

PHÂN TÍCH MỐI QUAN HỆ PHẢ HỆ GIỮA VIRUS LỞ MỒM LONG MÓNG CỦA VIỆT NAM VÀ THẾ GIỚI XÁC LẬP TRÊN CƠ SỞ CHỈ THỊ 5'UTR VÀ 1D(VP1)

Lê Thanh Hòa¹, Thái Thị Thủy Phượng², Lê Thị Kim Xuyên¹

¹Viện Công nghệ sinh học

²Cơ quan Thú y vùng VI, thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Quan hệ phả hệ của 6 chủng virus Lở mồm long móng (LMLM) thu mẫu từ lợn và bò tại các tỉnh Tiền Giang và Đồng Tháp (trong đó có 2 chủng thu mẫu từ bò lai F1) và các chủng LMLM type O và type A và type Asia-1 của thế giới, được phân tích so sánh trên cơ sở thành phần nucleotide và amino acid của đoạn gen 1D(VP1) (hay vùng 1D-2A-2B); và trên cơ sở thành phần nucleotide của vùng gen 5'UTR. Kết quả cho thấy, chủng FM-DTCB-H(VN) thu từ lợn, tập hợp cùng nhóm với các chủng của Đài Loan và Hồng Kông; các chủng từ bò lai F1 (FM-DTF1-B1(VN) và FM-DTF1-B2(VN)) của Việt Nam tập hợp cùng nhóm với chủng O10 của Philippines. Sử dụng đoạn gen chức năng VP1 (1D-2A-2B), mối quan hệ phả hệ và nguồn gốc của 18 chủng LMLM, trong đó có 4 chủng của Việt Nam cũng được phân tích. Tất cả các chủng của Việt Nam đều thuộc type O tập trung vào nhóm I và II, trong đó, các chủng thu mẫu từ lợn, bò nội địa thuộc vào dòng *Cathay* (nhóm I); chủng từ bò lai F1 Đồng Tháp thuộc vào dòng *ME-SA (PanAsia)* (nhóm II); còn các chủng của type A và Asia1 thuộc vào nhóm III (nhóm ngoại hợp). Như vậy rõ ràng, trong số các chủng LMLM thu mẫu từ lợn, bò và bò lai ở các tỉnh Đồng Tháp, Tiền Giang đã có sự phân định thành 2 phân nhóm: phân nhóm thuộc type O dòng *Cathay* và phân nhóm thuộc type O dòng *ME-SA (PanAsia)*, giống như kết quả phân tích và nhận xét của một số tác giả trên thế giới.

Từ khóa: *Cathay*, định type, đột biến, Lở mồm long móng, *ME-SA(PanAsia)*, type O, 1D(VP1)

ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus Lở mồm long móng (LMLM) thuộc chi *Aphthovirus*, họ *Picornaviridae*, là virus hệ gen chứa RNA, có 7 serotype là A, O, C, Asia 1, SAT1, SAT2 và SAT3, trong đó mỗi serotype có nhiều phân type (subtype) khác nhau, mỗi subtype có thể bao gồm nhiều phân type địa phương (topotype), phân bố theo từng vùng địa lý khác nhau (Grubman *et al.*, 2004). Đặc biệt phức tạp, biến đổi nhanh và nhiều nhất là virus LMLM type O (Knowles *et al.*, 2005). Tại đầu 5' có một vùng gen có độ dài khoảng 1000 bp, không mã hóa, gọi là vùng không mã hóa đầu 5' (5'UTR = untranslated region), đặc hiệu cho từng type, có vai trò quan trọng trong sao mã, tăng cường độc lực, tạo khung vỏ bọc capsid, do vậy, vùng này được chọn làm chỉ thị phân tử trong giám định, định type, phân tích yếu tố độc lực của virus (Mason *et al.*, 2003). Sao chép RNA thông tin và tổng hợp protein của virus LMLM phụ thuộc rất lớn đến sự hoạt động của promoter ở đầu 5' (5'UTR), do vậy, đột biến trong vùng 5'UTR dễ dẫn đến sự hình thành topotype mới (Carrillo *et al.*, 2005). Khung đọc mở gồm 6900 nucleotide mã hóa cho một tiền protein chung của virus LMLM bao gồm khoảng 2300 amino acid liên kết vào nhau trong quá

trình tổng hợp. Sau đó, chúng được phân cắt để tạo nên các sản phẩm độc lập, trong đó có các loại protein cấu trúc 1A, 1B, 1C và 1D hay VP1 (viral protein) và các protein không cấu trúc bao gồm sản phẩm 2A, 2B, 3A, 3B, 3C, 3D (Mason *et al.*, 2003).

Gần đây, nhiều bằng chứng cho thấy rằng có thể đã có sự xuất hiện các chủng/serotype/topotype mới trong nguồn virus LMLM gây bệnh ở Việt Nam, điều này làm phức tạp hóa chương trình khống chế bệnh bằng vaccine và khoanh vùng dịch tễ học (FAO/OIE, 2006; Thái Thị Thủy Phượng, Lê Thanh Hòa, 2006a, b; Nguyễn Viết Không *et al.*, 2006). Kết quả phân tích trình tự vùng 5'UTR và một phần gen 1D(VP1) đã được trình bày trong các công trình trước đây (Thái Thị Thủy Phượng, Lê Thanh Hòa, 2006; 2007). Trong bài báo này, chúng tôi giới thiệu kết quả sử dụng trình tự vùng 5'UTR và phần gen 1D(VP1) để xác lập phả hệ giữa virus LMLM của Việt Nam và thế giới.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu bệnh phẩm và chuỗi gen nghiên cứu phả hệ

Mẫu bệnh phẩm chứa virus LMLM là biểu mô,

niêm mạc, mụn nước của vùng có bệnh tích thu từ bò Tiền Giang (ký hiệu FM-CTTG-B(VN)), lợn Tiền Giang (FM-CBTG-H(VN)), lợn Đồng Tháp (FM-LVDT-H(VN)) và bò lai F1 Đồng Tháp (FM-DTF1B1(VN)); (FM-DTF1B2(VN)) thu thập năm 2004.

Tách chiết RNA tổng số chứa hệ gen RNA

RNA tổng số chứa hệ gen của virus LMLM trong bệnh phẩm được tách chiết bằng bộ sinh phẩm QIAamp RNA Viral Mini Kit (QIAGEN), theo hướng dẫn của nhà sản xuất đã giới thiệu trước đây (Thái Thị Thủy Phương, Lê Thanh Hòa, 2007).

Phản ứng RT-PCR, tách dòng và giải trình tự

Phản ứng RT-PCR một bước (one-step RT-PCR) được thực hiện, sử dụng bộ kit của hãng QIAGEN.

a) Cặp mồi thu đoạn DNA của vùng 5'UTR bao gồm mỗi xuôi: FM1F: 5'- GCCTGGTCTTCCAGGTC -3' (18 nucleotide); và mỗi ngược: FM1R: 5'- CCAGTCCCCTTCTCAGATC -3' (19 nucleotide). Cặp mồi FM1R-FM1R có thể sử dụng để nhân vùng gen không mã hóa 5'UTR từ nguồn khuôn RNA của các chủng O, A, C và Asia 1, cho sản phẩm DNA có độ dài khoảng 324 - 328 bp, biến động theo từng chủng/type.

b) Cặp mồi thiết kế để thu nhận đoạn gen 1D-2A-2B (VP1-2A-2B) nằm giáp ranh giữa phân P1 và P2 trong hệ gen virus LMLM là: Mỗi xuôi FMOF (5'- GCTGCCTACCTCCTCAA -3', có độ dài 18 nucleotide; mỗi ngược FMOR (5'- AGCTTGATCCAGGGTTTGGC -3'), có độ dài 20 nucleotide. Sản phẩm có độ dài 402 bp.

Sản phẩm RT-PCR được dòng hóa vào vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen). DNA plasmid tái tổ hợp được chọn lọc và tách chiết theo quy trình của hãng QIAGEN. Trình tự nucleotide của DNA của plasmid được giải trình trên máy tự động ABI-3100 Avant Genetic Analyzer (Mỹ) có tại Viện Công nghệ sinh học. Chuỗi nucleotide được xử lý, so sánh đối chiếu bằng các chương trình SeqEd1.03, AssemblyLIGN 1.9, MacVector8.2 (Accelrys Inc.), GENEDOC2.6 và MEGA3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

Phân tích chuỗi gen và xác định phả hệ LMLM

Chọn các genotype/chủng đại diện các type và các vùng địa lý sau khi truy cập Ngân hàng gen tại <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Bảng 1), phân tích mối quan hệ phả hệ bằng chương trình MEGA3.1 xác lập cây phả hệ giữa các chủng LMLM của Việt Nam và thế giới.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân tích mối quan hệ phả hệ giữa virus LMLM của Việt Nam và thế giới trên cơ sở chỉ thị 5'UTR

Quan hệ phả hệ của 6 chủng virus LMLM thu mẫu từ lợn, bò Tiền Giang và Đồng Tháp (liệt kê ở Bảng 1) với các chủng LMLM type O và type A và type Asia 1 của thế giới được phân tích và xác lập. Các chủng của Việt Nam gồm có 1 chủng thu mẫu từ lợn và 1 chủng thu từ bò (Tiền Giang), 2 chủng từ lợn Đồng Tháp và 2 chủng thu mẫu từ bò lai F1 (Đồng Tháp). Kết quả được trình bày ở hình 1 cho thấy, tất cả các chủng từ lợn, bò, bò lai của Việt Nam đều thuộc type O, trong đó chủng FM-DTCB-H (VN) thu từ lợn Đồng Tháp cùng nhóm với các chủng Đài Loan và Hồng Kông; còn các chủng thu từ bò lai F1 Đồng Tháp (FM-DTF1-B1(VN) và FM-DTF1-B2(VN)) hoàn toàn cùng nhóm với chủng O10 của Philippines (Hình 1).

Phân tích mối quan hệ phả hệ giữa virus LMLM của Việt Nam và thế giới trên cơ sở chỉ thị 1D(VP1)

Sử dụng đoạn gen chức năng 1D(VP1) gồm một phần vùng gen phụ cận (1D-2A-2B); mối quan hệ phả hệ và nguồn gốc của 18 chủng LMLM trong đó có 4 chủng của Việt Nam được phân tích và trình bày ở hình 2. Vì tất cả các chủng của Việt Nam đều thuộc type O, nên chúng tôi chỉ chọn 4 chủng đại diện (có 1 chủng từ bò lai F1 Đồng Tháp; 1 chủng từ lợn Đồng Tháp; 1 chủng từ lợn Tiền Giang; và 1 chủng từ bò nội địa Tiền Giang) để phân tích phả hệ với các chủng thuộc type O khác trong vùng và thế giới. Kết quả trình bày ở hình 2.

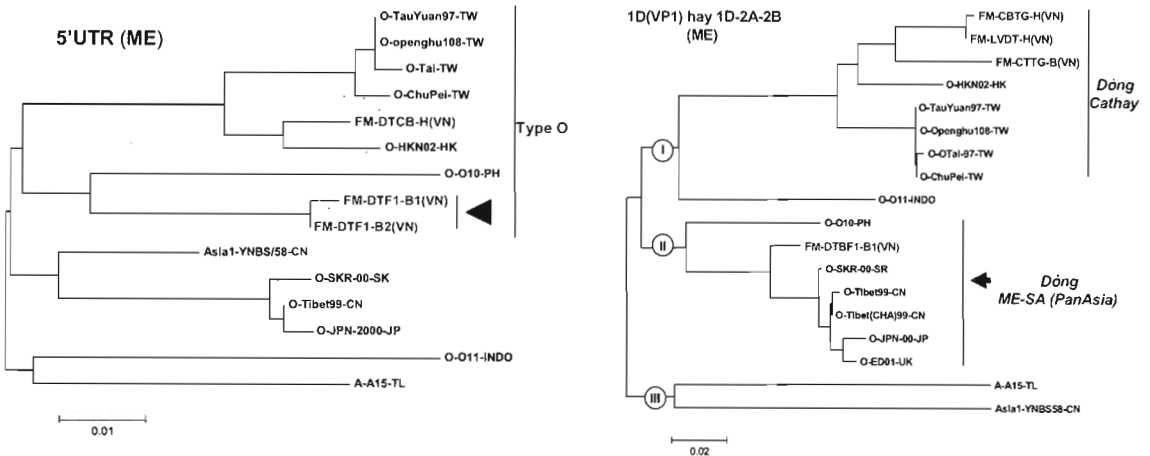
Kết quả cho thấy, tất cả các chủng của Việt Nam thuộc type O tập trung vào nhóm I và II, trong đó, các chủng thu mẫu từ lợn, bò nội địa thuộc topotype *Cathay* (nhóm I); chủng từ bò lai F1 Đồng Tháp thuộc topotype *ME-SA(PanAsia)* (nhóm II), cùng với chủng O10 của Philippines và các chủng ở Hàn Quốc, Trung Quốc (vùng Tây Tạng). Các chủng thuộc type A và Asia 1 thuộc nhóm III tạo nên nhóm ngoại nhập (out-group).

Như vậy rõ ràng, trong số các chủng LMLM thu mẫu từ lợn, bò và bò lai ở các tỉnh Đồng Tháp, Tiền Giang đã có sự phân định thành 2 nhóm: nhóm thuộc type O topotype *Cathay* và nhóm thuộc type O topotype *ME-SA(PanAsia)*, giống như kết quả phân tích và nhận xét của một số tác giả trên thế giới (Mason *et al.*, 2003; Knowles *et al.*, 2005; Carrilo *et al.*, 2005; FAO/OIE, 2006).

Bảng 1. Danh sách các chủng cung cấp chuỗi nucleotide vùng 5'UTR hoặc/và gen 1D (VP1) sử dụng để xác định phả hệ virus LMLM thu mẫu từ lợn, bò Tiền Giang và Đồng Tháp.

STT	Ký hiệu mẫu/chủng	Type	Nguồn gốc	Số đăng ký (GB)	Ghi chú/Tài liệu
1	FM-DTF1-B1(VN)	O	Đồng Tháp-Việt Nam	Nghiên cứu này	TTTT, LTH, 2006; 2007
2	FM-DTF1-B2(VN)	O	Đồng Tháp-Việt Nam	Nghiên cứu này	TTTT, LTH, 2006; 2007
3	FM-CBTG-H(VN)	O	Tiền Giang-Việt Nam	Nghiên cứu này	TTTT, LTH, 2006; 2007
4	FM-CTTG-B(VN)	O	Tiền Giang-Việt Nam	Nghiên cứu này	TTTT, LTH, 2006; 2007
5	FM-LVDT-H(VN)	O	Đồng Tháp-Việt Nam	Nghiên cứu này	TTTT, LTH, 2006; 2007
6	FM-DTCB-H(VN)	O	Đồng Tháp-Việt Nam	Nghiên cứu này	TTTT, LTH, 2006; 2007
7	O-Otai-97-TW	O	Đài Loan (TW)	AF308157	Beard và Mason, 2000 (GB)*
8	O-TauYuan97-TW	O	Đài Loan (TW)	AF154271	Kuo <i>et al.</i> , 1999(GB)*
9	O-Openghu108-TW	O	Đài Loan (TW)	AY593833	Carrillo <i>et al.</i> , 2005
10	O-ChuPei-TW	O	Đài Loan (TW)	AF026168	Tsai <i>et al.</i> , 2000(GB)*
11	O-Tibet99-CN	O	Trung Quốc (CN)	AF506822	Zhang <i>et al.</i> , 2004(GB)*
12	O-TibetCHA99-CN	O	Trung Quốc (CN)	AJ539138	Mason <i>et al.</i> , 2003
13	O-HKN02-CN	O	Trung Quốc (CN)	AY317098	Feng <i>et al.</i> , 2004(GB)*
14	O-SKR00-SK	O	Hàn Quốc (SKR)	AF377945	Kweon <i>et al.</i> , 2002(GB)*
15	O-O11-INDO	O	Indonesia (INDO)	AY593813	Carrillo <i>et al.</i> , 2005
16	O-JPN-00-JP	O	Nhật Bản (JP)	AB079061	Kanno <i>et al.</i> , 2002(GB)*
17	O-O10-PH	O	Phillippines (PH)	AY593811	Carrillo <i>et al.</i> , 2005
18	O-ED-01-UK	O	Anh (UK)	AY593831	Carrillo <i>et al.</i> , 2005
19	A-A15-TL	A	Thái Lan (TL)	AY593755	Carrillo <i>et al.</i> , 2005
20	Asia1-YNBS58-CN	Asia1	Trung Quốc (CN)	AY390432	Chang <i>et al.</i> , 2003(GB)*

Ghi chú: TTTT, LTH, 2006; 2007: Thái Thị Thủy Phượng, Lê Thanh Hòa, 2006; 2007; (GB)*: Chuỗi gen lấy trực tiếp từ Ngân hàng gen.



Hình 1. Phân tích phả hệ và nguồn gốc của các chủng LMLM của Việt Nam và một số chủng khác trong châu Á sử dụng chuỗi nucleotide của vùng gen 5'UTR và 1D (VP1) sử dụng ME (minimum evolution index); vạch 0.01 hoặc 0.02 biểu thị giá trị biến đổi nucleotide giữa các chủng. *Ghi chú:* Chỉ thị 5'UTR: Các chủng của Việt Nam thuộc type O, trong đó chủng thu mẫu từ lợn Đồng Tháp FM-DTCB-H (VN) hợp một nhóm cùng các chủng của Đài Loan và Hồng Kông; các chủng từ bò lai F1 Đồng Tháp gần với chủng O10 (type O) của Philippines. Chỉ thị 1D (VP1): Tất cả các chủng của Việt Nam thuộc type O, trong đó các chủng thu mẫu từ lợn, bò nội địa thuộc toptype *Cathay* (nhóm I); chủng từ bò lai F1 Đồng Tháp thuộc toptype *ME-SA (PanAsia)* (nhóm II); các chủng thuộc type A và Asia-1 thuộc nhóm III (ngoại hợp).

KẾT LUẬN

Bằng chỉ thị 5'UTR và 1D(VP1) phân tích phả hệ cho thấy, các chủng virus LMLM chủng FM-CBTG-H (VN) (lợn, Tiền Giang), FM-CTTG-B (VN) (bò, Tiền Giang), FM-LVDT-H (VN) (lợn, Đồng Tháp) được xác định thuộc type O topotype *Cathay*, với tỷ lệ tương đồng rất cao với các chủng Đài Loan và Hồng Kông; các chủng FM-DTF1-B1 và B2 (VN) (bò lai F1, Đồng Tháp) được xác định thuộc type O topotype mới trong dòng *ME-SA (PanAsia)*, với tỷ lệ tương đồng rất cao ở vùng gen 1D(VP1) với các chủng vùng Tây Tạng (Trung Quốc) và Hàn Quốc, Nhật Bản. Như vậy trong nghiên cứu của chúng tôi bước đầu phát hiện bò cũng có thể là loài mắc bệnh đối với topotype *Cathay*, type O.

Lời cảm ơn: Công trình có sự hỗ trợ một phần kinh phí của chương trình Nghiên cứu cơ bản trong Khoa học tự nhiên (Bộ Khoa học và Công nghệ) giai đoạn 2006 - 2007.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Carrillo C, Tulman ER, Delhon G, Lu Z, Carreno A, Vagnozzi A, Kutish GF, Rock DL (2005) Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 79(10):

6487-6504.

FAO/OIE (2006) Reference Laboratory Report: Foot-and-Mouth Disease (April-June 2006).

Grubman MJ, Baxt B (2004) Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev* 17(2): 465-493.

Knowles NJ, Samuel AR, Davies PR, Midgley RJ, Valarcher JF (2005) Pandemic strain of foot-and-mouth disease virus serotype O. *Emerg Infect Dis* 11(12): 1887-1893.

Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Brief Bioinform* 5: 150-163.

Mason PW, Grubman MJ, Baxt B (2003) Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res* 91: 9-32.

Nguyễn Viết Không, Nguyễn Văn Hưng, Lê Văn Thắng, Trương Văn Dung, Trần Thị Thanh Hà, Trương Quang Lâm, Trịnh Quang Đại (2006) Phát hiện typ Asia-1 virut Lở mồm long móng lần đầu tiên tại Khánh Hòa bằng kỹ thuật RT-PCR. *Khoa học Kỹ thuật Thú y* 13(4): 97-98.

Thái Thị Thủy Phương, Lê Thanh Hòa (2006) Phát hiện topotype khác biệt của virus Lở mồm long móng từ bò lai F1 ở Đồng Tháp (Việt Nam) qua giám định phân tử bằng chỉ thị 5'UTR. *Khoa học Kỹ thuật Thú y* 13(5): 5-12.

Thái Thị Thủy Phương, Lê Thanh Hòa (2007) Định type virus Lở mồm long móng trên heo, bò Tiền Giang và Đồng Tháp sử dụng chỉ thị phân tử gen kháng nguyên 1D-2A-2B (VP1-2A-2B). *Khoa học kỹ thuật Thú y* 14(1): 12-19.

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS OF THE VIETNAMESE AND GLOBAL ISOLATES BASED ON THE 5'UTR AND 1D(VP1) GENETIC MARKERS

Le Thanh Hoa^{1*}, Thai Thi Thuy Phuong², Le Thi Kim Xuyen¹

¹Institute of Biotechnology

²Regional Veterinary Centre VI (Ho Chi Minh City)

SUMMARY

Phylogenetic relationship between 6 strains of the Foot and Mouth Disease (FMD) collected from pigs and cattle in Tien Giang and Dong Thap (including 2 isolates from the hybrid F1 cattle) and global strains of type O, type A and type Asias-1, was established based on comparative analysis of 1D(VP1) (or 1D-2A-2B) and the 5'UTR genetic markers. The FM-DTCB-H(VN) strain from pigs was grouped with those of Taiwan and Hong Kong, while strains from the F1 hybrid cattle (FM-DTF1-B1(VN) and FM-DTF1-B2(VN)) formed a clade with the strain O10 of the Phillipines. Using a portion of VP1(1D-2A-1B) as a genetic marker, the phylogenetic and original relationship of 18 strains including 4 from Vietnam was analyzed. As a result, all the Vietnamese strains belong to type O and clustered in group I and II, among which the strains collected from domestic pigs and cattle are of *Cathay* (group I); the strain of F1 hybrid cattle is of *ME-SA (PanAsia)* sublineage (group II)

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37567297; Fax: 84-4-38363144; E-mail: imibtvn@gmail.com

while strains of type A and Asia-1 formed as an out-group (group III). Apparently, the strains of FMDV from pigs and cattle in Tien Giang and Dong Thap are divided into two taxonomic groups: type O, clade *Cathay*; and type O, clade *ME-SA(PanAsia)*, as the results obtained by the previous investigators.

Keywords: *Cathay, Foot and Mouth disease, genotyping, ME-SA(PanAsia), mutation, type O, ID(VPI)*