

**NGHIÊN CỨU PHÁT HIỆN VIRUS GÂY BỆNH THỐI ĐEN MŨ CHỨA
(BLACK QUEEN CELL VIRUS) TRÊN ONG MẬT
Ở MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM**

HÀ THỊ QUYẾN,
*Trường Đại học Công nghệ,
Đại học Quốc gia Hà Nội*

HÀ THỊ THU, BÙI THỊ THÙY DƯƠNG, ĐỒNG VĂN QUYÊN
*Viện Công nghệ sinh học,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Việt Nam có vị trí địa lý và thời tiết rất thuận lợi cho việc phát triển nghề nuôi ong mật. Theo thống kê, Việt Nam hiện đứng thứ sáu về xuất khẩu mật ong trên thế giới và đứng thứ hai ở châu Á chỉ sau Trung Quốc. Dữ liệu xuất khẩu năm 2013 cho thấy, Việt Nam đã xuất khẩu khoảng 34.000 tấn mật ong, đạt kim ngạch khoảng 85 triệu USD và tạo được công ăn việc làm cho hàng triệu người lao động.

Mặc dù vậy, những năm gần đây, ngành nuôi ong đang phải đối mặt với việc xuất khẩu không ổn định do tình hình dịch bệnh và vấn đề tồn dư kháng sinh có trong mật ong. Những nghiên cứu về bệnh ong mật thời gian gần đây cho thấy, nguyên nhân chính gây tổn thất cho nghề nuôi ong ở Việt Nam do ong bị mắc bệnh, chủ yếu do virus. Vì thiếu kiến thức về bệnh ong mật, người nuôi ong buộc sử dụng kháng sinh để kiểm soát tất cả các loại bệnh trong đó cả bệnh do virus, vi khuẩn.

Bệnh thối đen mũ chúa trên ong mật do virus black queen cell (BQCV) gây ra là một trong những bệnh phổ biến và gây tổn thất lớn cho người nuôi ong ở Việt Nam. Khi bị nhiễm BQCV, thành tế bào của mũ chúa xuất hiện các mảng vá có màu đen, do đó người ta gọi virus này là thối đen mũ chúa (Bailey & Wood, 1977).



(a)

(b)

Hình 1: (a) Ấu trùng chúa của ong mật bị nhiễm BQCV; (b) Nhộng bị nhiễm BQCV

BQCV có đường kính 30 nm và chứa genom là RNA sợi đơn gồm 8550 nucleotide (không kể đuôi polyA). Genome chứa hai khung đọc mở ORF1 và ORF2 mã hóa cho các protein cấu trúc và không cấu trúc (Kondreddy et al., 2013; Leat et al., 2000).

Để chẩn đoán bệnh do virus này, ngoài các phương pháp chẩn đoán như xác định triệu chứng lâm sàng của bệnh còn có các phương pháp khác như xét nghiệm sinh học, huyết thanh học và sinh học phân tử. Đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng các phương pháp phân tử trong việc phát hiện bệnh do các virus gây ra ở ong mật như phương pháp miễn dịch (ELISA, Western blot,...) hoặc RT-PCR, multiplex RT-PCR, RFLP,...(Grabensteiner et al., 2007; Mongi et al., 2001).

Các phương pháp huyết thanh thường bị hạn chế đối với nhiều phòng thí nghiệm, bởi vì cần phải sản xuất số lượng lớn các hạt virus tinh sạch để tạo ra một thư viện các kháng huyết thanh phù hợp. Trong khi đó, kỹ thuật chẩn đoán sử dụng RT-PCR lại có thể thực hiện nhanh chóng trong những phòng thí nghiệm độc lập chỉ dựa vào quy trình cơ bản và các trình tự mỗi đặc hiệu.

Hơn nữa, việc chẩn đoán virus từ các bệnh phẩm thực địa hiện nay đều phải dùng bộ kit mua của nước ngoài. Đây là một hạn chế vì vừa tốn kém, vừa không chủ động và kịp thời phòng chống được bệnh dịch trong nước.

Để định hướng cho việc nghiên cứu chế tạo bộ kit chẩn đoán virus BQCV ở ong mật, chúng tôi bước đầu thực hiện nghiên cứu phát hiện virus BQCV bằng RT-PCR. Trên các mẫu ong mật ở Việt Nam.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Mẫu RNA dương tính chuẩn (tách từ ong nhiễm BQCV) và mẫu RNA âm tính chuẩn (tách từ ong trưởng thành khỏe mạnh) do Trung tâm kiểm dịch động vật, thực vật và thủy sản Hàn Quốc (QIA) cung cấp, ký hiệu là BQCV(+) và BQCV(-).

Trong năm 2013, có 80 mẫu ấu trùng và ong trưởng thành được thu thập tại 90 đàn ong ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam, bao gồm Điện Biên, Hòa Bình, Bắc Giang, Hưng Yên và Nghệ An. Mỗi đàn thu gồm cả mẫu ấu trùng và ong trưởng thành. Mẫu được ký hiệu bằng các chữ cái như ong trưởng thành ký hiệu là T và ấu trùng ký hiệu là A. Mỗi tỉnh thu 18 mẫu ong trưởng thành và 18 mẫu ấu trùng. Mẫu được bảo quản trong ethanol 100% và giữ ở -20°C cho đến khi sử dụng.

2. Hóa chất, sinh phẩm

Bao gồm các bộ kit: Bộ kit RNeasy Mini Kit 250 của hãng QIA gen để tách RNA tổng số; bộ kit SuperScript™ First-StrDNA Synthesis System (Invitrogen) để tạo cDNA; TA cloning Kit (Invitrogen) để tách dòng gen; GenJET™ PCR Purification Kit (Fermentas) để tinh sạch vector tái tổ hợp và sản phẩm PCR; BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) để đọc trình tự gen.

3. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết RNA tổng số

Các mẫu ong trưởng thành và ấu trùng được nghiền trong nitơ lỏng cho tới khi mẫu tan thành dạng bột mịn. Sau đó, sử dụng bộ *RNeasy Mini Kit 250* của hãng QIA gen để tách RNA theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cuối cùng RNA được hòa lại trong 30 µl nước khử DEPC. Nồng độ và độ tinh sạch của RNA được kiểm tra trên máy đo quang phổ Nanodrop.

Khuếch đại đoạn DNA đặc hiệu của BQCV (RT-PCR)

a. Tổng hợp cDNA từ RNA tổng số

Quy trình và thành phần phản ứng như sau:

Hỗn hợp 1 gồm: RNA tổng số tách từ mẫu ấu trùng và ong trưởng thành (30 ng–50 ng): 7 µl; Môi ngẫu nhiên (50 ng/µl): 3 µl; Ủ hỗn hợp 1 bằng máy PCR ở 65°C trong 5 phút. Sau đó để trên đá 1 phút.

Hỗn hợp 2 gồm: 5X RT Buffer(0,5M Tris-HCl pH-8,3; 0,75M KCl; 0,03M MgCl₂): 4µl; dNTP mix (10 mM): 2 µl; DTT (0,1 mM): 2 µl; Inibitor Rnase (20 u/µl):1 µl; Reverse transcriptase (20 u/µl): 1µl.

Bổ sung 10 µl hỗn hợp 2 vào hỗn hợp 1 để thực hiện phản ứng RT-PCR

Chu trình nhiệt phản ứng tổng hợp cDNA từ RNA tổng số trên máy PCR như sau: 25°C trong 5 phút; 42°C trong 60 phút và 70°C trong 5 phút.

b. Khuếch đại gen từ cDNA bằng PCR

Cặp mồi thiết kế cho việc khuếch đại một đoạn gen đặc hiệu của virus BQCV có trình tự như sau: BQCV-F: 5'- TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC -3'

BQCV-R: 5'- GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC -3'

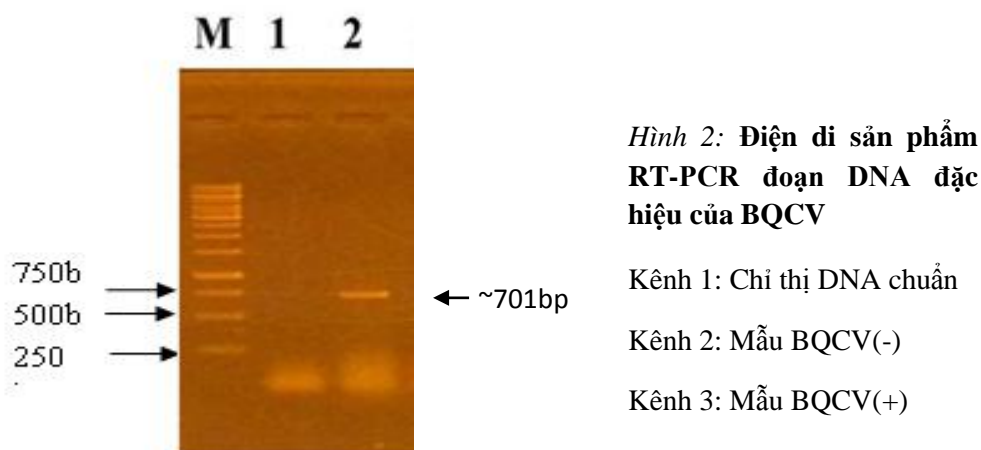
Sản phẩm sau khi khuếch đại sẽ có chiều dài khoảng 701bp

Chu kỳ nhiệt phản ứng khuếch đại: 94°C trong 3 phút; 35 chu kỳ (gồm 94°C trong 40 giây; 56°C trong 40 giây; 72°C trong 1 phút); 72°C trong 8 phút; giữ mẫu ở 4°C.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kiểm tra tính đặc hiệu của cặp mồi đã thiết kế

Từ mẫu RNA dương tính và âm tính chuẩn, chúng tôi tiến hành tạo cDNA bằng mồi ngẫu nhiên để sử dụng cDNA làm khuôn cho phản ứng PCR khuếch đại đoạn DNA đặc hiệu của BQCV. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR được thể hiện ở hình 2.

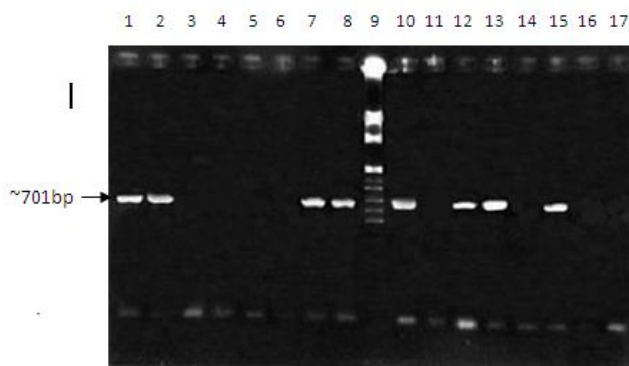


Theo kết quả thiết kế mồi, sản phẩm PCR đoạn DNA của BQCV sẽ có kích thước khoảng 701bp. Hình ảnh điện di cho thấy, khi điện di sản phẩm RT-PCR, mẫu BQCV(+) xuất hiện một băng duy nhất có kích thước đúng bằng kích thước của đoạn DNA đặc hiệu của BQCV (khoảng 701bp), còn mẫu BQCV(-) không thấy xuất hiện sản phẩm. Tuy nhiên, để chắc chắn sản phẩm PCR thu được là của BQCV, chúng tôi đã đọc trình tự nucleotide và so sánh với một số trình tự tương đồng trên GeneBank có số đăng ký KP119603.1, KM255694.1, JX149531.1, AF183905.1, NC_003784.1. Kết quả so sánh (không trình bày ở đây) cho thấy sự tương đồng đạt > 96%. Như vậy, cặp mồi mà chúng tôi thiết kế rất đặc hiệu cho BQCV và có thể sử dụng cặp mồi này cũng như quy trình RT-PCR để điều tra phát hiện các mẫu ong nhiễm BQCV trên thực địa. Sản phẩm PCR đoạn DNA của BQCV nói trên được tách dòng trong vector tách dòng pCR2.1 và được sử dụng làm đối chứng dương trong các nghiên cứu tiếp theo.

2. Phát hiện sự có mặt của BQCV trên các mẫu ong

Áp dụng quy trình RT-PCR có sử dụng cặp mồi đã thiết kế ở trên, chúng tôi tiến hành phát hiện sự có mặt của BQCV trên các mẫu ong ở 5 tỉnh: 180 mẫu RNA tổng số đã được tách chiết

từ 180 mẫu ong trưởng thành và ấu trùng và được phiên mã ngược thành cDNA rồi tiến hành thực hiện phản ứng PCR. Hình 3 trình bày kết quả điện di sản phẩm RT-PCR của một số mẫu ong trưởng thành và ấu trùng đại diện cho 5 tỉnh trong đó có sử dụng mẫu đối chứng dương là BQCV(+).



Hình 3: Điện di sản phẩm RT-PCR đoạn DNA đặc hiệu của BQCV

Kênh 1, 2: Mẫu ong trưởng thành ở Điện Biên; Kênh 3: Mẫu ấu trùng ở Điện Biên

Kênh 4, 5: Mẫu ấu trùng và ong trưởng thành ở Hòa Bình;

Kênh 6, 7, 8,: Mẫu ong trưởng thành ở Bắc Giang;

Kênh 9: Chỉ thị DNA chuẩn; Kênh 10: Mẫu BQCV(+)

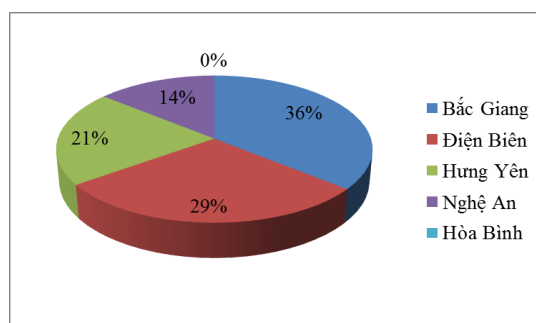
Kênh 11, 14: Mẫu ấu trùng ở Hưng Yên; Kênh 12, 13: Mẫu ong trưởng thành ở Hưng Yên

Kênh 15, 16: Mẫu ong trưởng thành ở Nghệ An; Kênh 17: Mẫu ấu trùng ở Nghệ An

Với kết quả RT-PCR trên hình cho thấy các mẫu xuất hiện sản phẩm PCR đều có kích thước tương đương với kích thước sản phẩm PCR của mẫu dương tính chuẩn BQCV(+). Như vậy, với quy trình RT-PCR đã thực hiện, chúng tôi có thể phát hiện sự có mặt của BQCV trên toàn bộ các mẫu ong đã thu thập.

3. Đánh giá sự phân bố của BQCV ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam

Theo kết quả RT-PCR thực hiện trên 180 mẫu ong thu được ở 5 tỉnh, chúng tôi thống kê thấy có 4/5 tỉnh phát hiện có BQCV, đó là Điện Biên, Bắc Giang, Hưng Yên và Nghệ An (hình 4).



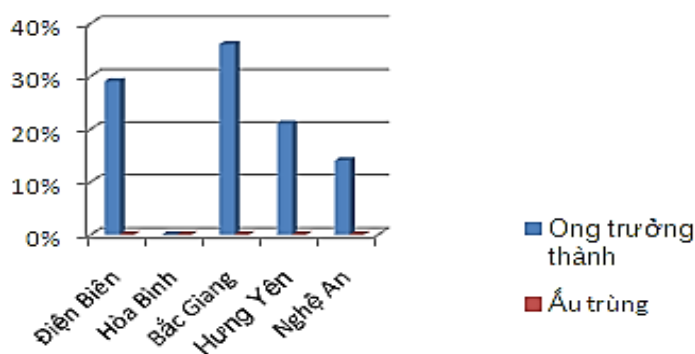
Hình 4: Phân bố tỉ lệ nhiễm BQCV ở 5 tỉnh khảo sát

Có tổng số 14 đàn dương tính với BQCV, trong đó Điện Biên có 4 đàn, Hưng Yên có 3 đàn, Bắc Giang có 5 đàn và Nghệ An có 2 đàn. Riêng Hòa Bình không phát hiện thấy đàn nào bị nhiễm. Như vậy, tỉ lệ nhiễm BQCV tính trung bình trong các đàn ong khảo sát chiếm >15,5%. Kết quả này thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của Trương Anh Tuấn và cộng sự năm 2012

cho thấy tỉ lệ nhiễm BQCV ở 5 tỉnh phía Bắc (Điện Biên, Sơn La, Đắk Lắk, Hưng Yên, Hà Nội) là 51% (Trương Văn Tuấn và cs, 2012). Sự suy giảm về tỉ lệ nhiễm virus này có thể là do người nuôi ong đã có những biện pháp tốt hơn trong việc phòng ngừa dịch bệnh, như chọn được mẫu chúa khỏe, có chế độ chăm sóc đàn ong tốt hơn và đã kiểm soát được sự lây nhiễm của những vật trung gian truyền BQCV dẫn đến giảm tỉ lệ nhiễm BQCV ở các tỉnh miền Bắc.

Kết quả khảo sát còn cho thấy Bắc Giang có số trường hợp ong nhiễm nhiều nhất chiếm 36%, Điện Biên có tỉ lệ nhiễm cao thứ hai là 29%, tiếp theo là Hưng Yên và Nghệ An có số trường hợp nhiễm chiếm lần lượt là 21% và 14%.

BQCV có thể gây bệnh và làm chết ong ở giai đoạn ấu trùng và trưởng thành. Vì vậy việc xác định tỉ lệ lây nhiễm của BQCV lên từng giai đoạn có ý nghĩa rất lớn cho công tác phòng và điều trị bệnh. Kết quả điều tra tỉ lệ nhiễm BQCV trên ấu trùng ong và ong trưởng thành được thể hiện ở hình 5.



Hình 5: Tỉ lệ nhiễm BQCV ở ấu trùng và ong trưởng thành

Với kết quả ở hình 5, trong số các mẫu dương tính, chỉ phát hiện được BQCV ở các mẫu ong trưởng thành mà không thấy xuất hiện ở các mẫu ấu trùng. Kết quả này khá phù hợp với kết quả nghiên cứu của Tentcheva D. và cộng sự khi cho rằng BQCV lây nhiễm vào ong trưởng thành nhiều hơn ở ấu trùng (Tentcheva D. et al., 2004). Hiện tượng BQCV chỉ xuất hiện ở mẫu ong trưởng thành có thể trong quá trình tạo đàn ong mới, người dân đã rất thận trọng trong việc chọn mẫu chúa khỏe mạnh nên ấu trùng ong ít bị nhiễm bệnh, còn các con ong trưởng thành có thể bị lây nhiễm BQCV theo con đường truyền ngang: nghĩa là truyền từ cá thể trưởng thành này sang cá thể trưởng thành khác, hoặc do ong tiếp xúc với thức ăn, phân đã bị nhiễm virus hoặc bị nhiễm virus thông qua tác nhân trung gian là động vật nguyên sinh *Nosema apis* hay ve ký sinh *Varroa*.

III. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thành công trong việc thực hiện quy trình RT-PCR với cặp mồi tự thiết kế để phát hiện BQCV trên 180 mẫu ong mật ở 5 tỉnh miền Bắc Việt Nam. Trong đó Bắc Giang có tỉ lệ nhiễm là 36%, Điện Biên nhiễm 29%, Hưng Yên nhiễm 21% và Nghệ An nhiễm 14%. Hòa Bình 0%. Tất cả các mẫu dương tính với BQCV đều là các mẫu ong trưởng thành. Với việc phát hiện 4/5 tỉnh cũng như 14/90 đàn ong bị nhiễm BQCV cho thấy nguy cơ bùng phát dịch bệnh là rất cao đòi hỏi các cơ quan kiểm dịch cần có chiến lược phát hiện, kiểm soát dịch bệnh trên các đàn ong kịp thời.

Lời cảm ơn: Công trình này được tài trợ một phần từ đề tài cấp Trường Đại học Công nghệ, mã số CN.14.05.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bailey, L., L. D. Wood**, 1977. “Two small RNA viruses from honeybees and further observations on sacbrood and acture bee paralysis viruses”, *J Gen Virol* 37, p. 175 – 182.
2. **Grabensteiner, E., T. Bakonyi., W. Ritter, H. Pechhacker, N. Nowotny**, 2007. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 94 (3): 222-225.
3. **Kondreddy Eswar Reddy, Jin Hyeong Noh, Se Eun Choe, Chang Hee Kweon, Mi Sun Yoo, Huong Thi Thanh Doan, Mummadireddy Ramya, Byoung-Su Yoon, Lien Thi Kim Nguyen, Thuy Thi Dieu Nguyen, Dong Van Quyen, Suk-Chan Jung, Ki-Yoon Chang, Seung Won Kang**, 2013. “Analysis of the complete genome sequence and capsid region of black queen cell viruses from infected honeybees (*Apis mellifera*) in Korea”; Springer Science + Business Media New York.
4. **Leat, N., B. Ball, V. Govan , S. Davison**, 2000. “Analysis of the complete genome sequence of black queen cell virus, a picorna-like virus of honey bees”. *J Gen Virol.* 2000; 81, p. 2111–2119.
5. **Mongi Benjeddou, Neil Leat, Mike Allsopp, and Sean Davision**, 2001. *Applied Environmental Microbiology*, 67(5): 2384–2387.
6. **Tentcheva, D., L. Gauthier, N. Zappulla , B. Dainat, F. Cousserans, M.E. Colin., M. Bergoin**, 2004. *Applied Environmental Microbiology*, 70: 7185-7191.
7. **Trương Văn Tuấn, Đinh Quyết Tâm, Trần Văn Toàn, Lê Quang Trung, Phùng Quốc Chương, Nguyễn Chi Mai** (2012; Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, kỳ 11: 28-33.

DETECTION OF BLACK QUEN CELL VIRUS IN HONEYBEES COLLECTED FROM THE NORTHERN VIETNAM

HA THI QUYEN, HA THI THU, BUI THI THUY DUONG, DONG VAN QUYEN

SUMMARY

Black queen-cell virus (BQCV) is one of 18 viruses isolated from honey bees. It was first isolated from queen prepupae and pupae, found dead in their cells. These virus particles are 30 nm in diameter with a single genomic RNA. BQCV can infected pupae and adult bees. BQCV has been researched widely in the world, but it have not been still researched in full in Vietnam.

In this study, a DNA fragment with 701bp of BQCV was amplified by RT-PCR technique and used as identification in the presence of BQCV. Among 90 honey bee colonies with 180 samples (contain both of pupae and adult bee samples) collected from 5 northern provinces of Vietnam in 2013, there are 14/90 colonies infected BQCV (>15,5%). In which, Bac Giang province has highest frequency of BQCV infection (36%), followed by Dien Bien 29%, Hung Yen 21%, Nghe An 14% and Hoa Binh 0%. BQCV was only found in adult bee samples, not in pupae samples.

With 4/5 provinces in the presence of BQCV showed that the risk of a disease outbreak very high, requiring authorities and bee keepers should have measures to prevent and treat disease.