

Xác định và phân nhóm các chủng virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn phân lập tại Việt Nam

Lương Nhân Tuấn¹, Lưu Quang Minh¹, Trần Xuân Toàn¹
Phạm Thị Phương Mai¹, Trần Xuân Hoàn¹, Đỗ Thị Hoa²

¹Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào động vật, Viện Chăn nuôi

²Trung tâm Chẩn đoán thú y Trung ương

Trong nghiên cứu này, 24 mẫu virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV) phân lập từ 16 tỉnh ở Việt Nam năm 2013 được điều tra và mối quan hệ phát sinh loài của những virus này được xây dựng dựa trên trình tự axit amin của hai gen ORF5 và Nsp2. Kết quả giải trình tự các gen trên cho thấy có sự biến đổi lớn khi so sánh với trình tự trên chủng 07/QN (Genbank code: FJ394029.1) phân lập ở tỉnh Quảng Nam. Mức độ tương đồng các trình tự axit amin được mã hóa từ trình tự nucleotide nêu trên giữa 24 mẫu virus phân lập với chủng 07/QN cũng được phân tích và đã phát hiện 19 vị trí thay đổi trên gen ORF5 và 66 vị trí thay đổi trên gen Nsp2. Đặc biệt, 3 mẫu phân lập VN/QT-2013, VN/NA-2013, VN/ND-2013 được phát hiện mất đi 3 axit amin liên tiếp tại các vị trí 869, 870 và 871. Phân tích mối quan hệ phát sinh loài đã chỉ ra tất cả các mẫu phân lập được đều thuộc nhóm II (biến thể Bắc Mỹ) và chúng có độ tương đồng rất cao với các chủng PRRSV phân lập tại Trung Quốc.

Từ khóa: gen ORF5 và Nsp2, giải trình tự, PRRSV, RT-PCR, virus.

Chỉ số phân loại 4.3

Đặt vấn đề

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS) hay còn được gọi với tên phổ biến là “Bệnh lợn tai xanh” là một bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi lợn trên thế giới. Ở Việt Nam, từ tháng 3.2007, bệnh bắt đầu gây dịch tại nhiều địa phương, làm tổn thất lớn về kinh tế cho người chăn nuôi. Đặc biệt năm 2010, dịch đã xuất hiện tại 1.978 xã, phường thuộc 286 quận, huyện của 49 tỉnh, thành phố. Tổng số lợn mắc bệnh là 812.947 con, số lợn chết và buộc phải tiêu hủy là 442.699 con (Đặng Văn Kỳ, 2012).

Bệnh gây ra bởi porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Về mặt phân loại, PRRSV thuộc chi *Arterivirus*, họ *Arteriviridae*, bộ *Nidovirales* (Cavanagh D Nidovirales và cs, 1997). Có hai nguyên mẫu biến thể của PRRSV: type I biến thể châu Âu là Ielystad virus (LV) và type II biến thể Bắc Mỹ là VR-2332. Các chủng Bắc Mỹ và châu Âu của PRRSV gây ra các hội chứng lâm sàng tương tự nhau, nhưng chúng có hai kiểu gen riêng biệt sai khác nhau xấp xỉ 40% (Thiel H.J và cs, 1993). Về

mặt di truyền, hệ gen virus gây bệnh tai xanh ở lợn là loại virus nhỏ có hệ gen là ARN sợi dương có kích thước khoảng 15 Kbp. ARN virus có vỏ bọc và chứa ít nhất 9 khung đọc mở (open reading frames - ORF). Nằm ngay ở vùng không phiên mã ở đầu 5' là ORF1a và ORF1b mã hóa cho các protein phi cấu trúc tham gia vào quá trình phiên mã và sao chép của virus, tiếp theo ORF2a, ORF2b và các khung đọc mở từ ORF3 đến ORF7 mã hóa cho các protein cấu trúc của virus (Kim H.K và cs, 2009; Kim S.H và cs, 2010).

Khung đọc mở ORF5 mã hóa cho một phân tử protein màng không bị đường hóa có trọng lượng 17 kD hoặc một phân tử protein đường hóa trọng lượng 25 kD (Mardassi H và cs, 1995). Hơn thế nữa, vùng ORF5 của PRRSV là vùng gây đáp ứng miễn dịch chủ đạo bởi nó liên quan tới việc hình thành những kháng thể trung hòa. Trên thực tế ở PRRSV type II khung đọc ORF5 có chứa 3 vị trí epitope của tế bào B và 2 vị trí epitope của tế bào T. Nói cách khác, đây là vùng di truyền quyết định chủ yếu đến độc lực của virus khi xâm nhập vào cơ thể vật chủ (Mardassi H và cs, 1995; Kim H.K và cs, 2009).

PHYLOGENETIC RELATIONSHIP OF THE PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUSES (PRRSV) ISOLATED IN VIETNAM

Summary

In this study, 24 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) samples isolated from 16 provinces in Vietnam in 2013 were investigated, and the phylogenetic relationship of these viruses was constructed based on the amino acid sequences of ORF5 and Nsp2 genes. The sequencing results of these genes indicated the high variation compared to the sequence of 07/QN strain (Genbank code: FJ394029.1) isolated in Quang Nam province. The identity of amino acid sequences deducted from the nucleotide sequences between the 24 isolates and 07/QN strain was also analysed; 19 variations in ORF5 gene and 66 variations in Nsp2 gene were found. Especially, three isolates VN/QT-2013, VN/NA-2013, and VN/ND-2013 were found to possess three-continuous amino acid deletions (869-871) within Nsp2 gene. Phylogenetic analyses based on the ORF5 and Nsp2 amino acids indicated that all these isolates were grouped into PRRSV type II (North American genotype) and they were highly similar to PRRSV strains isolated in China.

Keywords: ORF5 and Nsp2 genes, PRRSV, RT-PCR, sequencing, virus.

Classification number 4.3

Gen Nsp2 là gen mã hóa cho 1 protein phi cấu trúc (non structural protein 2) tham gia vào quá trình phiên mã và sao chép của PRRSV. Gen Nsp2 nằm ở vị trí khung đọc mở ORF1a. Tian K và cs (2007) đã phân tích trình tự gen Nsp2 của chủng virus gây dịch ở Trung Quốc năm 2006 phát hiện sự thiếu hụt 30 axit amin so với các chủng phát hiện trước đó và chủng mới phát hiện này có độc lực cao hơn hẳn các chủng cổ điển.

Hiểu biết về sự đa dạng và tiến hóa của PRRSV sẽ đem lại hiệu quả cao trong quá trình nghiên cứu vaccine điều trị bệnh gây ra bởi virus này. Do vậy, chúng tôi đặt mục tiêu giải trình tự 2 vùng gen quan trọng ORF5 và Nsp2 từ các mẫu PRRSV phân lập

tại Việt Nam năm 2013 nhằm đánh giá sự biến đổi các nucleotide, từ đó phân nhóm các virus và đánh giá mối quan hệ giữa các mẫu phân lập này.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là các mẫu PRRSV được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm thu thập từ các ổ dịch ở các vùng của Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết RNA virus từ các mẫu bệnh phẩm thu được: mẫu bệnh phẩm là mô phổi sau khi thu được bao gói cẩn thận, đưa vào dung dịch RNA-later và bảo quản mát ở 2÷8°C, sau đó được chuyển ngay về phòng thí nghiệm. Tại đây, mẫu được bảo quản ở nhiệt độ -70°C trước khi tiến hành tách chiết RNA tổng số.

Tiến hành tách chiết RNA: khoảng 3 mg mẫu phổi, cắt nhỏ rồi nghiền trong cối chày sứ vô trùng trong dung dịch nitơ lỏng. Hòa mẫu với 3 ml dung dịch PBS (pH = 7,4) thành huyền dịch 10% rồi ly tâm 2000 g trong 15 phút. Hút lấy dịch nước trong ở phía trên xử lý với kháng sinh penicillin (200 UI/ml) và Streptomycin (200 µg/ml), hoặc có thể lọc vô trùng qua màng lọc có kích thước lỗ lọc 0,45 µm. Sau đó sử dụng bộ kit *Rneasy mini Kit* của Qiagen để tách chiết RNA.

Phương pháp chạy RT-PCR: theo kit superScript III first - strand synthesis system của hãng Invitrogen.

Phương pháp PCR: chạy theo protocol Hot Start Taq DNA Polymerase của Fermentas: trình tự cặp mỗi nhân lên đoạn gen Nsp2 như sau: Nsp2- F: 5'-AAA GAC CAG ATG GAG GAG GA-3', Nsp2-R: 5'-GAG CTG AGT ATT TTG GGC GTG-3; trình tự cặp mỗi nhân lên toàn bộ khung đọc gen ORF5 như sau: ORF5-F: 5'-ATG TTG GGG AAG TGC TTG ACC-3', ORF5-R: 5'-CTA GAG ACG ACC CCA TTG TTC CGC-3'.

Phương pháp điện di: điện di trên gel agarose 1,5%.

Phương pháp tinh sạch ADN từ gel: tinh sạch theo kit Free UV Gel Extraction của hãng Invitrogen.

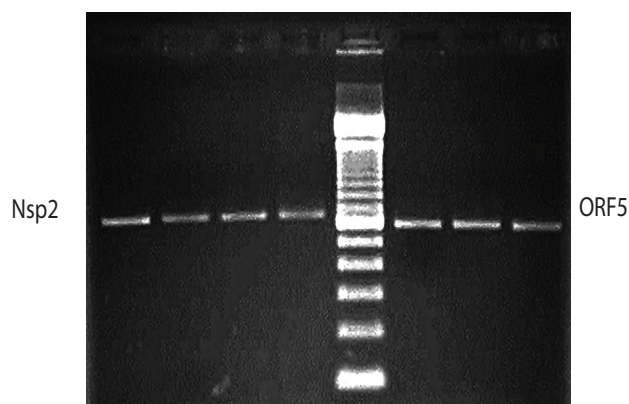
Giải trình tự gen: tiến hành giải trình tự trên máy ABI-3130, kit sử dụng cho phản ứng *Terminator V 3.1 Cycle Sequencing Kit* của hãng ABI, kit làm sạch sau phản ứng *BigDye® X Terminator™ - Purification Kit* của hãng ABI.

Phương pháp xử lý số liệu: bằng phần mềm Bioedit version 7.0.5.3 và MEGA 5.1.

Kết quả và thảo luận

Kết quả nhân PCR hai đoạn gen Nsp2 và ORF5

Đã tách được 24 mẫu mRNA từ 24 mẫu bệnh phẩm và tổng hợp thành công 24 mẫu cDNA trên máy realtime PCR. Tiến hành phản ứng PCR từ 24 mẫu cDNA nhân lên 2 gen Nsp2 và ORF5 (sử dụng 2 cặp mỗi nghiên cứu). Kết quả kiểm tra trên điện di cho thấy hai gen Nsp2 và ORF5 đã được nhân lên thành công có kích thước tương ứng là 666 bp và 603 bp, phù hợp với kích thước lý thuyết (hình 1). Marker sử dụng là 1 kb DNA ladder.



Hình 1: kết quả điện di sản phẩm PCR hai gen Nsp2 và ORF5 trên gel agarose

Sản phẩm PCR sau đó được tiến hành tinh sạch bằng kit *Purelink™ PCR Purification Kit* của hãng Invitrogen. Kết quả cho thấy, sản phẩm PCR được thu hồi sau tinh sạch có hàm lượng đủ cho các nghiên cứu tiếp theo.

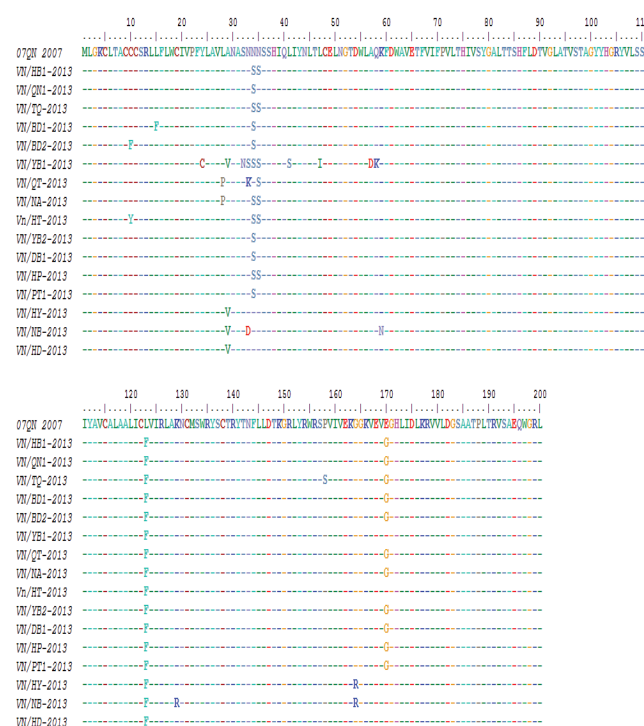
Phân tích trình tự và so sánh sự sai khác trình tự gen ORF5

Sản phẩm PCR gen ORF5 sau khi tinh sạch được giải trình tự 2 chiều, sử dụng máy giải trình tự ABI 3130, sau đó chúng tôi đã tiến hành so sánh (blast) trên ngân hàng gen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) và kết quả xác định trình tự thu được tương đồng với trình tự ORF5 công bố. Bằng phần mềm Bioedit, chúng tôi đã so sánh và chỉ ra một số mẫu có độ tương đồng hoàn toàn với nhau về trình tự gen, cụ thể là: các mẫu VN/HB1-2013, VN/HN-2013, VN/HB2-2013, VN/ND-2013 và VN/PT2-2013 tương đồng; các mẫu VN/YB2-2013, VN/YB3-2013, VN/YB4-2013 tương đồng; các mẫu VN/DB1-2013, VN/DB2-2013 và VN/BN-2013 tương đồng.

Trình tự gen ORF5 của các mẫu sau đó được so sánh với trình tự của chủng 07/QN (*Genbank code: FJ394029.1*) là chủng PRRSV thu được ở Quảng Nam, Việt Nam năm 2007 (Youjun Feng và cs,

2008). Từ kết quả ta thấy, có tổng số 167 vị trí sai khác trên chuỗi trình tự 603 nucleotide gen ORF5 (tỷ lệ 27,7%). Điều này cho thấy gen ORF5 có khả năng đột biến cao.

Khi so sánh trình tự axit amin gen ORF5 của các mẫu thu được và chủng 07/QN, ta thấy có 19 vị trí axit amin bị biến đổi trên toàn bộ chuỗi polypeptide 201 axit amin của gen ORF5 (hình 2). Như vậy, so với 167 vị trí sai khác nucleotide thì có rất nhiều vị trí đột biến câm, không ảnh hưởng đến trình tự chuỗi polypeptide gen ORF5. Bên cạnh đó, trong các mẫu thu được ta thấy mẫu VN/YB1-2013 là mẫu có nhiều vị trí axit amin sai khác nhất (13 vị trí) và mẫu VN/HD-2013 là mẫu có ít sai khác nhất (2 vị trí).

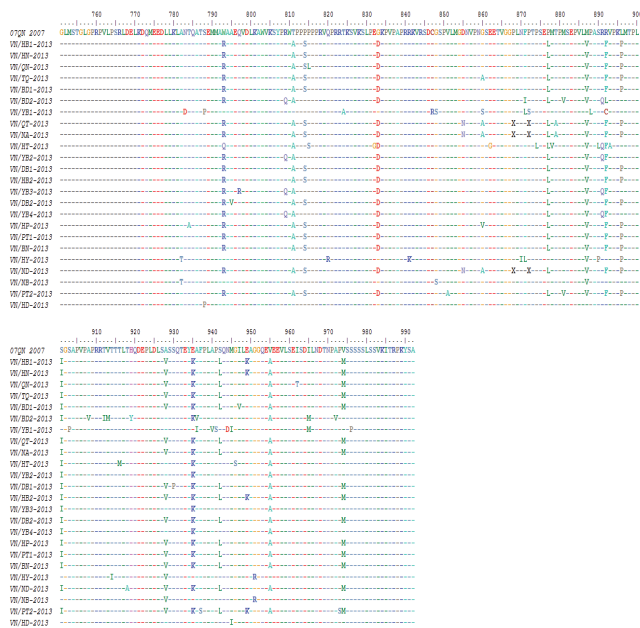


Hình 2: so sánh sự sai khác trình tự axit amin gen ORF5 của các mẫu thu được với chủng 07/QN (phần mềm Bioedit)

Phân tích trình tự và so sánh sự sai khác trình tự gen Nsp2

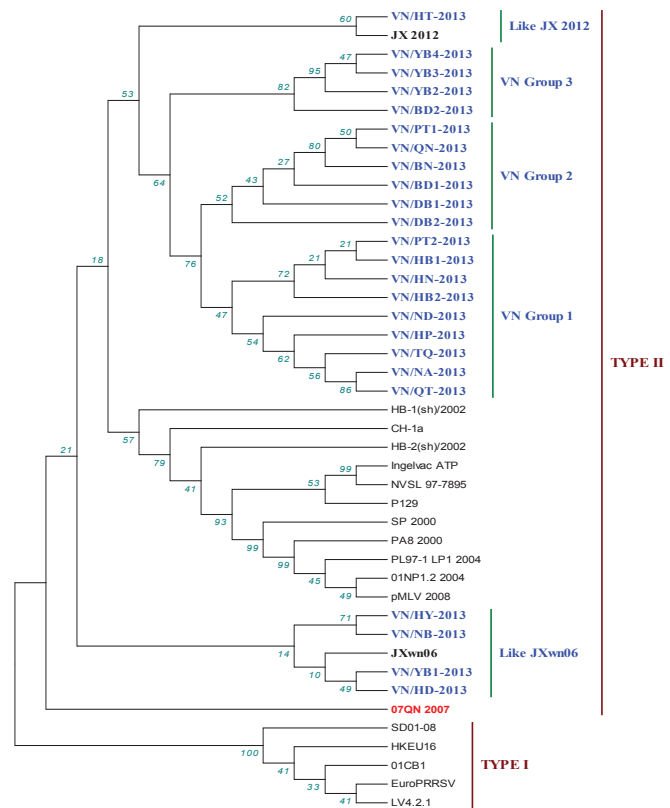
Sau khi giải trình tự gen Nsp2 và so sánh (blast) các mẫu giải trình tự trên ngân hàng gen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), chúng tôi thấy kết quả xác định trình tự có độ tương đồng cao với trình tự gen Nsp2 của PRRSV công bố. Khi phân tích mức độ tương đồng giữa các mẫu thu được, sử dụng phần mềm Bioedit, chúng tôi thu được kết quả một số mẫu có trình tự tương đồng hoàn toàn: mẫu VN/HB1-2013, VN/HN-2013, VN/HB2-2013 tương đồng; mẫu VN/YB2-2013, VN/YB4-2013 tương đồng.

Tiến hành so sánh trình tự axit amin gen Nsp2 của các mẫu thu được và chủng 07/QN ta thấy xuất hiện 66 vị trí axit amin bị biến đổi (hình 3). Như vậy so với 127 vị trí sai khác nucleotide thì có nhiều vị trí đột biến câm, không ảnh hưởng đến trình tự chuỗi polypeptide gen Nsp2. Trong các mẫu thì mẫu VN/BD2-2013 là mẫu có nhiều vị trí axit amin sai khác nhất (20 vị trí) và mẫu VN/HD-2013 là mẫu có ít vị trí sai khác nhất (2 vị trí). Ở một số vị trí axit amin hầu hết các mẫu đều có sai khác với chủng 07QN như R793W, A811T, S814P, D833G, L877P, V887M, F892R, P896L, V928A, K935E, L942S, A955V, M974V. Đặc biệt, 3 mẫu VN/QT-2013, VN/NA-2013, VN/ND-2013 bị mất 3 axit amin ở vị trí 869, 870 và 871.



Xác định quan hệ di truyền và phân nhóm các mẫu virus nghiên cứu

năm 2013 đều thuộc type II và có khoảng cách di truyền gần với các chủng thu được ở Trung Quốc như JX 2012, JXwn06 (hình 4). Dựa vào quan hệ di truyền của các mẫu thu được, ta có thể chia các mẫu thành các nhóm, kết quả được trình bày trong bảng 1.



Bảng 1: phân nhóm các mẫu virus phân lập được dựa vào mối quan hệ di truyền

STT	Nhóm	Mẫu
1	Like - JX2012	VN/HT-2013
2	VN - Group 1	VN/PT2-2013, VN/HB1-2013, VN/HN-2013, VN/HB2-2013, VN/ND-2013, VN/HP-2013, VN/TQ-2013, VN/NA-2013, VN/QT-2013
3	VN - Group 2	VN/PT1-2013, VN/QN-2013, VN/BN-2013, VN/BD1-2013, VN/DB1-2013, VN/DB2-2013
4	VN - Group 3	VN/BD2-2013, VN/YB2-2013, VN/YB3-2013, VN/YB4-2013
5	Like - JXw2006	VN/HY-2013, VN/NB-20013, VN/YB1-2013, VN/HD-2013

Kết luận và kiến nghị

Kết luận

Hai đoạn gen ORF5 và Nsp2 phân tích có tính đa hình cao. So với chủng 07/QN (*Genbank code: FJ394029.1*) phân lập tại tỉnh Quảng Nam năm 2007, trình tự axit amin các gen ORF5 và Nsp2 của các mẫu phân tích có nhiều biến đổi, cụ thể là trong trình tự axit amin gen ORF5 và Nsp2 xuất hiện tương ứng 19 và 66 vị trí sai khác. Đặc biệt, 3 mẫu VN/QT-2013, VN/NA-2013, VN/ND-2013 bị mất 3 axit amin ở vị trí 869, 870 và 871 trên gen Nsp2. Kết quả này là cơ sở cho những đánh giá về sự biến chủng của PRRSV ở Việt Nam sau này.

Tất cả các chủng PRRSV phân tích đều thuộc type II (chủng Bắc Mỹ) và có quan hệ di truyền gần với các chủng PRRSV từ Trung Quốc và chủng 07/QN phân lập ở Quảng Nam/Việt Nam năm 2007.

Kiến nghị

- PRRSV có khả năng biến đổi cao, vì vậy cần theo dõi liên tục nhằm đánh giá kịp thời các biến đổi của virus để có các biện pháp đối phó kịp thời và hiệu quả.

- Dựa vào kết quả nghiên cứu thấy rằng, chủng virus gây bệnh ở Việt Nam có quan hệ di truyền gần gũi với các chủng của Trung Quốc, do đó sử dụng vacxin sản xuất từ Trung Quốc sẽ có hiệu quả tốt hơn.

Tài liệu tham khảo

1. Cavanagh D. Nidovirales (1997), "A new order comprising coronaviridae and arteriviridae", *Arch Virol*, **142**, 629-633.
2. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
3. Kim H.K, Yang J.S, Moon H.J, Park S.J, Luo Y, Lee C.S, Song D.S, Kang B.K, Ann S.K, Jun C.H, Park B.K (2009), "Genetic analysis of ORF5 of recent Korean porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in viremic sera collected from MLV - vaccinating or non - vaccinating farms", *J. Vet. Sci*, **10**, 121-130.
4. Kim S.H, Roh I.S, Choi E.J, Lee C, Lee C.H, Lee K.H, Lee K.K, Song Y.K, Lee O.S, Park C.K (2010), "A molecular analysis of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in South Korea", *Vet. Microbiol*, **143**, 394-400.
5. Đặng Văn Kỳ (2012), "Hội chứng rối loạn PRRS và kinh nghiệm phòng chống", *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, số 2.
6. Mardassi H, Mounir S, Dea S (1995), "Structural gene analysis of a quebec reference strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus", *Adv Exp Med Biol*, **380**, 277-281.
7. Thiel H.J, Meyers G, Stark R, Tautz N, Rumenapf T, Unger G, Conzelmann K.K (1993), "Molecular characterization of positive - strand RNA viruses: pestiviruses and the porcine reproductive and respiratory syndrome virus", *Arch Virol Suppl*, **7**, 41-52.
8. Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, Hu Y, Chen X, Hu D and other authors (2007), "Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark", *PLoS ONE*, **2**, e526.
9. Youjun Feng, Tiezhu Zhao, Tung Nguyen, Ken Inui, Ying Ma, Thi Hoa Nguyen, Van Cam Nguyen, Di Liu, Quang Anh Bui, Long Thanh To, Chuanbin Wang, Kegong Tian, and George F. Gao (2008), "Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus Variants, Vietnam and China", *Emerging Infectious Diseases*, **Vol.14, No.11**.