV trên đàn gà nuôi tại tỉnh Bắc Giang và phân tích một số đặc điểm di truyền phân tử của một số chủng virus xác định được.

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

### 2.1. Nội dung

- Chẩn đoán ARV bằng phương pháp PCR trong mẫu bệnh phẩm gà nuôi tại một số huyện trên địa bàn tỉnh Bắc Giang

- Phân tích trình tự gen của một số chủng ARV xác định được.

### 2.2. Vật liệu

Tổng số 27 mẫu gộp gồm dịch ở khớp và gân được thu thập từ gà nuôi tại các huyện Tân Yên, Yên Thế và Hiệp Hoà thuộc tỉnh Bắc Giang trong thời gian từ tháng 10/2022 đến tháng 1/2023. Mẫu được thu thập từ những đàn gà không sử dụng vacxin phòng bệnh do ARV gây ra, với các biểu hiện bệnh như còi cọc, chậm lớn so với các con khác trong đàn, viêm ổ khớp và viêm bao gân. Mẫu sau khi thu thập được xử lý tại phòng thí nghiệm thuộc Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Vacxin nhược độc (vacxin sống nhược độc đông khô chủng S1133, công ty Viphavet phân phối ở Việt Nam) phòng bệnh do ARV gây ra ở gà, Gallivac Reo được sử dụng làm đối chứng dương trong nghiên cứu này.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Thu thập và xử lý mẫu

Tổng số 27 mẫu gà từ các trang trại thuộc các huyện Tân Yên, Yên Thế và Hiệp Hoà được lựa chọn ngẫu nhiên trên địa bàn tỉnh Bắc Giang. Bệnh phẩm là mẫu gộp dịch ổ khớp và gân được thu thập theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 01-83:2011. Mẫu bệnh phẩm sau đó được đông nhất theo tỷ lệ 10% phosphate-buffered saline (PBS). Hỗn dịch đông nhất được bảo quản ở -80°C tới khi sử dụng.

### 2.3.2. Tách ARN và tổng hợp cDNA

RNA và DNA tổng số trong mẫu đã được đồng nhất được chiết tách dựa trên kit thương mại Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extraction (Intron, Hàn Quốc). Quy trình tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất. ARN tổng số được hòa tan trong 30µl và được bảo quản ở -30°C cho tới khi sử dụng. Quá trình tổng hợp cDNA được thực hiện có sử dụng Random primer và enzyme M-MLV (Promega, Mỹ). Phản ứng tổng hợp cDNA được thực hiện ở 37°C trong 60 phút, 75°C trong 5 phút.

### 2.3.3. Phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thiết lập để khuếch đại

sản phẩm PCR của ARV có độ dài 1.088 bp. Các cặp mồi ARV P1 và ARV P4 (bảng 1) được sử dụng cho phản ứng PCR xác định ARV genome trong mẫu bệnh phẩm được công bố trước đây (Kant và cs., 2003). Cụ thể tổng số 25µl hỗn hợp phản ứng gồm có 12,5µl GoTag® Green Master Mix (Promega, Mỹ); 1µl mỗi loại mồi xuôi và mồi ngược (10 µM) (bảng 1); 8,5µl nước tinh khiết và 2µl ADN 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, 58°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây và hoàn tất phản ứng ở 72°C trong 2 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1% có bổ sung thuốc nhuộm RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (Intron, Hàn Quốc).

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

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Sản phẩm PCR (bp)	Tài liệu tham khảo
ARV P1	AGTATTTGTGAGTACGATTG	1.088	Kant và cs. (2003)
ARV P4	GGCGCCACACCTTAGGT		

### 2.3.4. Giải trình tự và phân tích trình tự gen

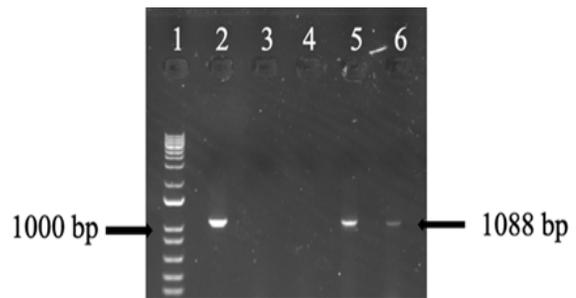
Sản phẩm PCR được khuếch đại có kích thước 1.088 bp được tinh sạch bằng kit thương mại QIAquick PCR Purification (Qiagen, Mỹ). Sản phẩm sau đó được gửi tới công ty 1<sup>st</sup> BASE, Singapore để giải trình tự gen. Phần mềm BioEdit tích hợp công cụ CLUSTAL W đã được sử dụng để căn chỉnh trình tự nucleotide (Hall, 1999; Thompson và cs., 1994). Tỷ lệ tương đồng nucleotide khi so sánh với các chủng ARV tham chiếu được đăng tải trên GenBank bằng chương trình BLAST. Cây phả hệ được xây dựng dựa trên các trình tự ARV thu được trong nghiên cứu này và các trình tự từ GenBank bằng phần mềm MEGA 6 (Tamura và cs., 2013).

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả xác định ARV bằng phản ứng PCR

Phản ứng PCR được tiến hành với 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 1.088 bp giống như sản phẩm PCR được khuếch đại ở giếng đối chứng dương, trong khi đó giếng đối chứng âm chỉ bổ sung

nước tinh khiết không xuất hiện vạch (hình 1). Như vậy, có thể sử dụng cặp mồi ARV P1/P4 để xác định ARV genome trong mẫu bệnh phẩm tại Việt Nam như nghiên cứu trước đó đã đã xác định (Kant và cs., 2003).



**Hình 1. Minh họa kết quả PCR phát hiện ARV ở gà**

*Ghi chú: Giếng 1 là thang ADN chuẩn 1kb, giếng 2: mẫu đối chứng dương ARV, giếng 3: mẫu đối chứng âm chỉ bổ sung nước tinh khiết, giếng 4-6: mẫu thực địa. Vạch sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước 1.088 bp.*

Tỷ lệ mẫu dương tính với ARV được xác định bằng phản ứng PCR (bảng 2).

**Bảng 2. Kết quả xác định ARV genome ở gà theo địa điểm lấy mẫu, cá thể tại tỉnh Bắc Giang bằng phản ứng PCR**

Địa phương (huyện)	Theo cá thể		
	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Tân Yên	7	1	14,29
Yên Thế	9	1	11,11
Hiệp Hoà	11	0	0
<b>Tổng</b>	<b>27</b>	<b>2</b>	<b>7,41</b>

Trong tổng số 27 mẫu thu thập từ gà có những dấu hiệu lâm sàng nghi nhiễm ARV, có 2 (7,4%) mẫu đã được xác định dương tính với hệ gen của ARV bằng phản ứng PCR. Cụ thể, tỷ lệ dương tính với ARV theo cá thể ở các huyện Tân Yên và Yên Thế lần lượt là 11,1% và 14,29%; trong khi đó không phát hiện được genome của ARV có trong những mẫu thu thập từ gà nuôi ở các trang trại thuộc huyện Hiệp Hoà.

ARV đã được báo cáo phổ biến ở nhiều nước trên thế giới. Virus đã được phân lập từ những gà biểu hiện hội chứng kém hấp thu, viêm khớp, viêm bao gân lần đầu tiên ở Iran vào năm 1992 (Khodashenas và Aghakhan, 1992). Nghiên cứu huyết thanh học báo cáo rằng 92-98% đàn gà thịt

dương tính với kháng huyết thanh kháng ARV (Bokaie và cs., 2008). Nghiên cứu của Hedayati và cs. (2013) đã ghi nhận chủng ARV giống S1133 đã được xác định trong mẫu phân của đàn gà thịt (Hedayati và cs., 2013). Các biến thể ARV gây bệnh được báo cáo ở Mỹ, Pháp, Canada, Trung Quốc và Brazil (Palomino-Tapia và cs., 2018; Sellers, 2017; Souza và cs., 2018; Zhong và cs., 2016).

### 3.2. Kết quả phân tích một phần gen S1 của các chủng ARV và cây phả hệ

Reovirus gây bệnh ở gà hay liên quan đến các bệnh như hội chứng còi cọc chưa từng được công bố ở Việt Nam, để khẳng định tính đặc hiệu của phản ứng PCR sử dụng trong nghiên cứu này mặc dù đã sử dụng đối chứng dương là chủng vacxin nhược độc, sản phẩm PCR đã được giải trình tự gen và trình tự thu được đã được kiểm tra với cơ sở dữ liệu trên GenBank.

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 đầu vào (980 nucleotide) giống với các chủng reovirus ở gà đã được công bố ở Trung Quốc (tính tương đồng nucleotide đến 95%) dựa vào trình tự gen  $\sigma$ C của ARV (bảng 3).

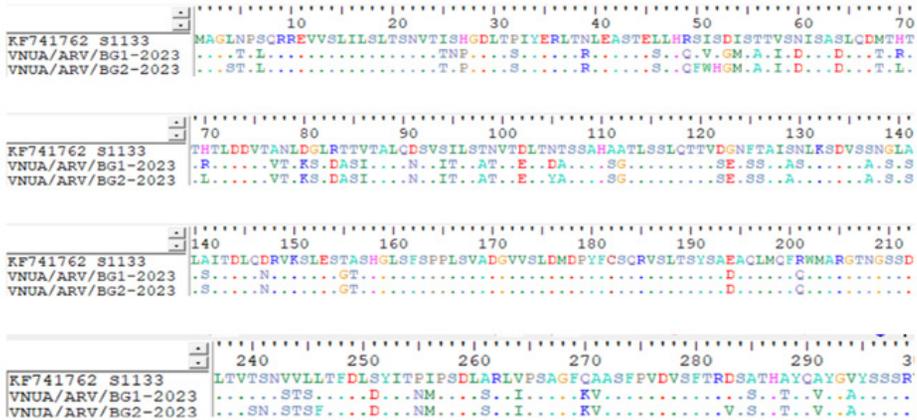
**Bảng 3. Kết quả so sánh mức độ tương đồng trình tự nucleotide giữa các chủng ARV lưu hành trong nghiên cứu này với chủng tham chiếu trên thế giới**

Chủng virus	Phân loại	Chủng virus với mức độ tương đồng nucleotide cao nhất			
		Tên chủng	Quốc gia	Mã số GenBank	Tỷ lệ (%)
VNUA/ARV/BG1-2023	ARV	HeB-20191774	Trung Quốc	ON262159.1	98,19
VNUA/ARV/BG2-2023	ARV	HeB-20191774	Trung Quốc	ON262159.1	95,65

Như vậy, phản ứng PCR sử dụng trong nghiên cứu này là đặc hiệu và 2/27 mẫu xét nghiệm dương tính với reovirus gây bệnh ở gà.

Trong nghiên cứu này, trình tự amino acid của protein  $\sigma$ C của 2 chủng ARV và chủng vacxin S1133 đã được phân tích và so sánh. Kết quả cho thấy có nhiều điểm đột biến được phát hiện trên trình tự amino acid của protein  $\sigma$ C các chủng trong nghiên cứu này so sánh với chủng S1133 (hình 2).

Kết quả này phù hợp với ghi nhận trước đây về protein  $\sigma$ C của ARV. Đây là protein có nhiều biến đổi nhất trong các protein của ARV. Mặc dù cho đến nay sự thay đổi của những amino acid này có ảnh hưởng đến tính kháng nguyên của ARV hay không. Tuy nhiên, nghiên cứu trước đây đã ghi nhận rằng đặc điểm protein  $\sigma$ C này thường có nhiều biến đổi và có thể cũng được coi là một trong những nguyên nhân làm giảm hiệu quả của vacxin phòng bệnh ARV (Goldenberg và cs., 2010).



**Hình 2. So sánh trình tự amino acid của 2 chủng ARV trong nghiên cứu này với chủng virus vaccin S1133**

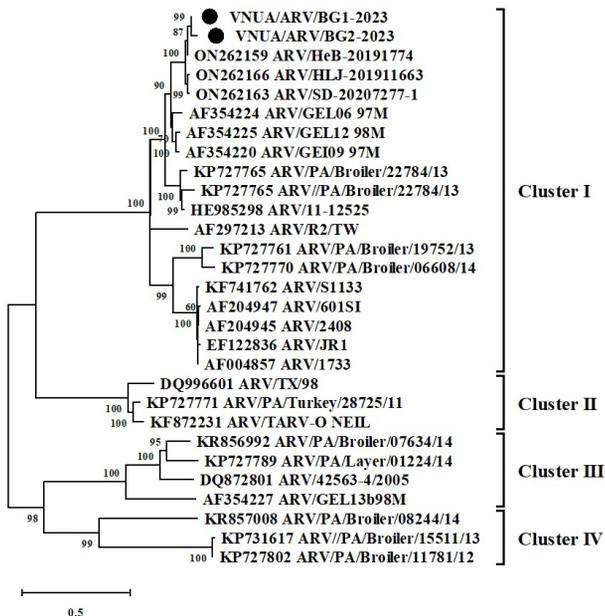
Cây phả hệ được xây dựng dựa trên một phần gen S1 mã hóa protein  $\sigma$  C của 2 chủng ARV trong nghiên cứu này và một số chủng ARV tham chiếu trên ngân hàng GenBank. Kết quả được thể hiện ở hình 3. Kết quả cho thấy cả 2 chủng VNUA/ARV/BG1-2023 và VNUA/ARV/BG2-2023 đều thuộc một nhánh của nhóm genotype cluster I reovirus ở gà. Hai chủng virus này có mối quan hệ di truyền với chủng ARV được xác định ở Trung Quốc (mã số GenBank là ON262159).

**IV. KẾT LUẬN**

Nghiên cứu này lần đầu khẳng định sự có mặt của ARV trong mẫu dịch ổ khớp và gân gà thu được ở những gà có biểu hiện lâm sàng nuôi tại một số trang trại tại tỉnh Bắc Giang từ tháng 10/2022-1/2023 với tỷ lệ dương tính là 7,41%. Bước đầu xác định 2 chủng ARV lưu hành tại tỉnh Bắc Giang có quan hệ di truyền gần với chủng ARV có nguồn gốc từ Trung Quốc báo cáo năm 2019.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Benavente, J. & Martínez-Costas, J., 2007. Avian reovirus: structure and biology. *Virus Res.* 123(2): 105-119.
2. Bokaie, S., Shojadoost, B., Pourbakhsh, S. A., Pourseyyed, S. M. & Sharifi, L., 2008. Seroprevalence survey on Reovirus infection of broiler chickens in Tehran province. *Iran J. Vet. Res.* 9(2): 181-183.
3. Crawford, G., 2000. After success of white meat, poultry industry seeks ways to expand market for dark meat. *Poultry.* 8: 18-20.
4. Goldenberg D., Pasmanik-Chor M., Pirak M., Kass N., Lublin A., Yeheskel A., Heller D. & Pitcovski J., 2010. Genetic and antigenic characterization of sigma C protein from avian reovirus. *Avian Pathol.* 39(3): 189-199.
5. Hall, T. A., 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and



**Hình 3. Cây phả hệ (phylogenetic tree) của ARV dựa vào trình tự một phần gen mã hoá protein S1 (940 bp)**

- analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Series.* 41: 95-98.
6. Hedayati, M., Shojadost, B. & Peighambari, S. M., 2013. Detection of avian reoviruses causing tenosynovitis in breeder flocks in Iran by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction enzyme fragment length polymorphism (RFLP). *Iran J. Vet. Med.* 7(2): 135-142.
  7. Hồ Thị Việt Thu, Nguyễn Thị Thuỳ Dung, Đỗ Võ Anh Khoa, 2014. Khảo sát huyết thanh học tình hình nhiễm Avian Reovirus trên gà tại tỉnh Đồng Nai. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ.* 34(2014): 1-6.
  8. Jones, R. C., 2013. Reovirus infections. In Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L. & Nair, V. (Eds.), *Diseases of poultry* (pp. 351-373). Ames, IA: Wiley-Blackwell.
  9. Kant, A., Balk, F., Born, L., van Roozelaar, D., Heijmans, J., Gielkens, A. & ter Huurne, A., 2003. Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the sigma C protein. *Vet. Res.* 34(2): 203-212.
  10. Khodashenas, M. & Aghakhan, S., 1992. Isolation and characterization of avian reoviruses from the cases of malabsorption syndrome and arthritis/tenosynovitis in chickens. *Arch Razi Inst.* 42: 103-116.
  11. Kouwenhoven, B., Vertommen, M. & Goren, E., 1988. Investigations into the role of reovirus in the malabsorption syndrome. *Avian Pathol.* 17(4): 879-892.
  12. Lu H., Tang Y., Dunn P. A., Wallner-Pendleton E. A., Lin L. & Knoll E. A., 2015. Isolation and molecular characterization of newly emerging avian reovirus variants and novel strains in Pennsylvania, USA, 2011–2014. *Scientific Reports*, 5(1): 14727.
  13. Palomino-Tapia, V., Mitevski, D., Inglis, T., van der Meer, F. & Abdul-Careem, M. F., 2018. Molecular characterization of emerging avian reovirus variants isolated from viral arthritis cases in Western Canada 2012-2017 based on partial sigma ( $\sigma$ )C gene. *Virology*. 522: 138-146.
  14. Sellers, H. S., 2017. Current limitations in control of viral arthritis and tenosynovitis caused by avian reoviruses in commercial poultry. *Vet Microbiol.* 206: 152-156.
  15. Souza, S. O., De Carli, S., Lunge, V. R., Ikuta, N., Canal, C. W., Pavarini, S. P. & Driemeier, D., 2018. Pathological and molecular findings of avian reoviruses from clinical cases of tenosynovitis in poultry flocks from Brazil. *Poult. Sci.* 97(10): 3550-3555.
  16. Spandidos, D. A. & Graham, A. F., 1976. Physical and chemical characterization of an avian reovirus. *J. Virol.* 19(3): 968-976.
  17. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. & Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12): 2725-2729.
  18. Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22): 4673-4680.
  19. Zhong, L., Gao, L., Liu, Y., Li, K., Wang, M., Qi, X., Gao, Y., & Wang, X., 2016. Genetic and pathogenic characterisation of 11 avian reovirus isolates from northern China suggests continued evolution of virulence. *Sci. Rep.* 6: 35271.

Ngày nhận: 29-8-2023

Ngày phản biện: 30-12-2023

Ngày đăng: 1-5-2024