

GIẢI MÃ HỆ GEN CANINE DISTEMPER VIRUS GÂY BỆNH TRÊN CHÓ NĂM 2018

Đỗ Thị Roan¹, Đỗ Đức Thành³, Đặng Thị Mai Lan³, Phạm Hồng Ngọc⁴, Nguyễn Hữu Đức⁴, Nguyễn Thị Khuê^{1,2}, Nguyễn Thị Thu Hiền¹, Lê Thị Kim Xuyên^{1,2}, Lê Thanh Hòa^{1,2}, Đoàn Thị Thanh Hương^{1,2,✉}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên

⁴Học viện Nông nghiệp Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: doantthuong74@gmail.com

Ngày nhận bài: 26.4.2020

Ngày nhận đăng: 10.6.2020

TÓM TẮT

Toàn bộ hệ gen của chủng virus gây bệnh Carre trên chó (Canine Distemper Virus) thu nhận tại Hà Nội năm 2018 (CDVHN5) đã được giải mã và phân tích phá hệ nguồn gốc. Hệ gen của chủng CDVHN5 có độ dài 15.690 nucleotide, mã hóa cho hai protein không cấu trúc (protein C và V) và 6 protein cấu trúc, gồm: large protein (L), haemagglutinin (H), phosphoprotein (P), nucleocapsid protein (N), fusion protein (F) và matrix protein (M). Trong thành phần hệ gen, Adenine (A) chiếm tỷ lệ cao nhất gồm 4.798 nucleotide (30,58%); tiếp theo là Thymine (T) gồm 4.177 nucleotide, chiếm 26,62%; Guanine (G) gồm 3.450 nucleotide, chiếm 21,70% và chiếm tỷ lệ thấp nhất là Cytosine (C) gồm 3.310 nucleotide (21,10%). Tỷ lệ G+C là 42,8% thấp hơn tỷ lệ A+T (57,2%). Kết quả so sánh về trình tự nucleotide cho thấy chủng CDVHN5 của Việt Nam có tỷ lệ tương đồng cao nhất (99,7%) với chủng virus cường độc thu nhận tại Thành phố Hồ Chí Minh năm 2014 (CDV/dog/HCM/33/140816), thuộc genotype Asia-1. Chủng CDVHN5 có tỷ lệ tương đồng thấp so với các chủng thuộc các genotype khác (92,4% đến 96%) trong đó thấp nhất với chủng virus vaccine Onderstepoort-US-2002 thuộc genotype America-1 và chủng virus CDV2784-IT-2013 thuộc genotype Arctic (92,4%). Kết quả phân tích phá hệ nguồn gốc cho thấy chủng CDVHN5 thuộc genotype Asia-1 cùng với các chủng của Trung Quốc, Đài Loan, Thái Lan và Hàn Quốc. Cho đến nay mới có duy nhất một hệ gen của CDV Thành phố Hồ Chí Minh công bố trên Ngân hàng gen. Do đó việc bổ sung thêm dữ liệu hệ gen của virus này tại Việt Nam là rất cần thiết.

Từ khóa: *Canine Distemper virus, genotype, hệ gen, PCR, phá hệ*

MỞ ĐẦU

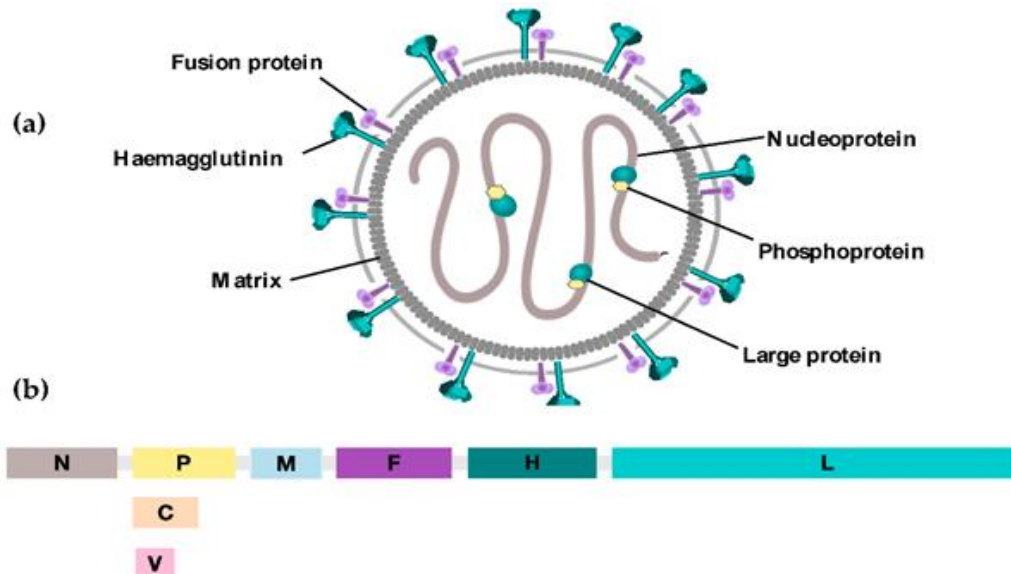
Bệnh Carre hay còn được gọi là bệnh sài sốt ở chó là một bệnh truyền nhiễm cấp tính do Canine Distemper Virus (CDV) gây ra. Đây là một virus RNA sợi đơn âm thuộc chi *Morbillivirus*, họ *Paramyxoviridae* với đặc trưng của bệnh là sốt cấp tính, rối loạn tiêu hóa, hô hấp và rối loạn hệ thần kinh, đặc biệt bệnh có tỷ lệ chết rất cao

(Nguyễn Như Pho, Võ Thị Trà An, 2003). Bệnh Carre được phát hiện lần đầu tiên ở Peru từ thế kỷ XVIII và sau đó lan ra toàn thế giới như Mỹ, Argentina, Brazil, Mexico, Nam Phi và nhiều nước Châu Âu. Ở Châu Á, bệnh được ghi nhận tại Trung Quốc (Zhao *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014), Nhật Bản (Lan *et al.*, 2006), Thái Lan (Piewbang *et al.*, 2019), Hàn Quốc (Kimet *al.*, 2018), Đài Loan (Liang *et al.*, 2008) và Ấn

Độ (Swatiet *al.*, 2015). Tại Việt Nam bệnh xảy ra tương đối phổ biến và là một trong những bệnh có tỷ lệ tử vong cao nhất ở chó (theo ghi nhận từ các phòng khám thú y).

CDV được xác định genotype chủ yếu dựa vào phương pháp sinh học phân tử, giải mã và phân tích gen kháng nguyên H (Martella *et al.*, 2006; Mochizuki *et al.*, 1999). Có ít nhất 14 genotype khác nhau của CDV đã được công bố, bao gồm Asia-1, Asia-2, Asia-3, Asia-4, Europe, European wildlife, Arctic-like, Rockborn-like, America-1, America-2, Africa, South America-1, South America-2 và South America-3 (Espinal *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2013). Ở Châu Á, một số nghiên cứu cho thấy các chủng CDV của Trung Quốc, Nhật Bản thuộc về genotype Asia-1. Các chủng của Hàn Quốc thuộc về hai genotype Asia-1 và Asia-2 (An *et al.*, 2008). Ở Thái Lan, các chủng CDV phân lập từ năm 2013 trở về trước thuộc genotype Asia-1, tuy nhiên các chủng phân lập từ 2014 trở lại đây chủ yếu thuộc genotype

Asia-4 (Piewbanget *al.*, 2019). Các chủng CDV phân lập tại Ấn Độ tách riêng khỏi nhóm Asia-1, Asia-2 và gần gũi với các chủng của Thụy Điển, Hungary và Đức (Cheng *et al.*, 2015). Virus CDV được bao phủ bởi các gai glycoprotein có kích thước 8-14 nm và chứa một nucleocapsid đối xứng xoắn ốc, có chiều dài 1 µm và đường kính 18 nm. Hệ gen CDV là phân tử RNA sợi đơn âm, có kích thước khoảng ~ 16 kb, chứa 6 gen cấu trúc và 2 gen không cấu trúc (Hình 1). Trong đó gen mã hóa cho glycoprotein H và F giúp virus dễ dàng bám dính và phân giải màng tế bào chủ. Protein H được biết đến như một kháng nguyên thường xuyên biến đổi và kháng thể của kháng nguyên này là yếu tố cần thiết để bảo vệ vật chủ khỏi sự xâm nhiễm của virus. Việc xác định genotype chủ yếu dựa vào giải mã và phân tích một phần hoặc toàn bộ gen H. Tuy nhiên để xác định một cách chính xác nhất đặc tính phân tử của chủng virus này cần phải giải mã toàn bộ hệ gen (Piewbang *et al.*, 2019).



Hình 1. Mô hình cấu trúc của Canine Distemper Virus (CDV) (Nguồn: www.veteriankey.com).

Cho đến nay có rất ít dữ liệu phân tử về CDV tại Việt Nam. Công bố của Nguyen Thi Lan và cộng sự cho thấy chủng CDV phân lập tại Việt Nam năm 2009 thuộc genotype America-1 (Lan *et al.*, 2009). Đến năm 2017

mới có thêm một số công bố mới về virus này tại Việt Nam (Nguyen *et al.*, 2017; Trần Văn Nên *et al.*, 2017). Kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng virus phân lập tại Việt Nam thuộc genotype Asia-1. Các nghiên cứu chủ yếu dựa

trên việc giải mã một phần gen H, mới có duy nhất một hệ gen được giải mã, là chủng CDV phân lập tại thành phố Hồ Chí Minh năm 2014 (Nguyen *et al.*, 2017). Ba loại vaccine phòng bệnh Carre đang được sử dụng phổ biến tại Việt Nam hiện nay là được nhập khẩu từ Mỹ, Pháp và Tiệp Khắc (thuộc genotype America-1 và Europe). Trong khi các chủng CDV phân lập gần đây tại Việt nam thuộc genotype Asia-1, có sự tương đồng thấp về trình tự nucleotide và amino acid với các chủng virus vaccine (Nguyen *et al.*, 2017; Trần Văn Nên *et al.*, 2017; Đoàn Thị Thanh Hương *et al.*, 2018). Trong tổng số 70 hệ gen của CDV đăng kí trên Ngân hàng gen bao gồm các chủng virus phân lập tại nhiều nước khác nhau, mới có duy nhất một hệ gen CDV của Việt Nam phân lập tại thành phố Hồ Chí Minh năm 2014. Chưa có công bố giải mã hệ gen nào từ các chủng phân lập tại miền Bắc, Việt Nam. Vì vậy, việc giải mã toàn bộ hệ gen của virus là cần thiết để làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu chẩn đoán, điều trị và tạo vaccine.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu bệnh phẩm nghiên cứu là hỗn dịch giết mổ, gỉ mũi của chó mắc bệnh Carre tại Hà Nội năm 2018 đã được kiểm tra dương tính bằng test thử nhanh One-step Canine Distemper Virus Ag test (IMMUNO). Mẫu được bảo quản lạnh ở -20°C đến khi sử dụng.

Tách chiết RNA tổng số

RNA tổng số bao gồm cả RNA hệ gen của virus được tách chiết bằng bộ sinh phẩm RNeasy Mini Kit (Qiagen) từ mẫu bệnh phẩm theo hướng dẫn của nhà sản xuất, được kí hiệu là CDVHN5 và bảo quản ở -80°C cho đến khi sử dụng.

Chuyển đổi RNA thành cDNA

DNA bổ sung (cDNA) được tổng hợp theo phương pháp chuyển đổi từ RNA hệ gen của virus bằng môi xúc tác (Hexamer), sử dụng bộ kit chuyển đổi của hãng Fermentas theo đúng

hướng dẫn sử dụng 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 hỗn hợp dNTP (10 mM), 8,5 μL nước khử ion DEPC, 4 μL 5X buffer; 1 μL MaximaTM Reverse Transcriptase (20 U/ μL) và 0,5 μL RiboLockTM RNase Inhibitor (20 U/ μL). Phản ứng chuyển đổi được thực hiện ở $50^{\circ}\text{C}/60$ phút và $85^{\circ}\text{C}/5$ phút. Sản phẩm cDNA được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng để thực hiện phản ứng PCR.

Thiết kế môi và thực hiện phản ứng PCR để thu nhận toàn bộ hệ gen

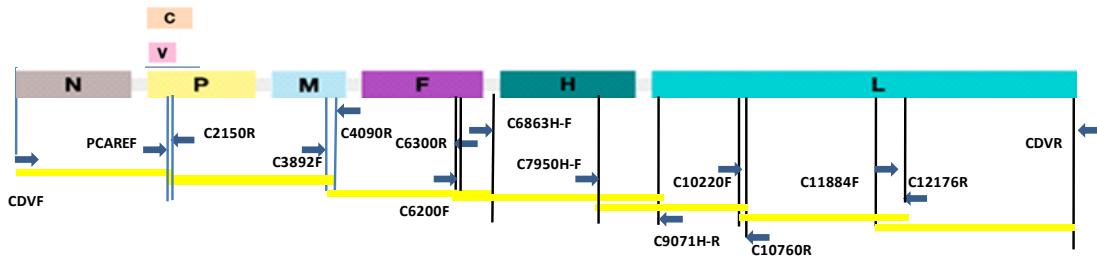
Để thiết kế được bộ môi nhằm thu toàn bộ hệ gen virus (khoảng 16 kb) chúng tôi tiến hành thu thập trình tự toàn bộ hệ gen của các chủng Canine Distemper Virus có trên Ngân hàng gen, tìm kiếm các trình tự tương đồng giữa tất cả các chủng và phân tích để thiết kế các cặp môi phù hợp, thu các phân đoạn gen có chiều dài từ 1,5 kb đến 3,9 kb. Ngoài các môi cho phản ứng PCR chúng tôi còn thiết kế các môi dùng để giải trình tự các phân đoạn DNA đã thu được từ phản ứng PCR. Các cặp môi trên được thiết kế sao cho các đoạn DNA có trình tự lồng vào nhau khoảng 100 nucleotide đến 300 nucleotide ở các đầu 5' và 3' để từ đó có thể thu nhận được toàn bộ hệ gen. Trình tự các môi sử dụng trong nghiên cứu này được trình bày trong Bảng 1. Sơ đồ vị trí bám môi được trình bày ở Hình 2.

Phản ứng PCR được thực hiện với dung tích là 50 μL , sử dụng kit Dream Taq PCR mastermix (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), bổ sung 2 μL (10pmol/ μL) mỗi loại môi, 2 μL khuôn cDNA (50ng/ μL), 2 μL DMSO (dimethyl sulfoxide), 25 μL Dream Taq PCR mastermix (2X), thêm 17 μL nước khử ion DEPC để đạt dung tích 50 μL .

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy MJ PTC-100 (USA): 1 chu kỳ ở $94^{\circ}\text{C}/5$ phút, 35 chu kỳ ($94^{\circ}\text{C}/1$ phút, $50^{\circ}\text{C}/30$ giây; $72^{\circ}\text{C}/5$ phút), chu kỳ cuối ở $72^{\circ}\text{C}/10$ phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên thạch agarose 1%, nhuộm ethidium bromide và quan sát trên máy soi gel dưới ánh sáng tia cực tím (Wealtech, Mỹ).

Bảng 1. Trình tự các mồi dùng để thu nhận toàn bộ hệ gen chủng virus CDV nghiên cứu.

TT	Tên mồi	Trình tự mồi (5'→3')	Mô tả	Vị trí/gen
1	CDVF	ACCARCMAAAGTTGGCTAWGGATAG	Mồi cho PCR	N
2	PCARREF	CAAACCTATGTCGGCCATGTACTCC	Mồi cho PCR	P
3	PCARRER	GTACCAGACTCGGGTTTGCA	Mồi giải trình tự	
4	C2150R	TCGATTCCCTTAACCTCTTCACC	Mồi cho PCR	
5	C3892F	AGCACAGAGATTTAGGGTGG	Mồi cho PCR	M
6	C4090R	ATGCACCATGAATGTCACCTTGG	Mồi cho PCR	
7	C6200F	GGTGAAGAGGTTAAGGGAATCGA	Mồi cho PCR	F
8	C6300R	AAATGGCTGATTCTGAGACG	Mồi cho PCR	
9	C6863H-F	GTCGATCCGRCATTTAAACCTG	Mồi giải trình tự	H
10	C7950H-F	TGACACTRGCTTCCTTGTGTG	Mồi cho PCR	
11	C9071H-R	ATTTGGGCTATCTAGATGGACC	Mồi cho PCR	
12	C10220F	TTAACGGTTATCGGGATAGACATGG	Mồi cho PCR	L
13	C10760R	TCGTGTTTCATCCTTTGCCATCC	Mồi cho PCR	
14	C11884F	AACATCGGGGATCCCGTGAC	Mồi cho PCR	
15	C12176R	ATCAAGAAAGCGGCTAGAGC	Mồi cho PCR	
16	C13780R	ATGACATCTTCATCACTTTTCGC	Mồi giải trình tự	
17	C14770R	ACTAACTGACCCTACCTTCCC	Mồi giải trình tự	
18	CDVR	ACCAGACAAGCTGGGTATGATAAAC	Mồi cho PCR	



Hình 2. Sơ đồ vị trí bám mồi trên hệ gen chủng virus CDV nghiên cứu.

Giải trình tự và xử lý số liệu

Các phân đoạn gen được giải trình tự trực tiếp bằng mồi xuôi và mồi ngược theo phương pháp Sanger. Chương trình GENEDOC 2.7 được sử dụng để phân tích và so sánh chuỗi gen. Xây dựng phả hệ nguồn gốc bằng chương trình MEGA7, sử dụng phương pháp "kết nối liền kề" (Neighbour-joining method) (Kumar *et al.*, 2016). Các chủng virus CDV sử dụng trong nghiên cứu, so sánh và phân tích phả hệ được trình bày ở Bảng 2.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

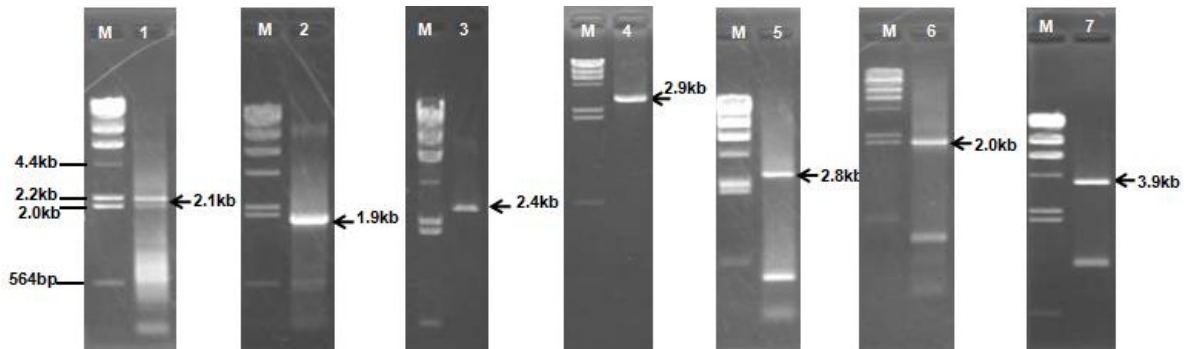
Thu nhận toàn bộ hệ gen chủng CDVHN5

RNA tổng số từ mẫu bệnh phẩm của chó nhiễm bệnh được dùng làm khuôn cho phản ứng chuyển đổi cDNA. Sử dụng các cặp mồi thiết kế đã thu nhận được các sản phẩm PCR có kích thước đúng như dự đoán ban đầu với chất lượng tốt (Hình 3).

Bảng 2. Danh sách các chủng virus CDV sử dụng trong nghiên cứu.

TT	Ký hiệu chủng	Số đăng ký NHG	Genotype	Nước phân lập	Năm phân lập
1	CDVHN5	Nghiên cứu này	Nghiên cứu này	Việt Nam	2018
2	98-2646	AY542312	America-1	Mỹ	N/A
3	BJ16C0	MF926601	America-1	Trung Quốc	2016
4	BJ16C7	MF926602	America-1	Trung Quốc	2016
5	BJ16C8	MF926603	America-1	Trung Quốc	2017
6	BJ16C9	MF926604	America-1	Trung Quốc	2017
7	CDV3	EU726268	America-1	Trung Quốc	N/A
8	Nobi-ZA	KY971530	America-1	South Africa	N/A
9	Onderstepoort	AF305419	America-1	Anh	N/A
10	Onderstepoort	AF378705	America-1	Mỹ	N/A
11	00-2601	AY443350	America-2	Mỹ	N/A
12	01-2689	AY649446	America-2	Mỹ	N/A
13	A75-17	AF164967	America-2	Thụy sĩ	N/A
14	CDV2784	KF914669	Arctic	Ý	2013
15	Canine-NTU	MK431532	Asia-1	Đài Loan	2005
16	CDV4	MH496775	Asia-1	Thái Lan	2014
17	CDV6	MH496779	Asia-1	Thái Lan	2014
18	CDV-RD-JL	KJ848781	Asia-1	Trung Quốc	2014
19	CDV-SY	KJ466106	Asia-1	Trung Quốc	2012
20	Hebei	KC427278	Asia-1	Trung Quốc	2008
21	Hlj1-06	JX681125	Asia-1	Trung Quốc	2006
22	HCM-33-140816	LC159587	Asia-1	Việt Nam	2014
23	PS	JN896331	Asia-1	Trung Quốc	2010
24	007Lm-B	AB490680	Asia-2	Nhật Bản	N/A
25	009L-H	AB490672	Asia-2	Nhật Bản	N/A
26	011C-H	AB490674	Asia-2	Nhật Bản	N/A
27	011C	AB476401	Asia-2	Nhật Bản	N/A
28	50Con	AB476402	Asia-2	Nhật Bản	N/A
29	M25CR-H	AB490681	Asia-2	Nhật Bản	N/A
30	M25CR	AB475097	Asia-2	Nhật Bản	N/A
31	CDV3	MH496774	asia-4	Thái Lan	2014
32	CDV5	MH496778	asia-4	Thái Lan	2014
33	CDV8	MH496777	asia-4	Thái Lan	2014
34	CDV-CP8	MT149210	asia-4	Thái Lan	2017
35	5804	AY386315	Europe	Mỹ	N/A
36	5804P	AY386316	Europe	Mỹ	N/A
37	CDV	MF437053	Europe	Gabon	2015
38	SVT	MH382872	Europe	Brazil	2013
39	Uy251	KM280689	Europe	Uruguay	2012
40	CDV-Kiki	MH484613	Europe	Brazil	2017
41	R252	KF640687	Europe-wildlife	Mỹ	N/A

Ghi chú: NHG: Ngân hàng gen (GenBank); N/A: không rõ (not available).



Hình 3. Kiểm tra sản phẩm PCR thu nhận các phân đoạn gen của toàn bộ hệ gen virus CDV chủng CDVHN5 trên gel agarose 1%. M: chỉ thị phân tử DNA của thực khuẩn thể Lambda được cắt bằng *HindIII*. Các đường chạy 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: bảy phân đoạn của hệ gen CDVHN5 thu được bằng các cặp mồi lần lượt là CDVF-C2150R, PCARREF-C4090R, C3892F-C6300R, C6200F-C9071H.R, C7950H.F-C10760R, C10220F-C12176R và C11884F-CDVR.

Bảng 3. Trật tự sắp xếp các gen trong hệ gen virus CDV cường độc chủng CDVHN5.

Gen	Kích thước		Vị trí trong hệ gen	Start codon	Stop codon
	bp	aa			
5'UTR	107	-	1 - 108	-	-
N	1572	523	108 - 1679	ATG	TAA
P	1524	507	1801 - 3324	ATG	TAA
V	900	298	1801 - 2269	ATG	TGA
C	525	174	1823 - 2347	ATG	TGA
M	1008	335	3432 - 4439	ATG	TAA
F	1989	662	4935 - 6923	ATG	TGA
H	1824	607	7079 - 8902	ATG	TGA
L	6555	2184	9030 - 15584	ATG	TGA
3'UTR	105	-	15585 - 15690	-	-

Sản phẩm PCR thu được được tinh sạch bằng bộ kit GeneJET PCR Purification Kit hoặc GeneJET gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) trước khi gửi đi giải trình tự trực tiếp tại the First Base (Singapore).

Bằng chương trình GENEDOC 2.7, chúng tôi đã phân tích và thu nhận toàn bộ hệ gen của chủng virus CDVHN5 nghiên cứu gồm 15.690 nucleotide, mã hóa cho 6 protein cấu trúc và 2 protein không cấu trúc có trật tự như sau: 5'- N, P (V, C), M, F, H, L - 3' (Bảng 3).

Trong toàn bộ hệ gen virus chủng CDVHN5 gồm 15.690 nucleotide, số purine A và G lần

lượt là 4.798 nucleotide (chiếm 30,58%) và 3.405 nucleotide (chiếm 21,70%); số pyrimidine T và C lần lượt là 4.177 nucleotide (chiếm 26,62%) và 3.310 nucleotide (chiếm 21,10%). Tỷ lệ G+C là 42,8% thấp hơn tỷ lệ A+T là 57,2% .

So sánh thành phần nucleotide và amino acid toàn bộ hệ gen của chủng CDV nghiên cứu

Toàn bộ hệ gen chủng CDVHN5 của Việt Nam (có độ dài 15.690 bp) được sử dụng để so sánh tỷ lệ đồng nhất về trình tự nucleotide và tương đồng về amino acid với 7 chủng của Việt Nam và thế giới thuộc các genotype khác nhau.

Bảng 4. Tỷ lệ phần trăm (%) đồng nhất về nucleotide và tương đồng về amino acid giữa chủng CDVHN5 với các genotype CDV đại diện.

Genotype/ chủng	N		P		M		F		H		L	
	Nt	Aa	Nt	Aa	Nt	Aa	Nt	Aa	Nt	Aa	Nt	Aa
Asia-1/ CDV-dog-HCM-33-140816	100	100	99,7	99,4	100	100	100	100	99,7	99,7	100	100
Asia-1/ CDV4-TH-2014	98,9	99,2	99,2	98,6	99,0	100	98,0	97,4	97,9	98,8	98,6	99,3
Asia-2/ 50Con-JP-2013	95,7	98,1	95,3	94,7	96,1	99,7	92,6	91,5	92,4	93,6	95,0	98,0
Asia-4/ CDV8-TH-2014	96,4	98,3	94,9	93,3	97,0	99,7	92,6	91,2	93,6	94,4	95,4	97,8
America-1/ Onderstepoort-US-2002	94,2	97,7	93,8	92,9	94,2	98,2	90,8	89,7	91,3	90,8	93,5	97,0
America-2/ 00-2601-US-2004	97,7	98,7	96,5	96,3	97,3	99,7	92,7	91,8	94,0	94,6	95,8	97,9
Europe/ 5804-US-2003	97,1	98,3	96,5	96,8	96,1	93,5	93,9	92,6	95,0	95,6	95,5	98,0
Arctic/ CDV2784-IT-2013	95,8	98,5	95,5	96,1	95,4	99,7	92,2	90,0	92,7	92,8	94,6	97,2

Nt: nucleotide; Aa: amino acid. Ký hiệu các gen đã cho trong bài.

Kết quả so sánh về trình tự nucleotide cho thấy chủng CDVHN5 của Việt Nam có tỷ lệ đồng nhất cao nhất (99,7%) với chủng CDV/dog/HCM/33/140816 thu nhận tại thành phố Hồ Chí Minh (Việt Nam) năm 2014, thuộc genotype Asia-1 và có tỷ lệ đồng nhất thấp so với các chủng thuộc các genotype khác (92,4 – 96%). Trong số các chủng được sử dụng để so sánh, chủng CDVHN5 có tỷ lệ tương đồng thấp nhất với hai chủng virus vaccine Onderstepoort-US-2002 thuộc genotype America-1 và chủng CDV2784-IT-2013 thuộc genotype Arctic (92,4%).

Nghiên cứu cũng đã tiến hành so sánh tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và tương đồng về amino acid trên từng gen giữa chủng CDVHN5 nghiên cứu với đại diện các genotype (Bảng 4). Có 8 vùng coding sequence được xác định mã hóa cho 8 protein N, P, C, V, F, M, H và L; trong đó gen V và gen C nằm bên trong gen P. Mã khởi đầu ATG ở vị trí 1801 là mã khởi đầu chung cho gen V và gen P. Chủng CDVHN5 có

tỷ lệ đồng nhất 100% so với chủng CDV-dog-HCM-33-140816 thu nhận tại thành phố Hồ Chí Minh năm 2014 ở các gen M, N, F và L. Ở các gen còn lại (P, C, V, H) có tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và tương đồng về amino acid vẫn đạt khá cao (> 99%). So sánh với các chủng của thế giới, chủng CDVHN5 có tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và amino acid trên 97,4% (ở tất cả các gen) so với các chủng trong cùng genotype Asia-1, tuy nhiên tỷ lệ này thấp hơn rõ rệt khi so sánh với các chủng thuộc các genotype khác.

Tỷ lệ tương đồng về nucleotide và amino acid giữa chủng CDVHN5 so với các genotype khác có sự thay đổi lớn nhất ở hai gen kháng nguyên bề mặt H và F do hai gen này thường xuyên biến đổi. Cụ thể, ở gen F, giữa chủng CDVHN5 của Việt Nam và chủng CDV2784 của Italia phân lập năm 2013 thuộc genotype Arctic có tỷ lệ tương đồng về nucleotide và amino acid thấp nhất (tương ứng là 92,2% và 90,0%). Đối với gen H, tỷ lệ tương đồng về nucleotide và amino acid giữa chủng CDVHN5

và chủng virus vaccine Onderstepoort thuộc genotype America-1 đạt thấp nhất (tương ứng là 91,3% và 90,8%).

Trong số các loại vaccine CDV đang được sử dụng tại Việt Nam, chủng virus vaccine của Mỹ thuộc genotype America-1. Giữa chủng virus này và chủng virus thực địa đang lưu hành tại Việt Nam có sự sai khác lớn về trình tự nucleotide và amino acid bên trong hệ gen, dẫn đến sự chênh lệch về tính kháng nguyên và miễn dịch. Đây là nguyên nhân dẫn đến các trường hợp chó vẫn bị mắc bệnh mặc dù đã được tiêm vaccine.

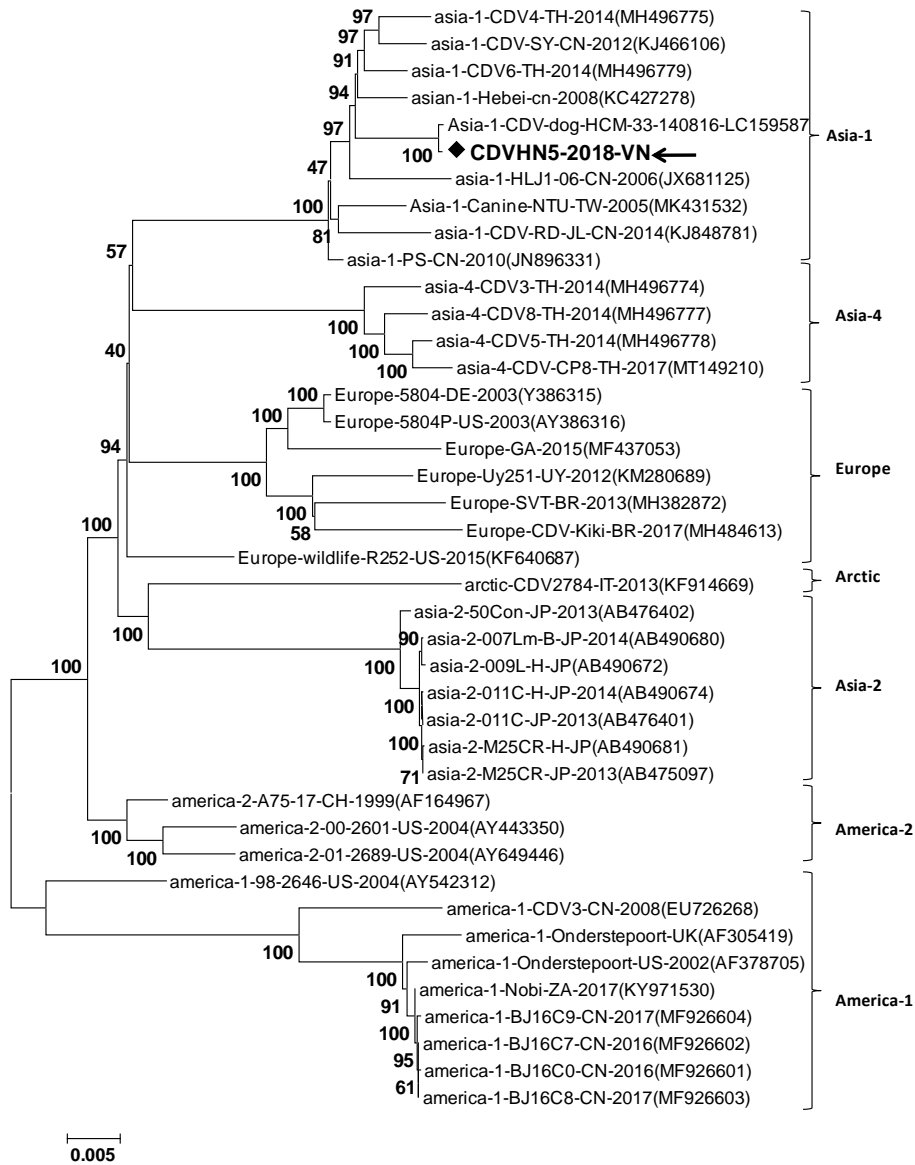
Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy sự cần thiết phải tiến hành mở rộng nghiên cứu về dịch tễ học phân tử của virus CDV đang lưu hành tại Việt Nam, từ đó lựa chọn các chủng virus vaccine phù hợp có hiệu quả phòng bệnh cao. Đồng thời lựa chọn được các chủng virus từ thực địa có tiềm năng để phát triển sản xuất vaccine.

Phân tích phả hệ nguồn gốc

Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc của các chủng CDV dựa trên dữ liệu trình tự nucleotide toàn bộ hệ gen được thể hiện ở Hình 4. Cây phả hệ cho thấy chủng CDVHN5 thu nhận tại Hà Nội năm 2018 thuộc genotype Asia-1 cùng với các chủng của châu Á bao gồm Trung Quốc, Thái Lan, Đài Loan và chủng CDV/dog/HCM/33/140816 của Việt Nam phân lập năm 2013 tại thành phố Hồ Chí Minh; trong đó có quan hệ gần gũi nhất với chủng của Việt Nam (số GenBank: LC159587). Kết quả nghiên cứu này hoàn toàn thống nhất với kết quả nghiên cứu năm 2018 khi xác định genotype của các chủng virus CDV thu nhận tại Hà Nội dựa trên dữ liệu gen H (Đoàn Thị Thanh Hương *et al.*, 2018). Các chủng CDV phân lập tại Thái Lan năm 2014 tập trung riêng thành một nhóm genotype Asia-4, và có quan hệ gần gũi hơn với nhóm genotype Asia-1 (Piewbang *et al.*, 2019). Các tác giả dự đoán rằng genotype Asia-4 tại Thái Lan gần đây có nguồn gốc từ các chủng thuộc nhóm Asia-1 tiến hóa thành (Piewbang *et al.*, 2019). Các genotype còn lại nằm ở các nhánh riêng biệt,

có độ tập trung cao theo nhóm genotype. Nhóm genotype Asia-2 gồm các chủng của Nhật Bản. Nhóm genotype America-1 gồm các chủng của Mỹ, Anh và Trung Quốc. Nhóm genotype America-2 tập hợp các chủng của Mỹ. Nhóm genotype Europe gồm tập hợp các chủng của Mỹ, Anh, Gabon, Brazil, Uruguay và Đức. Các chủng CDV của Ý thuộc genotype Arctic. Một số nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam cho thấy các chủng CDV tại Việt Nam từ năm 2013 đến 2018 chưa có sự biến đổi lớn, đều thuộc genotype Asia-1. Điều này rất thuận lợi cho công tác phòng bệnh sử dụng vaccine tại Việt Nam. Tuy nhiên điều đáng chú ý là nhiều loại vaccine đang sử dụng hiện nay được nhập khẩu từ Mỹ và các nước châu Âu, có sự khác biệt khá lớn về trật tự hệ gen, cũng như không gần gũi về phả hệ nguồn gốc với các chủng thuộc genotype Asia-1. Điều này gợi ý rằng chúng ta nên thận trọng xem xét trong đồng kháng nguyên giữa các chủng trong việc sử dụng các chủng vaccine nhập khẩu khi tiêm phòng cho chó tại Việt Nam.

Đây là nghiên cứu đầu tiên về giải mã toàn bộ hệ gen của Canine Distemper Virus phân lập tại miền Bắc, Việt Nam. Cần tiếp tục có thêm các nghiên cứu về giải mã gen/hệ gen ở nhiều vùng miền khác nhau trên toàn lãnh thổ Việt Nam. Mối quan hệ giữa các chủng CDV giúp chúng ta xác định nguồn gốc virus, từ đó định hướng sử dụng và sản xuất vaccine đạt hiệu quả cao. Đặc biệt cần kiểm tra sự có mặt hay không của genotype Asia-4 tại Việt Nam, do genotype này đã xuất hiện ở Thái Lan, một quốc gia có vị trí địa lý tương đối gần với nước ta (Piewbang *et al.*, 2019). Kết quả phân tích cũng cho thấy mức độ sai khác về trình tự nucleotide và amino acid dao động khá cao ngay giữa các chủng thuộc cùng một genotype, trong những khoảng thời gian tương đối gần. Điều đó chứng tỏ virus CDV có tốc độ biến đổi nhanh, cần phải có các biện pháp giám sát và theo dõi nguồn bệnh một cách chặt chẽ, liên tục và kịp thời. Việc nghiên cứu và khai thác nguồn gen virus CDV đang lưu hành tại Việt Nam sẽ góp phần định hướng phát triển vaccine phòng bệnh đạt hiệu quả cao hơn.



Hình 4. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ nguồn gốc giữa chủng CDVHN5 của Việt Nam và thế giới (có trong Ngân hàng gen), dựa trên trình tự toàn bộ hệ gen, sử dụng phương pháp “kết nối liền kề” (Neighbor-joining method) với hệ số tin cậy bootstrap là 1000 (Kumar *et al.*, 2016).

KẾT LUẬN

Toàn bộ hệ gen virus CDV chủng CDVHN5 gây bệnh Carre trên chó tại Hà Nội năm 2018 đã được giải mã gồm 15.690 nucleotide. Kết quả phân tích cho thấy chủng virus CDVHN5 thuộc genotype Asia-1 và có tỷ lệ đồng nhất cao (99,7%) với chủng CDV/dog/HCM/33/140816

thu được tại thành phố Hồ Chí Minh năm 2014. Giữa các chủng thuộc các genotype khác nhau có tỷ lệ tương đồng thấp cả về trình tự nucleotide và amino acid và có mối quan hệ tương đối xa trong cây phả hệ. Điều này cho thấy cần đánh giá thận trọng khi sử dụng các loại vaccine nhập ngoại có nguồn gốc từ Mỹ và các nước châu Âu tại Việt Nam.

Lời cảm ơn: Bài báo được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài NAFOSTED do Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia tài trợ: “Nghiên cứu đặc điểm hệ gen và dịch tễ học phân tử virus gây bệnh Carre (Canine Distemper Virus) và Parvovirus (Canine Parvovirus) trên chó tại Việt Nam”, mã số: 106.02-2017.10 do TS. Đoàn Thị Thanh Hương, Viện Công nghệ sinh học chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- An DJ, Yoon SH, Park JY, No IS, Park BK (2008) Phylogenetic characterization of canine distemper virus isolates from naturally infected dogs and a marten in Korea. *Vet Microbiol* 132: 389–395.
- Cheng Y, Wang J, Zhang M, Zhao J, Shao X, Ma Z, Zhao H, Lin P, Wu H (2015) Isolation and sequence analysis of a canine distemper virus from a raccoon dog in Jilin Province, China. *Virus Genes* 51: 298–301.
- Piewbang C, Radtanakantikanon A, Puenpa J, Poovorawan Y, Techangamsuwan S (2019) Genetic and evolutionary analysis of a new Asia-4 lineage and naturally recombinant canine distemper virus strains from Thailand. *Sci Rep* 9(1): 3198–3206.
- Nguyen DV, Suzuki J, Minami S, Yonemitsu K, Nagata N, Kuwata R, Shimoda H, Vu CK, Truong TQ, Maeda K (2017) Isolation and phylogenetic analysis of canine distemper virus among domestic dogs in Vietnam. *J Vet Med Sci* 79(1): 123–127.
- Đoàn Thị Thanh Hương, Nguyễn Thị Khuê, Đỗ Thị Roan, Nguyễn Ngọc Trâm, Lê Thị Kim Xuyên, Nguyễn Thị Bích Nga, Lê Thanh Hòa (2018) Đặc điểm phân tử và phá hệ nguồn gốc virus gây bệnh Carre (Cannine Distemper Virus) phân lập năm 2017 tại Hà Nội. Hội nghị khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc 2018, *Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* pp. 1705–1711.
- Espinal MA, Díaz FJ, Ruiz-Saenz, J (2014) Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. *Vet Microbiol* 172: 168–176.
- Guo L, Wang SL, Hou CD, Chen R, Yang SJ, Liu XN, Pan J, Hao HB, Zhang ZX, Cao ML, Yan QG (2013) Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from giant panda and raccoon dogs in China. *Virol J* 10: 109.
- Kim HH, Yang DK, Seo BH, Cho IS (2018) Serosurvey of Rabies Virus, Canine Distemper Virus, Parvovirus, and Influenza Virus in Military Working Dogs in Korea. *J Vet Med Sci* 80(9): 1424–1430.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725–2729.
- Lan NT, Yamaguchi R, Inomala A, Furuya Y, Uchida K, Sugono S, Tateyama S (2006) Comparative analyses of Canine distemper viral isolates from clinical cases of Canine distemper vaccinated dogs. *Vet Microbiol* 115: 32–42.
- Lan NT, Yamaguchi R, Kien TT, Hirai T, Hidaka Y, Nam NH (2009) First isolation and characterization of canine distemper virus in Vietnam with the immunohistochemical examination of the dog. *J Vet Med Sci* 71: 155–162.
- Li W, Li T, Liu Y, Gao Y, Yang S, Feng, N, Sun H, Wang S, Wang L, Bu Z, Xia X (2014) Genetic characterization of an isolate of canine distemper virus from a Tibetan Mastiff in China. *Virus Genes* 49: 45–57.
- Liang CT, Chueh LL, Lee KH, Huang HS, Uema M, Watanabe A, Miura R, Kai C, Liang SC (2008) Phylogenetic analysis and isolation of canine distemper viruses in Taiwan. *Taiwan Vet J* 34: 198–210.
- Martella V, Cirone F, Elia G, Lorusso E, Decaro N, Campolo M, Desario C, Lucente MS, Bellacicco AL, Blixenkron-Møller M, Carmichael LE, Buonavoglia C (2006) Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet Microbiol* 116: 301–309.
- Mochizuki M, Hashimoto M, Hagiwara S, Yoshida Y, Ishiguro S (1999) Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *J Clin Microbiol* 37: 2936–2942.
- Nicholas KB, Nicholas HB (1999) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignment. Distributed by authors.
- Nguyễn Như Pho, Võ Thị Trà An (2003). Bài giảng được lý thú y.

Qiu W, Zheng Y, Zhang S, Fan Q, Liu H, Zhang F, Wang W, Liao G, Hu R (2011) Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China. *Emerg Infect Dis* 17: 1541–1543.

Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S (2013) Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. *J Virol* 87: 1105–1114.

Swati DD, Sanjeev KU, Ramneek V (2015) Isolation and phylogenetic characterization of Canine

Distemper Virus from India. *Virus Dis* 26(3): 133–140.

Trần Văn Nền, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Văn Thanh, Lương Quốc Hưng (2017) Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học phân tử của virus Ca rô phân lập được tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 15(1): 44–57.

Zhao JJ, Yan XJ, Chai XL, Martella V, Luo GL, Zhang HL, Gao H, Liu YX, Bai X, Zhang L, Chen T, Xu L, Zhao CF, Wang FX, Shao XQ, Wu W, Cheng SP (2010) Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from breeding foxes, raccoon dogs and minks in China. *Vet Microbiol* 140: 34–44.

WHOLE GENOME SEQUENCING OF THE CANINE DISTEMPER VIRUS ISOLATED FROM DOG IN 2018

Do Thi Roan¹, Do Duc Thanh³, Dang Thi Mai Lan³, Pham Hong Ngoc⁴, Nguyen Huu Duc⁴, Nguyen Thi Khue^{1,2}, Nguyen Thi Thu Hien¹, Le Thi Kim Xuyen^{1,2}, Le Thanh Hoa^{1,2}, Doan Thi Thanh Huong^{1,2}

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry*

⁴*Vietnam National University of Agriculture*

SUMMARY

The complete nucleotide genome sequence for Canine Distemper Virus strain CDVHN5 isolated from a dog in Hanoi, Vietnam, in 2018, was determined and phylogenetically analyzed. The complete genome size of the CDVHN5 strain was 15,690 nucleotides, encoding for 02 non-structural proteins (C and V protein) and 06 structural proteins (large protein (L), haemagglutinin (H), phosphoprotein (P), nucleocapsid protein (N), fusion protein (F) và matrix protein (M). In the genome, base A accounted for the highest percentage of 30.5%, consisted of 4,798 nucleotides. Base T consisted of 4,177 nucleotides, accounted for 26.62%. Base G consisted of 3,450 nucleotides, accounted for 21.7%. And base C consisted of 3,310 nucleotides, accounted for 21.1%. The percentage of A+T was 57.2%, higher than that of G+C (42.8%). Nucleotide sequencing analysis showed that the CDVHN5 strain had the highest similarity (99.7%) compared with the virulent strain collected in Ho Chi Minh City in 2014 (CDV/dog/HCM/33/140816) that belongs to genotype Asia-1. Comparison to other genotypes, the CDVHN5 strain had a low percentage of nucleotide and amino acid similarities, from 92.4% to 96%, among them, the lowest rate with two strains of vaccine virus Onderstepoort-US-2002 belonging to genotype America-1 and CDV2784-IT-2013 strain of genotype Arctic (92.4%). Phylogenetic analysis showed that the CDVHN5 strain in Hanoi belonged to genotype Asia-1, similar to Chinese, Taiwan, Thailand and Korean strains. To date, the only full-length CDV sequence from Ho Chi Minh City was sequenced and published in Genbank, no data from Northern Vietnam. So that, the addition of whole genome sequence of CDV in Vietnam is essential.

Keywords: *Canine Distemper virus, genome, genotype, PCR, phylogeny*