

Isolation and genetic analysis of Tembusu virus in ducks

Dat M. Truong, & Hai T. Hoang*

Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: October 13, 2022

Revised: May 03, 2023

Accepted: May 08, 2023

Keywords

Duck

Embryonic eggs

Isolation

Phylogenetic tree

Tembusu virus

*Corresponding author

Hoang Thanh Hai

Email:

hai.hoangthanh@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

The experiment was conducted from August 2020 to March 2022 at the Veterinary Hospital of Nong Lam University, Ho Chi Minh City. The aim of this study was to isolate and analyze Tembusu virus gene (flavivirus) using 9 to 11 day-old embryonic duck eggs. Treated specimens were inoculated into embryonic duck eggs by allantoic route, then eggs were observed every day for 7 days. The allantoic fluids of the survival eggs were inoculated up to 3 times. Subsequently, the allantoic fluids were checked by real-time RT-PCR to detect Tembusu virus. A positive sample was then titrated, and finally a partial genome was sequenced as well as a phylogenetic tree was constructed. As a result, a strain of Tembusu virus was isolated, and genetic analysis of partial E gene showed that this virus strain was highly similar (from 96,8% to 98,15%) to others in China and Thailand.

Cited as: Truong, D. M., & Hoang, H. T. (2023). Isolation and genetic analysis of Tembusu virus in ducks. *The Journal of Agriculture and Development* 22(4), 42-48.

Phân lập và phân tích đặc điểm di truyền của virus Tembusu (flavivirus) trên vịt

Trương Minh Đạt & Hoàng Thanh Hải*

Khoa Chăn Nuôi Thú Y, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 13/10/2022

Ngày chỉnh sửa: 03/05/2023

Ngày chấp nhận:
08/05/2023

Từ khóa

Cây phả hệ
Phân lập
Phôi trứng
Vịt
Vi rút Tembusu

*Tác giả liên hệ

Hoàng Thanh Hải
Email:
hai.hoangthanh@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Thí nghiệm được tiến hành từ tháng 8 năm 2020 đến tháng 3 năm 2022, tại Bệnh viện Thú y, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM với mục tiêu phân lập và phân tích di truyền của vi rút Tembusu (flavivirus) bằng phôi trứng vịt. Trứng vịt có phôi 9 đến 11 ngày tuổi được tiêm mẫu bệnh phẩm đã được xử lý vào xoang niệu mô, sau đó trứng được quan sát mỗi ngày trong 7 ngày. Dịch xoang niệu mô của những trứng còn sống được cấy truyền tối đa 3 lần. Sau đó, dịch xoang niệu mô được kiểm tra bằng real-time RT-PCR để phát hiện vi rút Tembusu. Mẫu dương tính thì tiến hành chuẩn độ vi rút và cuối cùng là một phần bộ gen của vi rút được giải trình tự và cây phả hệ được xây dựng chung với các chủng vi rút khác. Sau thời gian nghiên cứu, kết quả thu được là phân lập được một chủng vi rút Tembusu, và qua phân tích di truyền dựa trên một phần gen E thì chủng vi rút này có sự tương đồng khá cao (từ 96,8% tới 98,15%) với các chủng vi rút Tembusu khác ở Trung Quốc và Thái Lan.

1. Đặt Vấn Đề

Nhiều mầm bệnh xuất hiện trên các loài gia súc và gia cầm đã gây thiệt hại một cách nghiêm trọng đến nền chăn nuôi của nước ta. Trên vịt, đáng chú ý nhất là mầm bệnh liên quan đến hội chứng giảm đẻ, gây tổn thương đến hệ thống sinh sản của con cái làm giảm sản lượng trứng nghiêm trọng ở các trang trại chăn nuôi do vi rút Tembusu gây ra.

Vi rút Tembusu (TMUV) là một vi rút chi *Flavivirus*, họ *Flaviviridae* (Su & ctv., 2011). Cũng giống như các flavivirus khác, vi rút Tembusu có gen E, là gen cấu trúc trên bề mặt vi rút, có vai trò chính trong việc vi rút xâm nhập vào tế bào, độc lực và tính sinh miễn dịch

của vi rút (Hu & ctv, 2021). Vi rút gây các tổn thương trên hệ thống sinh sản của con mái làm giảm sản lượng trứng nghiêm trọng (có thể lên tới 90%) (Su & ctv., 2011). Hơn nữa, vi rút còn gây các biểu hiện thần kinh như khó di chuyển, liệt chân, cánh, lật ngửa trên vịt thịt (Yun & ctv., 2012). Bệnh tích đại thể là viêm, xuất huyết, và thoái hoá buồng trứng, lách sưng to trên vịt đẻ (Su & ctv., 2011); viêm, xuất huyết nội, ngoại tâm mạc, lách sưng to, có thể hoại tử, gan sưng to và có những vệt xuất huyết, xung huyết ở não trên vịt thịt. Tỷ lệ chết dao động từ 5 - 30% (Li & ctv., 2015).

Năm 2010, bệnh được phát hiện đầu tiên ở miền nam Trung Quốc, sau đó lây ra các đàn vịt thuộc các tỉnh lân cận ở miền đông Trung

Quốc, gây thiệt hại lớn (Liu & ctv., 2013). Sau đó, bệnh nổ ra ở Malaysia (Homonnay & ctv., 2014) và năm 2013 tại Thái Lan (Thontiravong & ctv., 2015). Trong những năm gần đây, vi rút Tembusu cũng đã có mặt tại Việt Nam. Theo thống kê của Bệnh viện Thú y, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, tỉ lệ mẫu dương tính với vi rút Tembusu (xác định bằng RT-PCR) năm 2018 lên tới 38% trên các ca được chẩn đoán. Tuy vậy, chưa có nhiều nghiên cứu về bệnh này tại nước ta. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu phân lập vi rút Tembusu, từ đó làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về vắc-xin hay phát triển các kit chẩn đoán bệnh.

2. Vật Liệu và Phương Pháp

2.1. Phân lập vi rút

Mẫu là lách, gan được chọn từ các ca vịt có kết quả real-time RT-PCR dương tính với Ct < 25, được bảo quản tại -80°C. Mẫu được nghiền thành huyền dịch 10% với dung dịch phosphate buffered saline. Sau đó, ly tâm với gia tốc 4.000 vòng trong 10 phút. Thu lấy dịch nổi, lọc qua màng cỡ 0,2 µm.

Trứng vịt có phôi từ 9 ngày tuổi đến 11 ngày tuổi được soi để chọn phôi khỏe. Sau đó, sát trùng vỏ trứng bằng iodine, dùi vị trí tiêm ở phía trên buồng hơi. Tiêm 0,1 mL dịch bệnh phẩm đã xử lý vào xoang niệu mô và gắn kín lỗ tiêm bằng keo. Trứng được ủ ở nhiệt độ từ 37,8°C. Mỗi ngày soi trứng 2 lần trong 8 ngày, loại bỏ phôi chết trước 24 giờ. Mỗi mẫu bệnh phẩm tiêm trên 3 phôi. Các trứng có phôi chết hoặc yếu được bảo quản ở nhiệt độ 4°C qua đêm sau đó được thu hoạch dịch trong. Dịch trong của những trứng không chết được tiêm tiếp vào phôi trứng khác cho đến khi phôi trứng chết, yếu hoặc đủ ba lần tiêm lập lại.

2.2. Real-time RT-PCR

Dịch trứng của các trứng nghi ngờ dương

tính với Tembusu virus được chiết tách RNA bằng bộ kit *TopPURE*® Fluid Viral Extraction kit (Cat.No.HI-712, ABI, Việt Nam), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. RNA thu được sử dụng ngay hoặc bảo quản ở -80°C.

Phản ứng được thực hiện bằng bộ kit Bioline-Real-time PCR kit (Cat.No. BIO-86005, Bioline, Anh) với cặp mồi và probe: EF: TGTCTTATGCAGGTACCGATG, ER: CGTATGGGTTGACTGTTATCA, EP:FAM-AGTTCCCATATCCATGTC-TAMRA theo chu kỳ nhiệt trong bài báo tham khảo (Yan & ctv., 2011). Mẫu dương tính có giá trị Ct < 35.

2.3. Xác định liều gây chết phôi 50%

Dịch trứng chứa vi rút được pha loãng 10 lần liên tiếp thành các nồng độ 10^{-1} đến 10^{-6} . Tiêm 0,1 mL hỗn hợp vào xoang niệu mô phôi trứng vịt (mỗi nồng độ tiêm 4 phôi).

Ủ trứng trong tủ ấm 37,8°C theo dõi trong 8 ngày. Loại bỏ trứng chết trong vòng 24 giờ sau khi tiêm. Ghi chép số phôi chết.

Dựa vào tỷ lệ sống chết của phôi để tính toán liều gây chết phôi 50% (ELD50) theo công thức Reed & Muench (Reed & Muench, 1938).

2.4. Giải trình tự một phần gen E

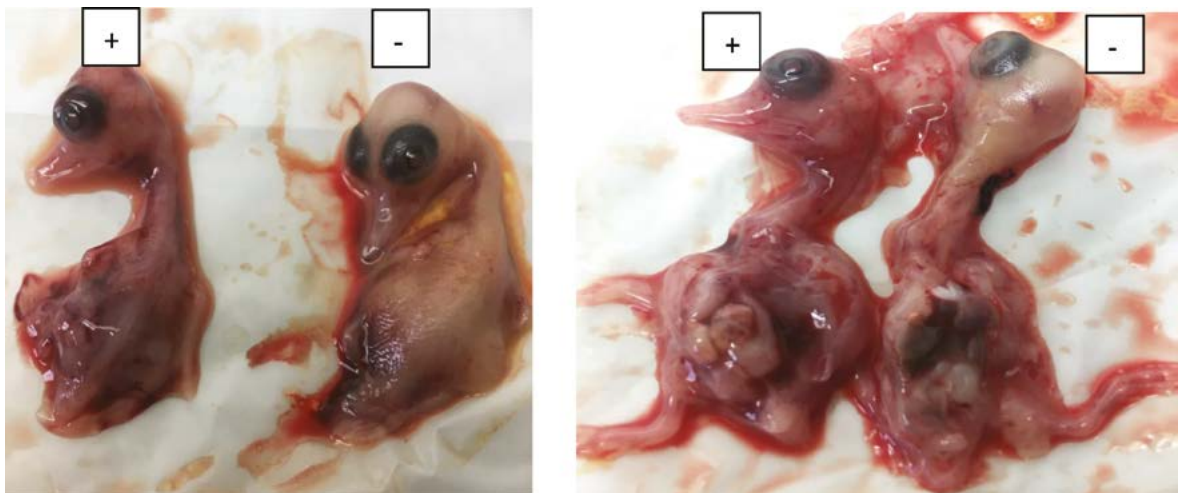
Một phần gen E của vi rút được khuếch đại bằng RT-PCR (Cat. No. M5313, Promega) với cặp mồi P2f: TTTGTTTCGGAAAGGGGAG, P2r: TACACCCCAACTGAGCC theo chu kỳ nhiệt trong bài báo tham khảo (Huang & ctv., 2013). Sản phẩm PCR có kích thước 985 bp được gửi đi giải trình tự tại Nam Khoa Biotek (TP. Hồ Chí Minh), sau đó trình tự được phân tích bằng phần mềm Bioedit (Hall, 1999). Trình tự cũng được so sánh với các trình tự khác có trên Genbank. Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm MEGA7 theo phương pháp maximum-likelihood với giá trị bootstrap 1.000 lần lặp lại (Tamura & ctv., 2013).

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Phân lập vi rút

Trong tổng cộng 12 mẫu bệnh phẩm dùng để phân lập có 1 mẫu gây chết phôi vào ngày thứ 3. Phôi chết có các bệnh tích như xuất huyết dưới da, gan có những đốm xuất huyết lấm tấm (Hình 1) tương tự như những bệnh tích do vi rút Tembusu được miêu tả trước đó (Huang & ctv., 2013; Thontiravong & ctv., 2015). Dịch của trứng cũng được kiểm tra bằng PCR với vi rút Tembusu các mầm bệnh phổ biến khác như

dịch tả vịt, cúm, circovirus. Kết quả là dịch trứng chỉ dương tính với vi rút Tembusu với lượng vi rút rất cao (Ct = 15). Như vậy, có thể kết luận là vi rút Tembusu đã được phân lập thành công. Chủng vi rút này được ký hiệu là NL1. Tỷ lệ phân lập thành công trên phôi trứng không cao (nhỏ hơn 10%) có thể do phôi trứng chứa kháng thể được truyền từ vịt mẹ được chủng vắc-xin. Do hiện nay chưa có xét nghiệm tìm kháng thể vi rút Tembusu nên việc chọn lựa phôi trứng không có kháng thể chống vi rút là không thể.



Hình 1. Phôi vịt chết được mổ khám: (+): dương tính với vi rút Tembusu, (-) đối chứng âm, âm tính vi rút Tembusu.

3.1. Xác định liều gây chết phôi 50%

Bảng 1. Thí nghiệm có kết quả chuẩn độ liều gây chết trứng 50% (ELD50) của vi rút Tembusu

Nồng độ vi rút pha loãng	Số trứng chết / Số trứng tiêm	Phản ứng		Giá trị cộng dồn			Tỷ lệ chết (%)
		Chết	Sống	Chết	Sống	Tỷ số	
10 ⁻³	4/4	4	0	8	0	8/8	100
10 ⁻⁴	3/4	3	1	4	1	4/5	80
10 ⁻⁵	1/4	1	3	1	4	1/5	20
10 ⁻⁶	0/4	0	4	0	8	0/8	0

Vi rút Tembusu (NL1) được pha loãng liên tiếp 10 lần và tiêm mỗi nồng độ vào 4 trứng. Sau đó, quan sát qua từng ngày thì quan sát được số trứng có phôi bị chết và số phôi sống như ở Bảng 1. Dựa vào tỷ lệ sống chết của phôi để tính toán liều ELD50 theo công thức Reed & Muench (1938) để đánh giá kết quả.

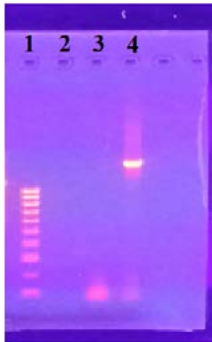
Công thức Reed & Muench:

$$ELD50 = \frac{A - 50}{A - B} \times (b - a) + a$$

$$ELD50 = \frac{80 - 50}{80 - 20} \times [(-5) - (-4)] + (-4) = -4,5$$

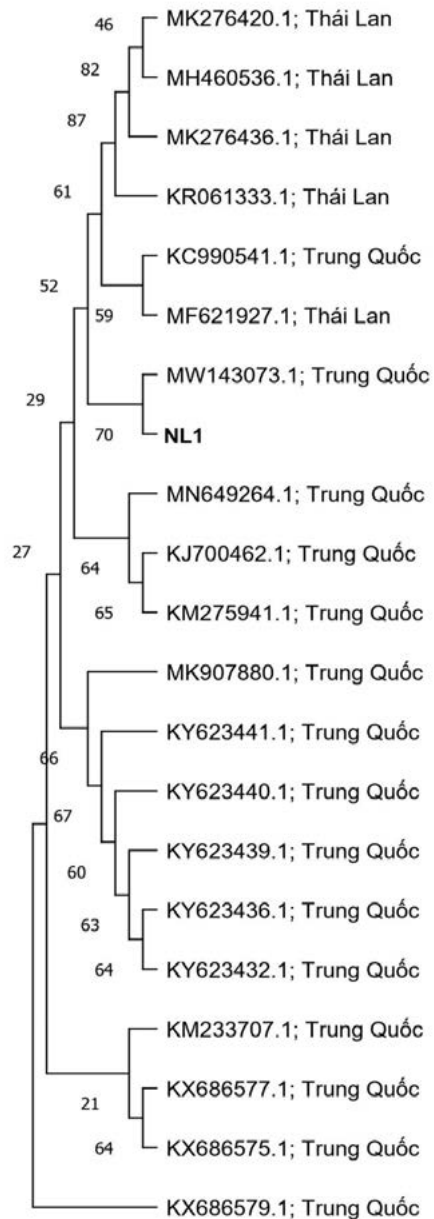
Như vậy, liều gây chết 50% phôi trứng là $10^{-4,5}/0,1$ mL.

3.2. Phát hiện vi rút bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự



Hình 2. Kết quả điện di trong phản ứng PCR khuếch đại một phần gen E của vi rút Tembusu; 1: Thang chuẩn ladder, 2: Đối chứng âm, 3: Mẫu âm tính, 4: Mẫu dương tính có kích thước 985 bp.

Sản phẩm PCR được giải trình tự và sau đó sản phẩm giải trình tự được phân tích bởi phần mềm Bioedit để có được trình tự hoàn chỉnh. Tiếp đến, trình tự này được so sánh (alignment) với 20 trình tự nucleotide của vi rút Tembusu trên Genbank và được xây dựng sơ đồ phả hệ bằng phần mềm MEGA7. Kết quả được thể hiện ở Hình 2.



Hình 3. Cây sinh dòng so sánh một phần gen E (thu được 800 nt) của vi rút Tembusu được phân lập (NL1) và các vi rút Tembusu khác.

Phân tích sinh dòng có thể cho thấy rằng chủng được phân lập (NL1) có tương đồng cao (từ 96,8% tới 98,15%) với 20 trình tự vi rút Tembusu trên vịt ở các nước lân cận Việt Nam như Trung Quốc và Thái Lan (Hình 3).

Tuy nhiên, cần giải trình tự nhiều chủng vi rút Tembusu (từ chủng phân lập hay mẫu thực địa) để có cái nhìn toàn diện hơn cũng như xác định được chủng lưu hành phổ biến nhất (có tỉ lệ giống nhau cao nhất) để có thể phát triển vắc-xin.

Hiện nay, trên thị trường Việt Nam chưa có sản phẩm bộ kit thương mại có thể phát hiện kháng thể với vi rút Tembusu. Trong khi đó, nhu cầu của nhà chăn nuôi vịt là rất lớn vì họ muốn biết đáp ứng miễn dịch sau khi chủng ngừa. Chủng vi rút được phân lập từ nghiên cứu này có thể được sử dụng để phát triển bộ kit trên.

4. Kết Luận

Một chủng vi rút Tembusu (NL1) đã được phân lập với hiệu giá vi rút là $10^{4.5}/0,1$ mL. Qua phân tích di truyền dựa trên một phần gen E thì chủng vi rút này có sự tương đồng khá cao (từ 96,8 tới 98,15%) với các chủng vi rút Tembusu khác ở Trung Quốc và Thái Lan.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có mâu thuẫn giữa các tác giả.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

Hall, T. A. (1999). Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.

Homonnay, Z. G., Kovács, E. W., Bányai, K., Albert, M., Fehér, E., Mató, T., Tatár-Kis, T., & Palya, V. (2014). Tembusu-like flavivirus (Perak virus) as the cause of neurological disease outbreaks in young pekin ducks. *Avian Pathology* 43(6), 552-560. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.973832>.

Hu, T., Wu, Z., Wu, S., Wang, M., Jia, R., Zhu, D., Liu, M., Zhao, X., Yang, Q., Wu, Y., Zhang, S.,

Huang, J., Mao, S., Ou, X., Gao, Q., Sun, D., Liu, Y., Zhang, L., Yu, Y., Chen, S., & Cheng, A. (2021). Substitutions at loop regions of tmuv e protein domain iii differentially impair viral entry and assembly. *Frontiers in Microbiology* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.688172>.

Huang, X., Han, K., Zhao, D., Liu, Y., Zhang, J., Niu, H., Zhang, K., Zhu, J., Wu, D., Gao, L., & Li, Y. (2013). Identification and molecular characterization of a novel flavivirus isolated from Geese in China. *Research in Veterinary Science* 94(3), 774-780. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.11.014>.

Li, N., Lv, C., Yue, R., Shi, Y., Wei, L., Chai, T., & Liu, S. (2015). Effect of age on the pathogenesis of duck tembusu virus in cherry valley ducks. *Frontiers in Microbiology* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00581>.

Liu, P., Lu, H., Li, S., Wu, Y., Gao, G. F., & Su, J. L. (2013). Duck egg drop syndrome virus: An emerging tembusu-related flavivirus in China. *Science China Life Sciences* 56(8), 701-710. <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4515-z>.

Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology* 27(3), 493-497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>.

Su, J., Li, S., Hu, X., Yu, X., Wang, Y., Liu, P., Lu, X., Zhang, G., Hu, X., Liu, D., Li, X., Su, W., Lu, H., Mok, N. S., Wang, P., Wang, M., Tian, K., & Gao, G. F. (2011). Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new tembusu-related flavivirus. *PLoS ONE* 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018106>.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12), 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.

Thontiravong, A., Ninvilai, P., Tunterak, W., Nonthabenjawan, N., Chaiyavong, S., Angkabkingkaew, K., Mungkundak, C., Phuengpho, W., Oraveerakul, K., & Amonsin, A. (2015). Tembusu-related flavivirus in ducks, Thailand. *Emerging Infectious Diseases*

- 21(12), 2164-2167. <https://doi.org/10.3201/eid2112.150600>.
- Yan, L., Yan, P., Zhou, J., Teng, Q., & Li, Z. (2011). Establishing a taqman-based real-time PCR assay for the rapid detection and quantification of the newly emerged duck tembusu virus. *Virology Journal* 8(1), 464. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-464>.
- Yun, T., Ye, W., Ni, Z., Zhang, D., & Zhang, C. (2012). Identification and molecular characterization of a novel flavivirus isolated from pekin ducklings in China. *Veterinary Microbiology* 157(3-4), 311-319. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.01.013>.