

ỨNG DỤNG RT-PCR SỬ DỤNG CẶP MỎI TỰ THIẾT KẾ CHO VÙNG SIÊU BIẾN S1 BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT SỰ LƯU HÀNH CỦA IBV Ở GÀ NUÔI TẠI ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Nguyễn Phúc Khánh¹, Nguyễn Thị Cẩm Loan², Huỳnh Thị Ngọc Dung³

TÓM TẮT

Bệnh viêm phế quản truyền nhiễm (VPQTN) là bệnh phổ biến trên gà, gây thiệt hại kinh tế đáng kể cho người chăn nuôi. Bệnh thường ở thể tiềm ẩn nên rất khó phát hiện; việc thiết kế cặp mồi có thể chẩn đoán và định chủng vi-rút gây bệnh VPQTN trên gà là rất cần thiết và hữu ích. Qua thiết kế cặp mồi từ gene S1 bằng Primer BLAST (NCBI), cặp mồi 5'-CACAGGA(T/C)TGTGC(A/G)TGGTGG-3' (mồi xuôi), 5'-AC(A/C)TCTTGTGGC(T/G/A)GTACCATT-3' (mồi ngược) được thiết kế để xác định sự lưu hành của các chủng vi-rút VPQTN ở một số tỉnh đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Kết quả giám sát bước đầu cho thấy cặp mồi thiết kế phát hiện vi-rút VPQTN lưu hành ở gà nuôi tại ĐBSCL. Kết quả giải trình tự gene S1 cho biết VPQTN lưu hành thuộc các nhóm Massachusetts, QX-like, 793/B và biến chủng ở Việt Nam. Qua phân tích cây phả hệ và so sánh độ tương đồng trình tự các chủng phân lập được với nhau và với các chủng tham chiếu cho thấy các chủng phát hiện ở ĐBSCL có độ tương đồng thấp với nhau (70 – 77%). Trong khi đó, chủng VPQTN-Mass được nhóm chung với các chủng VPQTN nhóm Massachusetts; tương đồng 99,73% với chủng Mass 41 (AY851295). Chủng VPQTN-793/B thuộc nhóm 793/B với độ tương đồng 98,11% so với chủng 4/91 (KF377577) và chủng VPQTN-QX-Like thuộc nhóm QX-Like với độ tương đồng 90,87% so với chủng Sczy3 (JF732903). Đặc biệt kết quả nghiên cứu đã phát hiện biến chủng VPQTN-VN, kết quả phân tích phả hệ di truyền và so sánh độ tương đồng cho thấy VPQTN-VN có độ tương đồng thấp so với các chủng phát hiện được ở ĐBSCL và các chủng tham chiếu (70 – 74%).

Từ khóa: Đồng bằng sông Cửu Long, gà, vi-rút viêm phế quản truyền nhiễm.

1. MỞ ĐẦU

Bệnh viêm phế quản truyền nhiễm (VPQTN) là một trong những bệnh phổ biến gây thiệt hại kinh tế đáng kể đến nhà chăn nuôi; bệnh làm giảm tăng trọng đối với gà thịt (tỷ lệ nhiễm bệnh rất cao 10-100%, tỷ lệ tử vong 30-80% tùy thuộc vào chủng vi-rút gây bệnh); giảm năng suất trứng (70%) và chất lượng trứng đối với gà đẻ (Jackwood và de Wit, 2013) [1]. Bệnh VPQTN gây ra do Gamma coronavirus. Gene S1 của vi-rút đóng vai trò quan trọng trong việc xác định kiểu gene của vi-rút vì nó chứa những vùng siêu biến đổi (Lee *et al.*, 2003) [2] và mang những quyết định kháng nguyên đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch ở vật chủ nhiễm bệnh (Lee *et al.*, 2003; Jia *et al.*, 1996) [2, 3]. Theo Caron (2010) [4], trình tự amino axit của đoạn S1 là phần biến đổi nhất

của protein S; kiểu gene của vi-rút VPQTN khác nhau có trình tự amino axit tương đồng dưới 40%. Do đó S1 hoặc một phần của đoạn S1 (chứa vùng siêu biến đổi) thường được sử dụng để xác định kiểu gene của vi-rút VPQTN.

Phòng bệnh sử dụng vắc-xin là biện pháp quan trọng và chủ yếu trong quản lý dịch bệnh VPQTN. Tuy nhiên, việc phòng bệnh bằng vắc-xin ở bệnh VPQTN thường không hiệu quả do rất ít hoặc không có bảo hộ chéo giữa các loại vắc-xin với nhau (Jackwood và de Wit, 2013) [1] và hiện tượng tái tổ hợp trong bộ gen của vi-rút (Jackwood, 2012) [5]. Do đó, gà đã tiêm vắc-xin phòng bệnh VPQTN vẫn có thể bị nhiễm bệnh.

Nghiên cứu gần đây về bệnh VPQTN trên gà thịt ở Lâm Đồng – Đông Nam bộ của Võ Thị Trà An và cs (2012) [6] cho thấy 16,6% mẫu xét nghiệm dương tính với bệnh VPQTN. Theo Nguyễn Thị Loan và cs (2016) [7], tỷ lệ mẫu bệnh phẩm từ gà đẻ tại miền Bắc dương tính với bệnh VPQTN là 47,88%. Hiện nay rất ít công trình nghiên cứu về bệnh VPQTN ở khu

¹ Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Nông nghiệp, Trường Cao đẳng Công đồng Vĩnh Long

³ Sở Nông nghiệp và PTNT thành phố Cần Thơ

Email: npkhanh@ctu.edu.vn

vực ĐBSCL; với sự phát triển của khoa học và công nghệ, nhiều kỹ thuật hiện đại đã được sử dụng nhằm chẩn đoán nhanh và chính xác bệnh VPQTN như kỹ thuật Reverse transcription Polymerase chain reaction (RT-PCR), real time PCR. Tuy nhiên ở Việt Nam, đặc biệt là ở khu vực ĐBSCL việc tiếp cận với những kỹ thuật này còn nhiều hạn chế. Dựa trên những cơ sở trên, nghiên cứu "Ứng dụng RT-PCR sử dụng cặp mồi tự thiết kế cho vùng siêu biến S1 bước đầu khảo sát sự lưu hành của IBV ở gà nuôi tại đồng bằng sông Cửu Long" được thực hiện.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu thận và khí quản của gà bị nhiễm bệnh VPQTN được thu thập ở các trại gà thuộc một số tỉnh ĐBSCL (Vĩnh Long, Tiền Giang, Sóc Trăng và Hậu Giang) được cung cấp từ phòng thí nghiệm vi-rút học Bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

Trizol[®] Reagent (Invitrogen, USA), bộ kit tổng hợp cDNA MMLV Reverse Transcriptase 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Epicentre, Madison, WI), bộ kit KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems, Mỹ) và những thiết bị, dụng cụ, hóa chất cần thiết khác.

2.2. Địa điểm nghiên cứu

Thiết kế cặp mồi và xác định sự lưu hành của vi-rút VPQTN ở một số tỉnh ĐBSCL được thực hiện tại phòng thí nghiệm vi-rút học, Bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

2.3. Phương pháp thiết kế cặp mồi

Cặp mồi được thiết kế sử dụng NCBI Primer 3 và công cụ BLAST (National Center for Biotechnology Information (NCBI)). Trình tự nucleotic ở vị trí 19.900 - 22.262 (chứa gene S1) của bộ gene vi-rút VPQTN KX252788.1 CK/CH/LHLJ/08-6 (có độ tương đồng cao với chủng KY992864.1 VNUIA8-Viet Nam) được chọn làm khuôn để thiết kế cặp mồi.

Độ phù hợp của cặp mồi được đánh giá bằng cách so sánh trình tự nucleotic của mồi xuôi và mồi ngược với trình tự của 33 chủng tham chiếu trong đó có các chủng thuộc nhóm Massachusetts, QX, 793/B và các biến chủng thuộc nhiều quốc gia khác. Phân mềm MEGA 6 được sử dụng để sắp xếp và so sánh trình tự nucleotic của cặp mồi với các chủng tham

chiếu. Cặp mồi được chọn là cặp mồi có trình tự nucleotic của mồi xuôi và mồi ngược giống với hầu hết các chủng tham chiếu (>60%).

2.4. Phương pháp RT-PCR

Ly trích RNA tổng số: Mẫu bệnh phẩm của gà bị nhiễm bệnh VPQTN chủng Massachusetts, QX-like, 793/B và biến chủng Việt Nam được ly trích RNA tổng số sử dụng Trizol[®] Reagent (Invitrogen, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tổng hợp cDNA và PCR: RNA của vi-rút sau khi ly trích sẽ được tổng hợp thành cDNA sử dụng bộ kit MMLV Reverse Transcriptase 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Epicentre, Madison, WI). Quá trình tổng hợp cDNA được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. cDNA sau khi tổng hợp có thể sử dụng ngay hoặc trữ ở -20°C trong 1-2 tuần.

Sau khi tổng hợp cDNA hỗn hợp phản ứng và chu trình nhiệt của PCR được chuẩn bị theo hướng dẫn nhà sản xuất bộ kit KAPA HiFi HotStart ReadyMix sử dụng cặp mồi được thiết kế từ đoạn S1 như được mô tả ở phương pháp thiết kế cặp mồi. Sản phẩm PCR được phát hiện thông qua điện di trên đĩa thạch agarose 1% và hình ảnh sản phẩm được chụp lại sử dụng đèn UV.

Giải trình tự: Sau khi điện di, những sản phẩm duy nhất có 1 băng như mong đợi được tinh sạch và sử dụng cho giải trình tự. Trường hợp sản phẩm có nhiều hơn 1 băng, cần xác định băng có kích thước mong đợi dựa vào thang chuẩn. Dùng dao cắt vô trùng cắt dây băng đó, tinh sạch gel chứa băng đã cắt. Sản phẩm sau khi tinh sạch sẽ được đưa đi giải trình tự bằng kỹ thuật Sanger tại Công ty Phú Sa.

2.5. Xử lý số liệu

Trình tự nucleotic được xử lý, lập cây phả hệ, so sánh độ tương đồng giữa các chủng VPQTN-Mass, VPQTN-793B, VPQTN-QX-like, VPQTN-VN và các chủng tham chiếu được phân tích bởi phần mềm Mega 6 và BioEdit 7.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thiết kế cặp mồi đặc hiệu

Sau khi thiết kế cặp mồi sử dụng Primer3, NCBI hệ thống thiết kế 10 cặp mồi đạt chuẩn để phát hiện vi-rút VPQTN. Tuy nhiên vì gene S1 của vi-rút VPQTN chưa được nhiều biến đổi nên những cặp mồi do hệ thống thiết kế không phát hiện hầu hết các chủng đã được công bố trên ngân hàng gene (qua so

sánh trình tự cặp mới với 33 chủng tham chiếu). Do đó để có thể phát hiện được hầu hết các chủng vi-rút

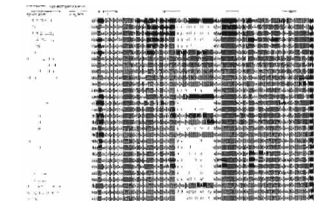
VPQTN, degenerated primers đã được thiết kế (Bảng 1).

Bảng 1. Degenerated primers được thiết kế cho chẩn đoán và định chủng vi-rút VPQTN gây bệnh trên gà

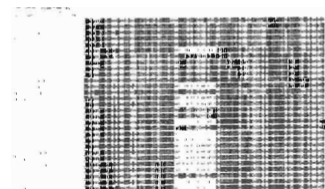
Mũi	Chiều 5'-3'	Vị trí	Tm	Kích thước (bp)
IBF	CACAGGA(T/C)TGTGC(A/G)TGGTGG	20071- 20090	59,47	955
IBR	AC(A/C)TCTTGTGC(T/G/A)GTACCATT	21026- 21007	59,82	

Degenerated primers sau khi thiết kế được kiểm tra self-dimers và cross-primer-dimers sử dụng trang web <https://www.thermofisher.com/vn/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>. Kết quả cho thấy không có self-dimers và cross-primer dimers xuất hiện ở cặp primers vừa thiết kế.

3.2. Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu của cặp mới



Hình 1. Kiểm tra độ phù hợp giữa trình tự nucleotic của đoạn mới xuôi với 33 chủng tham chiếu được tải từ NCBI

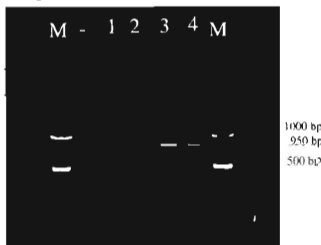


Hình 2. Kiểm tra độ phù hợp giữa trình tự nucleotic của đoạn mới ngược với 33 chủng tham chiếu được tải từ NCBI

Sau khi cặp mới được thiết kế, mức độ phù hợp của cặp mới được xác định dựa vào việc so sánh trình tự của cặp mới với đại diện các chủng vi-rút VPQTN đã được công bố trên ngân hàng gene NCBI. Kết quả

so sánh trình tự mỗi ngược và mỗi xuôi với 33 chủng tham chiếu trong đó có các chủng thuộc nhóm Massachusetts, QX-like, 793/B và các biến chủng thuộc nhiều quốc gia khác cho thấy đoạn mới xuôi phù hợp hơn 26/33 (79%) các chủng tham chiếu (Hình 1). Trong khi đó đoạn mới ngược phù hợp hơn 27/33 (82%) so với các chủng tham chiếu (Hình 2).

Những mẫu bệnh phẩm dương tính với bệnh VPQTN được thu thập tại các trại gà ở ĐBSCL (đã được kiểm tra trước đó bằng kỹ thuật realtime RT-PCR trên đoạn gene N) được sử dụng để kiểm tra kết quả thiết kế mới đồng thời xác định sự lưu hành của vi-rút VPQTN ở ĐBSCL. Những mẫu bệnh phẩm sử dụng để kiểm tra đã được xác định trước đó thuộc genotype Massachusetts (VPQTN-Mass), 793/B (VPQTN-793/B), QX-like (VPQTN-QX-Like) và biến chủng (VPQTN-VN) (phân tích dựa trên trình tự của gene N). Kết quả kiểm tra cho thấy cặp mới được thiết kế có thể phát hiện vi-rút VPQTN genotype Massachusetts, QX-like, 793/B và chủng phân lập được ở Việt Nam với độ băng rất rõ và không có băng không đặc hiệu (Hình 3).



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR của vi-rút VPQTN trên gà

Chú thích: M: Đường chuẩn; (-): Đối chứng âm; 1: VPQTN-Mass (Việt Nam); 2: VPQTN-QX-Like (Việt Nam); 3: VPQTN-793/B (Việt Nam); 4: VPQTN-VN

3.3. Kết quả phân tích cây phả hệ và độ tương đồng

Trình tự nucleocut của 4 chủng VPQTN-Mass, VPQTN-793/B, VPQTN-QX-Like và VPQTN-VN được giải sử dụng phương pháp Sanger sequencing. Phân tích phả hệ và độ tương đồng giữa các chủng ở ĐBSCL với các chủng tham chiếu được thực hiện sau khi sắp xếp (alignment), cắt (trimming) nhằm đảm bảo trình tự nucleocut của các chủng ở ĐBSCL với các chủng tham chiếu như nhau (912 bp). Kết quả phân tích cây phả hệ một phần gene S1 (Hình 4) chứng tỏ các chủng VPQTN-Mass, VPQTN-793/B, VPQTN-QX-Like lần lượt được nhóm chung với vi-rút VPQTN Massachusetts, 4/91 và QX-like. Riêng chủng VPQTN-VN nằm ở nhóm hoàn toàn tách biệt với các nhóm khác.

Kết quả phân tích độ tương đồng của các chủng ở ĐBSCL với các chủng tham chiếu cho thấy VPQTN-Mass, VPQTN-793/B và VPQTN-QX-Like có độ tương đồng cao lần lượt với VPQTN Massachusetts (99,73%), 4/91 (98,11%) và QX-like (90,87%). Đặc biệt, chủng VPQTN-VN có độ tương đồng thấp với các chủng còn lại và các chủng tham

chiếu (70 – 74%) (Bảng 2). Đây có thể là biến chủng VPQTN có nguồn gốc từ Việt Nam. Cần có những nghiên cứu sâu hơn về chủng này như đặc tính gây bệnh, giải trình tự bộ gene của vi-rút.



Hình 4. Cây phả hệ một phần gene S1 của các chủng VPQTN-Mass, VPQTN-793/B, VPQTN-QX-Like, VPQTN-VN với các chủng tham chiếu

Bảng 2. Tỷ lệ tương đồng nucleotic giữa các chủng VPQTN-Mass, VPQTN-793B, VPQTN-QX-Like, VPQTN-VN với các chủng tham chiếu

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 VPQTN-Mass								
2 VPQTN-VN	73,46							
3 VPQTN-793/B	74,11	70,34						
4 VPQTN-QX-Like	75,50	72,09	77,22					
5 AY851295-Mass-41	99,73	73,84	74,48	75,13				
6 JF732903-Sczy3-QX-Like	75,82	74,04	77,13	90,87	76,19			
7 KF377577-4-91	74,84	69,97	98,11	79,00	75,22	78,60		
8 GU393334-Grey	81,46	73,82	77,11	76,53	81,80	79,07	77,11	

Tỷ lệ tương đồng nucleotic (%)

3.4. Thảo luận

Bệnh VPQTN trên gà là bệnh cấp tính, nguy hiểm gây thiệt hại kinh tế đáng kể đến người chăn nuôi. Bệnh gây giảm tăng trọng đối với gà giò và giảm sản lượng, chất lượng trứng đối với gà mái đẻ hoặc gà giống. Phòng bệnh bằng vắc-xin không mang lại hiệu quả cao do tính chất phức tạp của vi-rút VPQTN. Vi-rút VPQTN có nhiều biến chủng do đây là RNA vi-rút, có kích thước lớn (27,7 Kb), tạo điều kiện cho nhiều đột biến xảy ra. Ngoài ra, tái tổ hợp cũng là một yếu tố chủ yếu tạo nhiều biến chủng: đặc biệt tái tổ hợp xảy ra ở vùng S1 (Lee và Jackwood, 2000) [8]. Những nghiên cứu trước đây

cho thấy vi-rút VPQTN hiện diện ở hầu hết các nước trên thế giới. Vi-rút VPQTN Massachusetts là chủng phổ biến nhất, hiện diện ở hầu hết các quốc gia trên thế giới ngoại trừ ở Úc. Kể đến là vi-rút VPQTN QX-Like và 793/B được phát hiện nhiều ở các nước châu Á, châu Âu và châu Phi. Ngoài ra, rất nhiều biến chủng vi-rút VPQTN được công bố ở nhiều nước trên thế giới: một số chủng chỉ hiện diện ở một khu vực hoặc mờ nhạt; chẳng hạn các biến chủng ở châu Âu (D1466, Italy-02,...), Úc (Vic S, Q1,...), Malaysia (V9/04), Trung Quốc, Mỹ (Arkansas, California, GA98,...) (Jackwood, 2012) [5]. Do đó, việc chẩn đoán và xác định sự lưu hành của vi-rút VPQTN ở

ĐBSCL là thực sự cần thiết. Phương pháp reverse transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) là một trong những phương pháp được sử dụng nhiều nhất bởi vì phương pháp này cho kết quả nhanh và chính xác (Zwaagstra *et al.* 1992) [9]. Nhiều nghiên cứu đã sử dụng phương pháp RT-PCR với cặp mồi được thiết kế từ gene N hoặc untranslated region (UTR) để chẩn đoán bệnh VPQTN bởi vì gene hoặc vùng này rất ít biến đổi ở các chủng vi-rút VPQTN (Zwaagstra *et al.*, 1992; Adzhar *et al.*, 1996) [9, 10]. Keeler *et al.*, (1998) [11] đã thành công trong phân biệt các chủng Massachusetts, Connecticut, Arkansas, JMK, Delaware (DE/072/92) và California (CA/633/85) dựa vào các cặp mồi đặc hiệu được thiết kế từ trình tự gene S1. Tuy nhiên nghiên cứu của Keeler và cs chỉ giới hạn ở những chủng vi-rút VPQTN lưu hành ở Mỹ. Hơn nữa Jahantigh *et al.*, (2013) [12] đã công bố phát hiện vi-rút VPQTN các chủng Massachusetts, 4/91 và D274 bằng kỹ thuật RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu được thiết kế trên đoạn S1. Tuy nhiên những nghiên cứu này sử dụng nhiều cặp mồi và chưa có công bố về cặp mồi đặc hiệu phát hiện chủng QX hoặc QX-like. Ở nghiên cứu này degenerated primers được thiết kế nhằm khắc phục những hạn chế của những nghiên cứu trước đó. Để thiết kế degenerated primers ở thí nghiệm trình tự đoạn gene có chứa gene S1 của những chủng tham chiếu đại diện cho những serotype khác nhau (Massachusetts, 793/B, QX-like, D274 và các biến chủng phổ biến ở nhiều quốc gia khác nhau) của vi-rút VPQTN được sắp xếp (aligned) và so sánh. Từ đó chọn ra vùng ít biến đổi giữa các chủng tham chiếu để nhập các thông số (vị trí bắt đầu và kết thúc của mỗi xuôi và mỗi ngược) ở Primer blast (NCBI). Hơn nữa sự thành công của việc thiết kế cặp mồi cũng được thể hiện ở kết quả PCR, phân tích hệ di truyền và độ tương đồng. Cặp mồi được thiết kế có thể phát hiện được các chủng VPQTN genotype Massachusetts, 793/B, QX-like và chủng phân lập được ở Việt Nam. Sự hiện diện của các chủng vi-rút VPQTN genotype Massachusetts và 793/B ở các trại gà khu vực ĐBSCL có thể do những trại gà ở đây sử dụng vắc-xin phòng bệnh VPQTN được sản xuất từ 2 nhóm này (vắc-xin sống nhược độc). Như đã đề cập ở trên vi-rút VPQTN rất phức tạp; đột biến và tái tổ hợp thường xuyên xảy ra và là nguyên nhân dẫn đến sự xuất hiện những biến thể vi-rút VPQTN Massachusetts và 793/B.

Theo nghiên cứu trước đó của Võ Thị Trà An và cs (2012) [6], có sự lưu hành của các chủng vi-rút VPQTN genotype Massachusetts và 793/B trên đàn gà thịt tại tỉnh Lâm Đồng. Ngoài ra, chưa có công bố nào chứng tỏ sự hiện diện của chủng QX-like tại Việt Nam; đặc biệt những công bố ứng dụng kỹ thuật RT-PCR sử dụng cặp mồi được thiết kế từ vùng S1. Đáng chú ý ở đây, nghiên cứu đã phát hiện sự hiện diện của chủng VPQTN-VN, hoàn toàn tách biệt với các chủng phân lập khác và các chủng tham chiếu (tương đồng 70 - 74%). Theo Jackwood (2012) [5], sự lưu hành của các chủng vi-rút VPQTN không phụ thuộc vào giống, giới tính, độ tuổi mà phụ thuộc vào yếu tố địa lý. Nhiều biến chủng đã được công bố và những biến chủng này chỉ xuất hiện ở một quốc gia hoặc khu vực. Do đó, nghiên cứu sâu về chủng VPQTN-VN như phân lập, giải trình tự bộ gene, kiểm tra tình trạng bệnh... nên được tiến hành nhằm phát triển vắc-xin phòng bệnh VPQTN ở ĐBSCL và trong cả nước.

4. KẾT LUẬN

Đã thiết kế được cặp mồi có thể sử dụng để phát hiện các chủng VPQTN. Kết quả khảo sát sự lưu hành của vi-rút VPQTN ở ĐBSCL cho thấy, các chủng lưu hành thuộc nhóm vắc-xin kinh điển như Massachusetts, 4/91, QX-like và biến chủng vi-rút VPQTN ở vùng ĐBSCL, Việt Nam. Kết quả bước đầu về sự lưu hành của vi-rút và biến chủng VPQTN ở một số tỉnh khu vực ĐBSCL cho thấy có thể ứng dụng phương pháp này để khảo sát sự lưu hành của bệnh và căn bệnh trong phạm vi toàn bộ ĐBSCL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jackwood, MW and de Wit, S (2013). Infectious bronchitis. Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL and Nair V (Eds.), Disease of Poultry, Wiley-Blackwell, 139-159.
2. Lee CW, Hilt DA, Jackwood MW (2003). Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 15: 344-348.
3. Jia W, Wang X, Parrish CR, Naqi SA (1996). Analysis of the serotype specific epitopes of avian infectious bronchitis virus strains Ark99 and Mass41. *Journal of Virology*; 70: 7255-7259.

4. Caron LF (2010). Etiology and immunology of infectious bronchitis virus, Workshop: Infectious Bronchitis (IB) in the Brazilian Poultry Industry, p.5.

5. Jackwood, MW (2012). Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Diseases*, 56, 634-641.

6. Võ Thị Trà An, Nguyễn Thị Kim Yến, Hồ Hoàng Dũng (2012). Phân lập, định serotype virus viêm phế quản truyền nhiễm tư gà thịt. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật thú y* 19:5-9.

7. Nguyễn Thị Loan, Lê Đình Quyên, Dương Hồng Quân, Lê Huỳnh Thanh Phương, Nguyễn Bá Hiền, Lê Văn Phan (2016). Ứng dụng kỹ thuật RT-PCR để chẩn đoán bệnh viêm phế quản truyền nhiễm (Infectious bronchitis) ở gà đẻ trứng tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 14:1387-1394.

8. Lee, CW and Jackwood MW (2000). Evidence of genetic diversity generated by recombination

among avian coronavirus IBV. *Achieve Virology*. 145:2135-2148.

9. Zwaagstra KA, van der Zeijst B,AM, and Kusters JG (1992). Rapid detection and identification of avian infectious bronchitis virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 79-84.

10. Adzhar A, Shaw K, Britton P, Cavanagh D (1996). Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, 25: 817-836.

11. Keeler, CL Jr, Reed, KL, Nix, WA, and Gelb, J Jr. (1998). Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. *Avian Diseases*, 42, 275-284.

12. Jahantigh M, Salari S, and Hedayati M (2013). Detection of infectious bronchitis virus serotypes by reverse transcription polymerase chain reaction in broiler chickens. Springerplus 2.

APPLICATION OF RT-PCR USING PRIMERS DESIGNED FROM HYPERVARIATION REGION OF S1 GENE FOR INITIAL SURVEILLANCE OF THE CIRCULATION OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUSES IN MEKONG DELTA

Nguyen Phuc Khanh, Nguyen Thi Cam Loan, Huynh Thi Ngoc Dung

Summary

Infectious bronchitis (IB) is a common disease in chickens, remarkably causes major economic losses to poultry farmers. Chickens infected with infectious bronchitis virus (IBV) usually have no specific clinical signs (chronic form) so it is very difficult to detect the IB based on observation of the clinical signs. Therefore, primer design for detection and classification of IBV is extremely necessary and useful. In the present study, primers were designed from S1 gene using Primer BLAST (NCBI). The designed forward and reverse primers such as 5'-CACAGGA(T/C)TGTC(A/G)TGGTGG-3', 5'-AC(A/C)TCTTGTC(T/G/A)GTACCA]T-3' used for determining the circulation of IBV strains detected in Mekong delta. The results of initial surveillance showed the designed primers were able to detect IBVs circulating in chickens in the Mekong delta. Phylogenetic and pairwise sequence comparison (PASC) analysis of sequences between infected and reference strains indicated that the sequences of detected strains in the Mekong Delta had low identity (70 - 77%). Meanwhile, VPQTN-Mass, VPQTN-793/B and VPQTN-QX-Like strains was grouped into Massachusetts [shared 99.73 similarity to Mass 41 (AY851295)], 793/B [shared 98.11 similarity to 4/91 (KF377577)] and QX-like [shared 90.87% similarity to Sczy3 (F732903)] genotypes, respectively. Remarkably, Viet Nam variant strain was detected in the Mekong delta; phylogenetic and PASC analysis indicated that VPQTN-VN had low identity compared to other detected strains and reference strains (70 - 74% nucleotide similarity).

Keywords: *Mekong delta, chicken, infectious bronchitis virus (IBV).*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Việt Khổng

Ngày nhận bài: 6/11/2019

Ngày thông qua phản biện: 6/12/2019

Ngày duyệt đăng: 13/12/2019