

XÁC ĐỊNH GENOTYPE, PHẢ HỆ VÀ ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ HỌC PHÂN TỬ CỦA MỘT SỐ CHỦNG VIRUS GÂY HỘI CHỨNG RỐI LOẠN SINH SẢN VÀ HÔ HẤP Ở LỢN (PRRSV) TẠI VIỆT NAM

Lê Thanh Hòa[✉], Đỗ Thị Roan, Nguyễn Thị Khuê, Đoàn Thị Thanh Hương, Nguyễn Thị Bích Nga

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

[✉] Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: imibtvn@gmail.com

Ngày nhận bài: 18.12.2016

Ngày nhận đăng: 20.3.2017

TÓM TẮT

Chuỗi nucleotide ORF5 mã hóa protein kháng nguyên GP5 của 11 mẫu virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV) từ một số địa phương trong cả nước giai đoạn 2008-2011 được phân tích về đặc điểm phân tử (nucleotide và amino acid). Mười một chuỗi nucleotide của GP5 (ORF5) này được so sánh với một số chủng đại diện PRRSV lưu hành ở Việt Nam và thế giới nhằm xác định genotype, dịch tễ phân tử và phả hệ nguồn gốc. Phân tích nucleotide và amino acid suy diễn cho thấy mức độ tương đồng rất cao (98 – 100%) giữa các chủng PRRSV Việt Nam và Trung Quốc. Phân tích phả hệ dựa trên chuỗi nucleotide của ORF5 cho thấy hai phân nhóm lớn có nguồn gốc châu Mỹ (North American lineage) thuộc genotype 2, bao gồm 11 chủng PRRSV trong nghiên cứu này và châu Âu (European lineage) thuộc genotype 1. Trong genotype 2, có sự phân hóa sâu hơn do tập hợp các phân nhóm có các chủng phân lập ở châu Á (Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ), các chủng châu Âu/Mỹ (Áo, Mỹ, Đan Mạch) và một chủng ở phân nhóm riêng có nguồn gốc Canada năm 2012. Về phân tích dịch tễ học, các chủng phân lập 2008 và 2011 của chúng tôi, theo đúng các chu kỳ đỉnh điểm dịch bệnh ở các giai đoạn 2007-2008, 2010-2011 và là các chủng có độc lực rất cao do có tính đồng nhất cao và cùng nhóm với các chủng cường độc cao của Trung Quốc tại thời điểm đó. Chúng tôi nhận định, các đợt dịch do PRRSV độc lực cao ở Việt Nam phụ thuộc vào các đợt dịch của Trung Quốc và PRRSV gây ra ở Việt Nam có nguồn gốc từ Trung Quốc.

Từ khóa: dịch tễ học, độc lực, nguồn gốc, phả hệ, PRRSV, tương đồng, Việt Nam

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS, porcine reproductive and respiratory syndrome) hay ở Việt Nam còn gọi là bệnh "tai xanh" là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, lây lan nhanh và gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi lợn trên thế giới và Việt Nam (Kappes, Faaberg, 2015; Thuy *et al.*, 2013; Do *et al.*, 2016a,b; Giang *et al.*, 2016). PRRS đã được mô tả đầu tiên ở Mỹ vào năm 1987 và xuất hiện ở châu Âu ngay sau đó (Rascón-Castelo *et al.*, 2015).

PRRS do một loại virus thuộc chi *Arterivirus*, họ Arteriviridae, thuộc bộ Nidovirales gây ra (Kappes, Faaberg, 2015). Hệ gen của PRRSV gồm khoảng 15,1 đến 15,3 nghìn nucleotide, bao gồm các khung đọc mở: ORF1a-ORF1b-ORF2a,b-3-4-5-6-7, trong đó, ORF1a và ORF1b mã hoá RNA- polymerase,

chia làm 12 tiểu phần gen: nsp1 – 12 (phân cắt thành các phân đoạn protein NSP1 – 12); ORF2a,b-3-4-5 mã hoá cho các protein cấu trúc; ORF6-7 cho các protein nền (M và N). ORF2a,b cho sản phẩm protein chức năng là GP2 và E; ORF3-4-5 cho GP3, GP4 và GP5 là các protein mang tính kháng nguyên; tiếp theo là ORF6-7, có sản phẩm là protein màng (M) và nền (N) cho protein cấu trúc nucleocapsid. Các gen có đặc điểm lồng vào nhau một phần 3' của gen trước với phần 5' của gen sau, thậm chí có sự lồng nội gen khác khung đọc mở (ở ORF2a và ORF2b). Như vậy, gen sau tận dụng một phần cuối chuỗi nucleotide của gen trước làm promoter hoạt động (Meulenberg *et al.*, 1997; Meng, 2000; Rascón-Castelo *et al.*, 2015). GP2-3-4-5 là các protein được glycosyl hoá, còn protein M và N (do ORF6 và ORF7 qui định mã hoá) là những protein nội màng của virus, không được glycosyl hóa, nhưng có tính kháng nguyên và có mức độ bảo tồn cao trong số các

protein của virus (Meulenberg *et al.*, 1997). PRRSV gồm 2 dòng khác nhau: i) Dòng châu Âu (type 1) và dòng Bắc Mỹ (type 2). Các chủng thuộc type 1 được phát hiện lần đầu tiên tại Hà Lan và có đại diện tương ứng là chủng Lelystad (LV). PRRSV thuộc type 2 có đại diện tương ứng là chủng VR2332. Tuy có sự sắp xếp gen giống nhau, nhưng đặc tính gen và hệ gen, độ dài các gen và đặc tính sinh học (tính gây bệnh và mối quan hệ kháng nguyên - miễn dịch) của các mẫu thuộc 2 dòng (type) PRRSV có khác nhau (Feng *et al.*, 2008; An *et al.*, 2011; Kappes, Faaberg, 2015).

Mặc dù PRRSV đã xâm nhập vào Việt Nam năm 1996, nhưng trong 10 năm (1997-2007) không có các thông báo về bệnh do virus này gây ra (Tô Long Thành, 2007), mà chỉ có thống kê huyết thanh dương tính PRRS ở lợn (Kamakawa *et al.*, 2006). Cuối tháng 2/2007, bệnh xảy ra đã được Trung tâm Chẩn đoán Thú y trung ương xác nhận do PRRSV gây ra và các chủng PRRSV giai đoạn này có độc lực rất cao (Tô Long Thành, 2007; Feng *et al.*, 2008; Lê Thanh Hoà *et al.*, 2009). Từ đó đến nay, PRRS luôn luôn tồn tại gây thiệt hại to lớn cho ngành chăn nuôi lợn ở Việt Nam và thế giới (Tô Long Thành, 2007; Feng *et al.*, 2008; Thuy *et al.*, 2013; Jantafong *et al.*, 2015; Do *et al.*, 2016b; Giang *et al.*, 2016). PRRS có xu hướng xảy ra theo chu kỳ, với các đỉnh điểm ở các giai đoạn 2007-2008, 2011-2012 và 2014-2015 (Do *et al.*, 2016a,b). Chúng tôi tham gia nghiên cứu PRRSV từ những năm 2007 và thu thập được một số chủng đại diện gây bệnh ở cả 3 miền trong cả nước giai đoạn 2008-2011 (Lê Thanh Hoà *et al.*, 2009). Một số nhóm nghiên cứu khác cũng đã có những công bố nghiên cứu dịch tễ học và gen học PRRSV qua các giai đoạn kể từ 2007 cho đến nay dựa trên phân tích toàn bộ hệ gen hoặc một phần gen (ORF5); đã tạo nên một sự đánh giá đúng mức tình hình dịch bệnh PRRS tại Việt Nam (Feng *et al.*, 2008; Thuy *et al.*, 2013; Jantafong *et al.*, 2015; Do *et al.*, 2016b; Giang *et al.*, 2016). Mặt khác, những đánh giá vai trò của vacxin mới ứng dụng gần đây, cũng góp phần cung cấp thực trạng miễn dịch phòng chống PRRSV ở nước ta (Zhang *et al.*, 2014; Iseki *et al.*, 2017).

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả xác định genotype và phân tích phả hệ nguồn gốc và mối quan hệ dịch tễ học phân tử của các chủng PRRSV phân lập trong giai đoạn 2008-2011 dựa vào GP5, phân tích và so sánh với các chủng Việt Nam và thế giới.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Bệnh phẩm và tách chiết RNA hệ gen của virus

Bệnh phẩm gồm 11 mẫu là phế quản chứa PRRSV cường độc thu thập từ những lợn bệnh khác nhau tại một số tỉnh miền Bắc (Hưng Yên, Bắc Ninh, Bắc Giang), miền Trung (Quảng Trị, Bình Định, Khánh Hòa) và miền Nam (Đồng Nai), ký hiệu mẫu là TBG81, TX196, TXBD1, TXBD2, TXBH1, TXBH2, TXBN10, TXHY09, TXKH1, TXKH2, TXMT1 và TXNT) (Bảng 1). Mẫu được bảo quản ở -20°C cho đến khi xử lý tách chiết RNA tổng số.

Xử lý bệnh phẩm: Cắt một mẫu nhỏ (~1 mg), nghiền trong nito lỏng tạo nên huyền dịch tế bào nhiễm. RNA hệ gen của virus được tách chiết bằng bộ sinh phẩm QIAamp Viral Mini kit (QIAGEN Inc.), theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thiết kế môi, thực hiện RT-PCR chuyển đổi cDNA

Thiết kế môi: Dựa trên phân tích trình tự của tất cả các mẫu PRRSV có trong Ngân hàng gen, cặp môi được thiết kế gồm môi xuôi, TX3F: 5' AGGTGGGCAACCGTTTATAG 3'; môi ngược, TXGPR: 5' TTTCTGCCACCCAACACGAG 3', sử dụng cho phản ứng RT-PCR thu nhận đoạn DNA (~1,1 kb) chứa toàn bộ chuỗi nucleotide của ORF5 (ORF5 có độ dài 603-606 nucleotide).

Chuyển đổi cDNA: DNA bổ sung (cDNA) được tổng hợp theo phương pháp chuyển đổi từ RNA hệ gen của virus bằng môi ngẫu nhiên (random hexamer primers), sử dụng bộ kit chuyển đổi của hãng Fermentas, theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thành phần phản ứng với tổng dung tích 20 µl gồm có: 2 µl (100 ng/µl) RNA tổng số; 1 µl (100 picomol/µl) môi hexamer; 1 µl dNTP (10 mM); 8,5 µl nước khử ion DEPC; 4 µl đệm 5X buffer; 1 µl enzyme MaximaTM Reverse Transcriptase (20 u/µl) và 0,5 µl RiboLockTM RNase Inhibitor (20 u/µl). Phản ứng chuyển đổi được thực hiện: 50°C/60 phút và vô hoạt ở 85°C/5 phút. Sản phẩm cDNA được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng để thực hiện phản ứng PCR.

Thực hiện phản ứng PCR thu nhận ORF5

Sản phẩm cDNA được sử dụng làm khuôn thực hiện phản ứng PCR với cặp môi đã được thiết kế ở trên, với dung tích 50 µl, gồm 25 µl PCR Mastermix (Fermentas Inc.), 2 µl mỗi loại môi (10 picomol/µl), 3 µl khuôn cDNA, 2 µl DMSO (dimethyl sulfoxide) và 16 µl nước khử ion DEPC. Phản ứng được thực

hiện trên máy MJ PTC-100 (USA) với chu trình nhiệt bao gồm 1 chu kỳ ở 94°C/5 phút, 35 chu kỳ ở [94°C/30 giây, 52°C/30 giây; 72°C/2 phút], chu kỳ cuối ở 72°C/10 phút.

Sản phẩm PCR được kiểm tra trên agarose 1% và tinh sạch bằng bộ sinh phẩm QIAquick Purification kit (QIAGEN Inc) (đối với các sản phẩm PCR cho đơn băng, sắc nét) hoặc tinh sạch bằng phương pháp (elution) băng DNA tương ứng (với những sản phẩm PCR đa băng).

Sản phẩm PCR được gửi đi giải trình tự trực tiếp hoặc dòng hóa vào vector tách dòng pCR2.1TOPO (Invitrogen Inc.) và chọn lọc plasmid tái tổ hợp để giải trình tự.

Giải trình tự và phân tích số liệu

Sản phẩm PCR tinh sạch hoặc DNA của plasmid tái tổ hợp được gửi đi giải trình tự trên máy tự động ABI-3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (Macrogen Inc., Hàn Quốc). Chuỗi nucleotide được xử lý bằng chương trình Chromas Lite. Sử dụng bộ mã vi sinh vật bậc thấp (vi khuẩn), toàn bộ trình tự amino acid suy diễn của ORF5 từ 11 chủng đã được thu nhận. Trình tự nucleotide và amino acid được so sánh đối chiếu và xác định mức độ đồng nhất (nucleotide) và tương đồng (amino acid) bằng chương trình GENEDOC2.7 (<http://www.nrbcs.org/gfx/genedoc/>). Trình tự chuỗi nucleotide và amino acid suy diễn của GP5 của các mẫu nghiên cứu của Việt Nam được so sánh và phân tích với một số mẫu Việt Nam và thế giới đã công bố trong Ngân hàng gen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Chuỗi nucleotide và amino acid được phân tích bằng GENEDOC2.7 và cây phả hệ được xây dựng bằng chương trình MEGA6.06, sử dụng phương pháp “*kết nối liền kề*” (Neighbor-joining, NJ) với hệ số tin tưởng bootstrap 1000 lần lặp lại (Tamura *et al.*, 2013).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả thực hiện PCR thu nhận ORF5

Từ khuôn cDNA, sử dụng cặp mồi TX3F/TXGPR toàn bộ đoạn DNA có độ dài khoảng 1,1 kb chứa ORF5 của tất cả các mẫu cần nghiên cứu đã được thu nhận. Sản phẩm PCR được tinh sạch và gửi đi giải trình tự tại Hàn Quốc (Macrogen, Korea).

Từ kết quả giải trình tự đoạn DNA khoảng 1,1 kb, toàn bộ chuỗi nucleotide ORF5 có độ dài 603 nucleotide của 11 mẫu nghiên cứu đã được thu nhận.

Các trình tự gen này được sử dụng truy cập vào Ngân hàng gen để tìm kiếm các chuỗi tương đồng. Kết quả cho thấy 11 mẫu nghiên cứu của Việt Nam chính xác là PRRSV.

Kết quả so sánh trình tự amino acid của GP5 giữa các chủng Việt Nam và thế giới

Trình tự amino acid suy diễn của GP5 của 11 mẫu nghiên cứu của Việt Nam được so sánh với 28 chủng khác nhau trên thế giới đăng kí trong Ngân hàng gen (Bảng 1).

Hình 1 trình bày so sánh, đối chiếu đồng nhất amino acid suy diễn của 11 mẫu PRRSV trong nghiên cứu này với các chủng của thế giới. Kết quả cho thấy các mẫu của Việt Nam có mức độ đồng nhất cao với các chủng của Trung Quốc và có nhiều sai khác với các chủng của châu Âu (bao gồm Mỹ, Áo, Canada, Đan Mạch và Cộng hòa Séc).

Kết quả so sánh trình tự nucleotide cũng cho thấy 11 mẫu PRRSV của Việt Nam sử dụng trong nghiên cứu có tỷ lệ đồng nhất cao về nucleotide (98 - 99%) với nhau. Các mẫu của Việt Nam cũng có mức độ đồng nhất cao về trình tự nucleotide với các chủng PRRSV của Trung Quốc, bao gồm các chủng 10-LW8-1 (JQ663568), 10-LW7-1 (JQ663567), BH58/10 (JN626287) và HCMC-3447 (HQ540656).

Các chủng PRRSV trong nghiên cứu của Việt Nam cũng có tỉ lệ tương đồng rất cao (98 - 100%) về amino acid với các chủng của Trung Quốc và thấp với các chủng của Châu Âu (87 - 88%).

Phân tích genotype và phả hệ nguồn gốc

Trình tự nucleotide ORF5 (603-606 bp) của 11 mẫu nghiên cứu và 28 chủng PRRSV thế giới được sử dụng để xây dựng cây phả hệ nhằm truy xuất nguồn gốc. Kết quả thể hiện ở Hình 2 cho thấy 39 chủng PRRSV chia làm hai phân nhóm lớn trên cây phả hệ. Nhóm thứ nhất bao gồm tất cả các chủng của Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ, Áo, Canada, Mỹ, Đan Mạch, thuộc genotype 2, có nguồn gốc Bắc Mỹ (North American lineage). Nhóm thứ hai bao gồm các chủng của Áo và Cộng hòa Séc, thuộc genotype 1, có nguồn gốc châu Âu (European lineage). Giữa hai nhóm, tỷ lệ đồng nhất về nucleotide rất thấp (63 - 65%).

Nhóm thứ nhất lại chia thành 3 phân nhóm: i) Phân nhóm thứ nhất gồm toàn bộ các chủng của Việt Nam (11 chủng), Ấn Độ và Trung Quốc, với tỷ lệ

đồng nhất về nucleotide đạt từ 98 đến 100%, thuộc về genotype 2, hoàn toàn phân lập ở châu Á; ii) Phân nhóm thứ hai gồm các chủng của Áo, Mỹ và Đan Mạch (genotype 2) với tỷ lệ đồng nhất về nucleotide

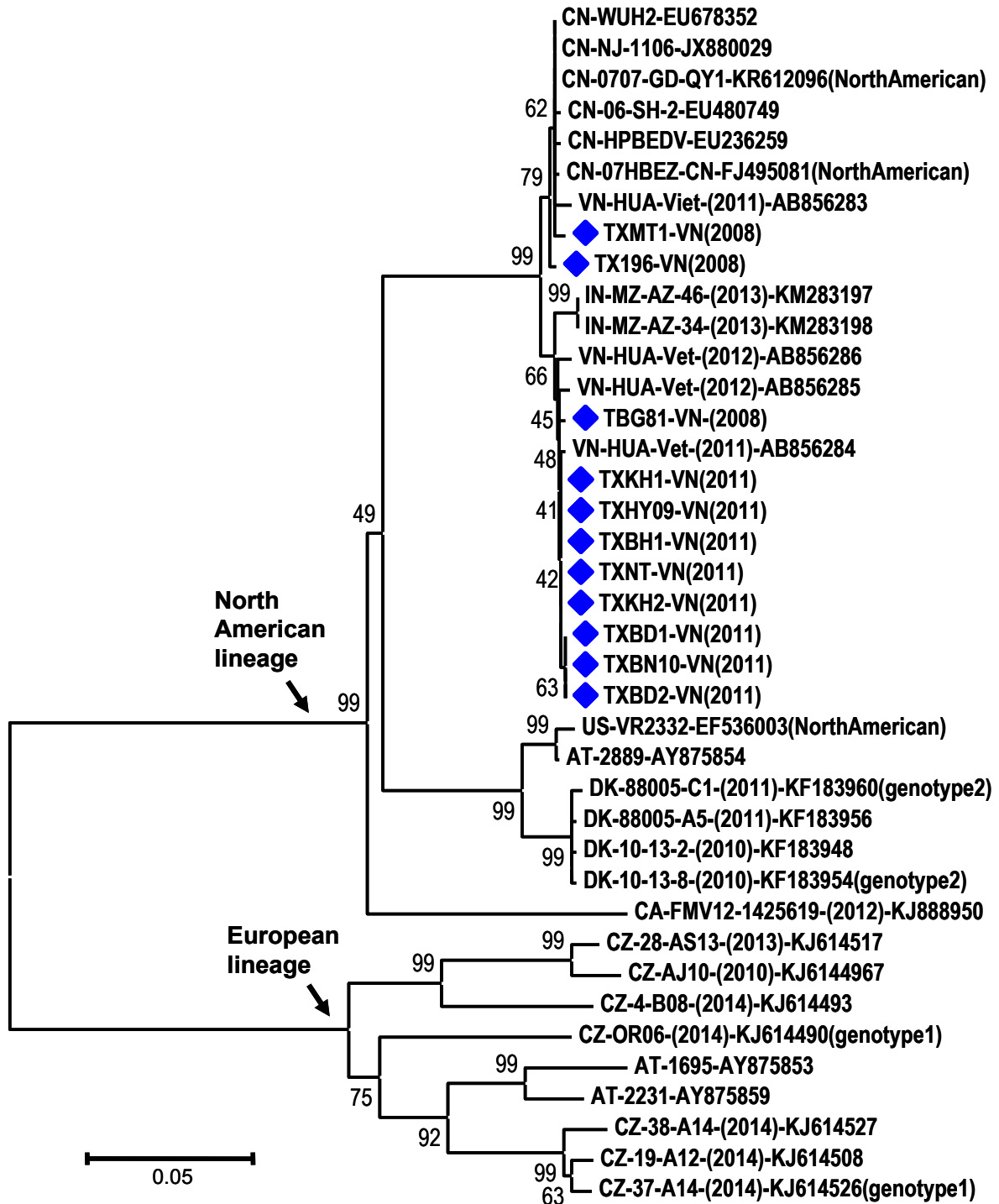
từ 96 – 99%, có nguồn gốc châu Âu; iii) Phân nhóm thứ ba gồm duy nhất chủng CA-FMV12-1425619-2012 của Canada (số đăng kí Ngân hàng gen: KJ888950).

Bảng 1. Danh sách các mẫu PRRSV của Việt Nam và thế giới cung cấp chuỗi nucleotide ORF5 để phân tích so sánh thành phần gen và mối quan hệ nguồn gốc phả hệ.

TT	Ký hiệu mẫu	Năm phân lập	Nước phân lập	Số đăng ký Ngân hàng gen
1	TX196-VN	2008	Việt Nam	Nghiên cứu này
2	TXMT1-VN	2008	Việt Nam	Nghiên cứu này
3	TBG81	2008	Việt Nam	Nghiên cứu này
4	TXBD1	2011	Việt Nam	Nghiên cứu này
5	TXBD2	2011	Việt Nam	Nghiên cứu này
6	TXBN10	2011	Việt Nam	Nghiên cứu này
7	TXXH1	2011	Việt Nam	Nghiên cứu này
8	TXXH2	2011	Việt Nam	Nghiên cứu này
9	TXBH1	2011	Việt Nam	Nghiên cứu này
10	TXHY09	2011	Việt Nam	Nghiên cứu này
11	TXNT	2011	Việt Nam	Nghiên cứu này
12	HUA-Vet	2011	Việt Nam	AB856284
13	HUA-Vet	2012	Việt Nam	AB856286
14	HUA-Vet	2012	Việt Nam	AB856285
15	HUA-Vet	2011	Việt Nam	AB856283
16	MZ-AZ-34	2013	Ấn Độ	KM283197
17	07HBEZ	2007	Trung Quốc	FJ495081
18	06-SH-2	2008	Trung Quốc	EU480749
19	0707-GD-QY1	2007	Trung Quốc	KR612096
20	HPBEDV	2007	Trung Quốc	EU236259
21	NJ-1106	2011	Trung Quốc	JX880029
22	WUH2	2008	Trung Quốc	EU678352
23	FMV12-1425619	2012	Canada	KJ888950
24	VR2332	NA	Mỹ	EF536003
25	2889	2005	Áo	AY875854
26	88005-A5	2011	Đan Mạch	KF183956
27	88005-C1	2011	Đan Mạch	KF183960
28	DK-2010-10-13-2-2010	2010	Đan Mạch	KF183948
29	DK-2010-10-13-8-2010	2010	Đan Mạch	KF183954
30	28-AS13	2013	Cộng hòa Séc	KJ614517
31	AJ10	2010	Cộng hòa Séc	KJ6144967
32	4-B08	2014	Cộng hòa Séc	KJ614493
33	OR06	2014	Cộng hòa Séc	KJ614490
34	1695	2005	Áo	AY875853
35	2231	2005	Áo	AY875859
36	19-A12	2014	Cộng hòa Séc	KJ614508
37	37-A14	2014	Cộng hòa Séc	KJ614526
38	38-A14	2014	Cộng hòa Séc	KJ614527
39	MZ-AZ-34	2013	Ấn Độ	KM283198

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100			
TX196-	MLGKCLTACCCSRLFLWCIVPFYLA	VLVNASNNSSHIQLIYNLTLC	ELNGTDWLAQKFDWAVET	FVIFPVLTHIVSYGALTTSHFLD	TVGLATVSTAGYY	:	102						
TXMT1-											: 102		
TBG81-											: 102		
TXBD1-											: 102		
TXBD2-											: 102		
TXBN10-											: 102		
TXKH1-											: 102		
TXKH2-											: 102		
TXBH1-											: 102		
TXHY09-											: 102		
TXNT-V-											: 102		
VN-HUA-	R											: 102	
VN-HUA-	Y											: 102	
VN-HUA-											: 102		
VN-HUA-											: 102		
US-VR2-	E	G	Y	Q	S	CF	DS	L	N	S	A	V	FV
AT-288-	E	G	Q	S	CF	A	DS	L	N	S	A	V	FV
CA-FMV-	V	GY	Q	P	CF	A	S	S	L	I	NNS	I	
CN-06-											: 102		
CN-07H-											: 102		
CN-070-											: 102		
CN-HPB-											: 102		
CN-NJ-											: 102		
CN-WUH-											: 102		
DK-10-	G	Q	S	F	A	S	L	N	S	A	V	FL	
DK-10-	G	Q	S	F	A	S	L	N	S	A	V	FL	
DK-880-	G	Q	FS	F	A	S	L	N	S	A	V	FL	
DK-880-	G	Q	PS	F	A	S	L	N	S	A	V	FL	
IN-MZ-	S	Y											: 102
IN-MZ-	S	Y											: 102
	*	120	*	140	*	160	*	180	*	200			
TX196-	HGRYVLSSIIYAVCALAALICFVIRLAKNCMSWRYSCTRYTNFL	LDTKGRLYRWRSPVIVEKGGKVEVEGHLIDLKRVVLDGSAATPLTRVSAEQWGR	L-	:	200								
TXMT1-											: 200		
TBG81-											: 200		
TXBD1-											: 200		
TXBD2-											: 200		
TXBN10-											: 200		
TXKH1-											: 200		
TXKH2-											: 200		
TXBH1-											: 200		
TXHY09-											: 200		
TXNT-V-											: 200		
VN-HUA-											: 200		
VN-HUA-											: 200		
VN-HUA-											: 200		
VN-HUA-											: 200		
US-VR2-	T	F	A	I	R	V	I	P					
AT-288-	T	F	A	I	R	V	I	P					
CA-FMV-	T	T	K	S	I	G	R	V	I	P			
CN-06-	V											: 200	
CN-07H-											: 200		
CN-070-											: 200		
CN-HPB-											: 200		
CN-NJ-											: 200		
CN-WUH-											: 200		
DK-10-	T	F	L	A	K	I	R	V	I	P			
DK-10-	T	F	L	A	K	I	R	V	I	P			
DK-880-	T	F	L	A	K	I	R	V	I	P			
DK-880-	T	F	L	A	K	I	R	V	I	P			
IN-MZ-											: 200		
IN-MZ-											: 200		

Hình 1: So sánh trình tự amino acid GP5 của PRRSV của các chủng Việt Nam và thế giới, thuộc genotype 2 (dòng Bắc Mỹ). Ghi chú: Sai khác trình tự amino acid so với chủng TX196 (dòng trên cùng) được biểu thị bằng chính ký hiệu amino acid đó; và không sai khác được biểu thị bằng dấu (.). Ký hiệu của 30 chủng liệt kê ở Bảng 1.



Hình 2. Cây phả hệ của các chủng PRRSV trong nghiên cứu này và các chủng đăng ký trong Ngân hàng gen dựa trên phân tích chuỗi nucleotide ORF5. Ký hiệu (◆) chỉ các mẫu trong nghiên cứu này; mũi tên chỉ hai nhóm gồm nhóm có nguồn gốc châu Á (genotype 2) và nhóm có nguồn gốc châu Âu (genotype1); con số nằm trong ngoặc đơn ở mỗi chủng chỉ năm phân lập của chủng đó (nếu có). Từ genotype trong ngoặc đơn cuối một số chuỗi chỉ chủng tham chiếu thuộc về genotype nào và dòng xuất xứ của chúng.

Như vậy, kết quả phân tích genotype và nguồn gốc cho thấy genotype 1 vẫn thuộc về các chủng chi phân lập được ở châu Âu, chưa có xu hướng xâm nhập vào các nước châu Á. Ngược lại, các chủng có nguồn gốc châu Mỹ (North American lineage), thuộc genotype 2 có thành phần các chủng phức tạp hơn, có xu hướng lan truyền khắp thế giới (Thuy *et al.*, 2013; Kappes, Faaberg, 2015; Do *et al.*, 2016a,b). Nhóm này phân hóa làm 2 phân nhóm rõ rệt: phân nhóm của genotype 2 hoàn toàn là châu Á (Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ) và phân nhóm genotype thuộc châu Âu/Mỹ (Áo, Mỹ, Đan Mạch) và một trường hợp đặc biệt, chủng của Canada, xu hướng thuộc về phân nhóm của genotype 2.

Về phân tích dịch tễ học, nhiều nghiên cứu về PRRSV ở Việt Nam cho thấy dịch bệnh PRRS xảy ra theo chu kì với các đỉnh điểm ở các giai đoạn 2007-2008, 2011-2012 và 2014-2015 (Feng *et al.*, 2008; An *et al.*, 2011; Do *et al.*, 2016b). Kết quả của chúng tôi cũng xác định các chủng phân lập 2008 và 2011, theo đúng các chu kì phát dịch như trên và là các chủng có độc lực rất cao do có tính đồng nhất cao và cùng nhóm với các chủng cường độ cao của Trung Quốc (Hình 1 và 2). Phân tích đặc điểm đột biến trong GP5, một số nghiên cứu gần đây cũng cho thấy PRRSV cường độ của Việt Nam có mức độ tương đồng rất cao với các chủng Trung Quốc kể cả những chủng vacxin như JXA1-R (Thuy *et al.*, 2013; Do *et al.*, 2016b). Chúng tôi nhận định, các đợt dịch do PRRSV độc lực cao ở Việt Nam phụ thuộc vào các đợt dịch của Trung Quốc và PRRSV gây ra ở Việt Nam có nguồn gốc từ Trung Quốc (Feng *et al.*, 2008; Lê Thanh Hòa *et al.*, 2009; Do *et al.*, 2016a,b).

KẾT LUẬN

Mười một mẫu PRRSV của Việt Nam đã được phân lập và thu nhận chuỗi nucleotide có độ dài 603 nucleotide của ORF5 và 200 amino acid của polypeptide GP5; tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và tương đồng về amino acid của GP5 rất cao (98-100%) với các chủng của Trung Quốc và Ấn Độ, tất cả thuộc về genotype 2. Phân tích phả hệ dựa vào GP5 cho thấy hai phân nhóm lớn nguồn gốc châu Mỹ, thuộc genotype 2, bao gồm 11 chủng PRRSV trong nghiên cứu này và châu Âu, thuộc genotype 1. Trong genotype 2, sự phân hóa sâu hơn do tập hợp các phân nhóm có các chủng phân lập ở châu Á (Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ), các chủng châu Âu/Mỹ (Áo, Mỹ, Đan Mạch) và một chủng ở phân nhóm riêng có nguồn gốc Canada năm 2012. Về dịch tễ học, các chủng phân lập 2008 và 2011 của chúng

tôi, thuộc chu kì đỉnh điểm dịch bệnh ở các giai đoạn 2007-2008 và 2010-2011; và là các chủng có độc lực rất cao như các chủng cường độ cao của Trung Quốc; từ đó cho phép nhận định dịch bệnh PRRS ở Việt Nam phụ thuộc vào các đợt dịch của Trung Quốc và có nguồn gốc từ Trung Quốc.

Lời cảm ơn: Cảm ơn Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen (Viện Công nghệ sinh học) đã hỗ trợ kinh phí cho đề tài mã số NV04-PTNTĐ2017(LTH) và NV01-PTNTĐ2015 để chúng tôi thực hiện nghiên cứu này

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- An TQ, Tian ZJ, Leng CL, Peng JM, Tong GZ (2011) Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Asia. *Emerg Infect Dis* 17(9): 1782-1724.
- Do DT, Park C, Choi K, Jeong J, Nguyen TT, Le DT, Vo KM, Chae C (2016a) Nucleotide sequence analysis of Vietnamese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 2013 to 2014 based on the NSP2 and ORF5 coding regions. *Arch Virol* 161(3): 669-675.
- Do HQ, Trinh DT, Nguyen TL, Vu TT, Than DD, Van Lo T, Yeom M, Song D, Choe S, An DJ, Le VP (2016b) Molecular evolution of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses circulating in Vietnam from 2007 to 2015. *BMC Vet Res* 12(1): 256.
- Feng Y, Zhao T, Nguyen T, Inui K, Ma Y, Nguyen TH, Nguyen VC, Liu D, Bui QA, To LT, Wang C, Tian K, Gao GF (2008) Porcine respiratory and reproductive syndrome virus variants, Vietnam and China, 2007. *Emerg Infect Dis* 14(11): 1774-1776.
- Giang NTH, Lan NT, Nam NH, Hirai T, Yamaguchi R (2016) Pathological Characterization of an Outbreak of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in Northern Vietnam. *J Comp Pathol* 154(2-3): 135-149.
- Iseki H, Kawashima K, Tung N, Inui K, Ikezawa M, Shibahara T, Yamakawa M (2017) Efficacy of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine against the 2010 isolate of Vietnamese highly pathogenic PRRSV challenge in pigs. *J Vet Med Sci* 79(4): 765-773.
- Jantafong T, Sangtong P, Saenglub W, Mungkundar C, Romlamduan N, Lekchareonsuk C, Lekchareonsuk P (2015) Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Thailand and Southeast Asia from 2008 to 2013. *Vet Microbiol* 176(3-4): 229-238.
- Kamakawa A, Ho TV, Yamada S (2006) Epidemiological survey of viral diseases of pigs in the Mekong delta of Vietnam between 1999 and 2003. *Vet Microbiol* 118(1-2): 47-56.

- Kappes MA, Faaberg KS (2015) PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology* 479-480: 475–486.
- Lê Thanh Hòa, Lê Thị Kim Xuyên, Đoàn Thị Thanh Hương, Trần Quang Vui, Phạm Công Hoạt, Nguyễn Bá Hiên (2009). Phân tích gen M mã hoá protein màng của virus gây bệnh “tai xanh” tại Việt Nam và so sánh với các chủng của Trung Quốc và thế giới. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 3: 282–290.
- Meulenberg JJ (2000) PRRSV, the virus. *Vet Res* 31(1): 11–21. Review.
- Meulenberg JJ, Petersen den Besten A, de Kluyver E, van Nieuwstadt A, Wensvoort G, Moormann RJ (1997) Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol* 55(1-4): 197–202. Review.
- Nilubol D, Tripipat T, Hoonsuwan T, Kortheerakul K (2012) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Thailand, 2010-2011. *Emerg Infect Dis* 18(12): 2039–2043.
- Rascón-Castelo E, Burgara-Estrella A, Mateu E, Hernández J (2015) Immunological features of the non-structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viruses* 7(3): 873–886.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725–2729.
- Thuy NT, Thu NT, Son NG, Ha le TT, Hung VK, Nguyen NT, Khoa DVA (2013) Genetic analysis of ORF5 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in Vietnam. *Microbiol Immunol* 57(7): 518–526.
- Tô Long Thành (2007) Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp của lợn. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y* 3(14): 81–87.
- Zhang H, Kono H, Kubota S (2014) An integrated epidemiological and economic analysis of vaccination against highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Thua Thien Hue Province, Vietnam. *Asian-Australas J Anim Sci* 27(10): 1499–1512.

GENOTYPIC, PHYLOGENETIC AND EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS STRAINS (PRRSV) IN VIETNAM

Le Thanh Hoa, Do Thi Roan, Nguyen Thi Khue, Doan Thi Thanh Huong, Nguyen Thi Bich Nga

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Nucleotide sequence of ORF5 encoding the antigenic GP5 for 11 strains collected from different geographic localities in the country during 2008-2011 were obtained. These nucleotide sequences were analyzed for molecular properties (nucleotides and amino acids) to determine genotype, phylogenetic and molecular epidemiological characteristics compared with PRRSV circulating in Vietnam and worldwide. Analysis of nucleotides and deduced amino acids showed that there was very high level of nucleotide identity and amino acid homology (98 – 100%) between the Vietnamese and Chinese PRRSV strains. Phylogenetic analysis based on ORF5 nucleotide sequences revealed two large groups, one derived from the North American lineage of genotype 2, including 11 PRRSV isolates in this study and another of the European lineage of genotype 1. In the genotype 2, further subgroups were found among which there were strains of Asia (Vietnam, China, India), strains of the European/North American origin (Austria, US, Denmark) and a 2012-isolated strain from Canada, in a separate subgroup. Regarding to the epidemiological analysis, our isolates collected during 2008-2011, completely followed the endemic peaks occurred in Viet Nam, such as those in 2007-2008 and in 2010-2011. They all were determined as highly virulent strains due to high homology to the highly virulent strains of China occurred in those periods. We have some conclusions to be made that the outbreaks of highly pathogenic PRRSV in Vietnam were epidemiologically associated with the endemics occurred in China and originated from China.

Keywords: *epidemiology, homology, origin, phylogeny, PRRSV, Vietnam, virulent*