

ĐA DẠNG DI TRUYỀN GEN ORF5 CỦA MỘT SỐ CHỦNG VIRUS PRRS PHÂN LẬP TỪ NĂM 2011 ĐẾN NĂM 2013 TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM

*Đỗ Hải Quỳnh¹, Vũ Thị Thu Hằng²,
Thân Đức Dương², Nguyễn Bá Hiên¹, Lê Văn Phan^{1*}*

TÓM TẮT

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS) là một trong những nguyên nhân gây thiệt hại kinh tế quan trọng cho ngành chăn nuôi lợn ở Việt Nam. Việc phân tích về đa dạng di truyền của các chủng virus PRRS phân lập được ngoài thực địa đóng vai trò quan trọng trong việc xây dựng chiến lược phòng chống bệnh. Trong nghiên cứu này, 6 chủng virus PRRS đã được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm thu thập được ngoài thực địa trong giai đoạn 2011 – 2013 và được giải trình tự và phân tích vùng gen ORF5. Kết quả phân tích về trình tự nucleotide (nt) và amino acid (aa) của gen ORF5 cho thấy cả 6 chủng virus có mức độ tương đồng với nhau rất cao, tỷ lệ tương đồng về nt là 96,5 – 99,8% và về aa là 94,0 – 99,5%. Kết quả phân tích về cây phả hệ cho thấy cả 6 chủng virus đều thuộc dòng (type) Bắc Mỹ, nhánh (sub-lineage) 8.7.

Từ khóa: Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn, Đa dạng di truyền, ORF5, Miền Bắc Việt Nam

Genetic variation of ORF5 gene of some Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated from 2011 to 2013 in the North of Viet Nam

*Do Hai Quynh, Vu Thi Thu Hang,
Than Duc Duong, Nguyen Ba Hien, Le Van Phan*

SUMMARY

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is one of the diseases causing heavy loss in the swine industry in Viet Nam. The evaluation of the genetic diversity of PRRSV strains plays an important role in developing disease prevention strategies. In this study, the ORF5 gene of 6 field PRRS viruses isolated in Viet Nam during 2011 – 2013 was sequenced and analyzed. The result of nucleotide (nt) and amino acid (aa) comparison showed that 6 field PRRS viruses were closely related to each other, sharing high similarity level (96.5 – 99.8%) on nt and (94.0 – 99.5%) on aa. The result of phylogenetic analysis showed that all of 6 above PRRSV strains belonged to North America genotype, sub-lineage 8.7.

Keywords: PRRS, Genetic variation, ORF5, North Viet Nam

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS), còn được gọi là bệnh tai xanh, được coi là một trong những nguyên nhân chính gây tổn thất cho ngành chăn nuôi lợn ở nhiều quốc

gia trên thế giới. Bệnh được phát hiện lần đầu tiên ở Mỹ vào năm 1987 (Collin và cộng sự, 1992), và lây lan sang các nước châu Âu (Barron và cộng sự, 1992). Bệnh do virus PRRS gây ra thuộc chi *Arterivirus*, họ *Arteriviridae*, bộ *Nidovirales* (Cavanagh, 1997; Mayo, 2002). Kết quả phân tích genome của virus cho thấy PRRS virus được chia thành 2 loại dựa trên kiểu gen (genotype) gồm loại châu Âu (European type

¹ Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Công ty CP Phát triển Công nghệ Nông thôn (RTD)

hay type 1) với đại diện là chủng Lelystad và loại Bắc Mỹ (North American type hay type 2) với đại diện là chủng VR2332.

Ở Việt Nam, năm 1997, kiểm tra huyết thanh học đối với 51 lợn giống nhập khẩu từ Mỹ cho thấy, 10/51 mẫu có kết quả dương tính. Tuy nhiên, bệnh PRRS bắt đầu lan rộng ở Hải Dương năm 2007 và nhanh chóng lây lan ra 13 tỉnh thành trên khắp cả nước, hậu quả là hàng ngàn con lợn được cho là đã nhiễm bệnh (Metwally và cộng sự, 2010). Từ đó đến nay, bệnh xảy ra liên tục trên cả nước, gây thiệt hại nặng đối với ngành chăn nuôi lợn (Nguyễn Ngọc Tiến, 2012). Kết quả điều tra cho thấy, hầu hết các đàn lợn ở Việt Nam đều đã từng phơi nhiễm với virus PRRS (Nguyễn Văn Cẩm, 2012). Phân tích mối quan hệ di truyền cho thấy, hầu hết các chủng PRRS phân lập ở Việt Nam thuộc loại Bắc Mỹ, và có quan hệ di truyền gần gũi với chủng độc lực cao JXA1 phân lập ở Trung Quốc (Metwally và cộng sự, 2010; Nguyen Thi Dieu Thuy và cộng sự, 2013).

Genome virus PRRS có kích thước khoảng 15 kilobase và bao gồm 9 khung đọc mở (Meulenberg và cộng sự, 1993). Trong đó gen ORF5 mã hóa cho glycoprotein 5 (GP5) nằm trên bề mặt vỏ của hạt virus. GP5 đóng vai trò quan trọng trong quá trình xâm nhiễm của virus vào tế bào vật chủ và có chứa những vùng mang đặc điểm kháng nguyên quan trọng có liên quan đến khả năng trung hòa virus của kháng thể (Dea và cộng sự, 2000). Bên cạnh đó, GP5 còn là một protein cấu trúc có sự đa dạng về mặt di truyền. Chính vì lẽ đó, gen ORF5 được sử dụng rộng rãi trong việc đánh giá sự đa dạng di truyền của

virus PRRS (Li và cộng sự, 2010; Nguyen Thi Dieu Thuy và cộng sự, 2013). Trong nghiên cứu này, trình tự gen ORF5 của 6 chủng virus PRRS được phân lập từ các địa phương khác nhau từ năm 2011 đến năm 2013 đã được giải trình tự, được phân tích và so sánh với các chủng virus PRRS tham chiếu khác.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương pháp phân lập virus PRRS

Tế bào Marc-145 được nuôi cấy trong môi trường DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) có bổ sung 5% huyết thanh và được dùng để phân lập virus PRRS. Trong nghiên cứu này, phổi của lợn nghi mắc bệnh PRRS là mẫu bệnh phẩm được dùng để phân lập virus PRRS. Mẫu bệnh phẩm được nghiền trong cối chày sứ, được đồng nhất, và được hòa thành huyền dịch 5% trong môi trường DMEM. Huyền dịch trên được ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút, ở điều kiện 4°C. Dịch ly tâm sau đó được lọc qua màng lọc vi khuẩn (đường kính lỗ lọc 0,45µm) rồi đem gây nhiễm vào tế bào Marc-145. Tế bào sau khi được gây nhiễm virus sẽ được nuôi cấy trong tủ ấm 37°C với 5% CO₂, nuôi cấy trong 4 ngày và hàng ngày kiểm tra bệnh tích tế bào (CPE). Sau 4 ngày gây nhiễm virus, tế bào gây nhiễm được đông tan 3 lần và được ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút, ở điều kiện 4°C. Huyền dịch sau khi ly tâm sẽ được cấy truyền đời tiếp trên môi trường tế bào Marc-145. Thường trong những lần cấy chuyển đầu tiên sẽ không quan sát được bệnh tích tế bào. Sau 3-5 đời cấy truyền trên môi trường tế bào, virus PRRS sẽ được chẩn đoán bằng kỹ thuật RT-PCR.

Bảng 1. Thông tin về các chủng virus PRRS được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Ký hiệu chủng	Thời gian thu nhận	Địa phương	Mã số truy cập trên ngân hàng GenBank
1	HUA-HP1963	12/2011	Lào Cai	KF699844
2	HUA-HP2228	6/2012	Hà Nội	KF699845
3	HUA-HP1	5/2013	Bắc Giang	KF699846
4	HUA-HP2	5/2013	Bắc Giang	KF699847
5	HUA-HP3	6/2013	Vĩnh Phúc	KF699848
6	HUA-HP4	6/2013	Vĩnh Phúc	KF699849

2.2 Phương pháp tách chiết RNA của virus PRRS

Trizol (Invitrogen) được dùng để tách chiết RNA của virus PRRS, các bước được tiến hành theo sự chỉ dẫn của Kit. Cụ thể bổ sung 800 μ l dung dịch Trizol vào 200 μ l huyền dịch virus PRRS, vortex và sau đó bổ sung tiếp 200 μ l dung dịch Chloroform, vortex mạnh trong 15 giây, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Huyền dịch trên được ly tâm 12.000 vòng/phút, trong 10 phút ở 4°C. Sau khi ly tâm, chuyển pha trên có chứa RNA vào một ống Eppendorf mới (với lượng khoảng 500 μ l). Tủa RNA của virus PRRS bằng cách bổ sung 500 μ l dung dịch Isopropanol, ly tâm 12.000 vòng/phút, trong 10 phút ở 4°C. Rửa tủa RNA bằng 1 ml dung dịch Ethanol 70%, ly tâm 12.000 vòng/phút, trong 10 phút ở 4°C. Hòa RNA trong 30 μ l nước vô trùng đã loại *Rnase* và bảo quản ở -20°C.

2.3 Phương pháp tổng hợp cDNA

cDNA được tổng hợp từ RNA đã được tách chiết nhờ enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase). Để tạo cDNA, chúng tôi dùng bộ kit SuperScript™ (Invitrogen) sử dụng mỗi Oligo dT với trình tự 5'- CTGTGAATGCTG-CGACTACGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'. Thành phần phản ứng và điều kiện tổng hợp cDNA như sau: 5 μ l RNA tinh sạch, 4,5 μ l nước đã loại RNase, 3 μ l dNTPs (2,5mM mỗi loại), 2 μ l mỗi oligo dT (200pM/ μ l), 1 μ l Superscript™ II RNase H-reverse transcriptase (200U/ μ l), 0,5 μ l RNase inhibitor (10U/ μ l) và 4 μ l 5x first strand buffer. Phản ứng tổng hợp cDNA được thực

hiện ở 37°C trong 60 phút và sau đó 94°C trong vòng 5 phút.

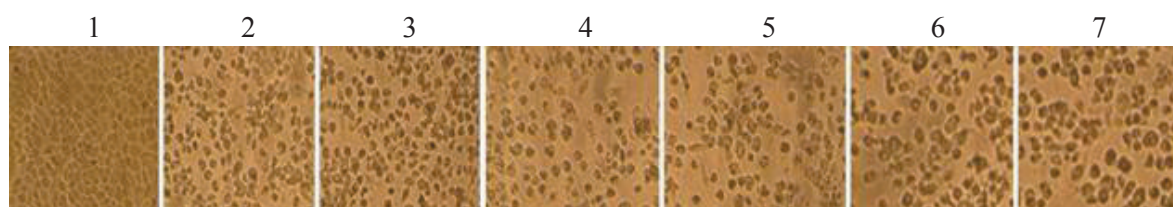
2.4 Phương pháp PCR và giải trình tự gen (sequencing)

cDNA được tổng hợp ở trên được bổ sung trực tiếp vào ống phản ứng PCR sử dụng kit AccuPower PCR PreMix (BIONEER). Kit này chứa DNA taq-polymerase và các thành phần cần thiết cho quá trình khuếch đại DNA. Mỗi (primer) được sử dụng trong nghiên cứu này là các cặp mồi đã được công bố trước đây (Feng và cộng sự, 2008; Han và cộng sự, 2009). Phản ứng PCR được thực hiện theo chương trình như sau: 25 chu kỳ (94°C - 1 phút, 54°C - 1 phút, 72°C - 1 phút) và cuối cùng 8 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR sẽ được kiểm tra trên gel agarose và được gửi sang công ty Macrogen của Hàn Quốc để giải trình tự gen. Trình tự DNA thu được sẽ được phân tích bằng phần mềm BioEdit và DNASTar.

III. KẾT QUẢ

3.1 Kết quả phân lập virus PRRS

Phân lập được virus PRRS gây bệnh là một bước quan trọng trong tiến trình nghiên cứu về bảo tồn quỹ gen, nghiên cứu tạo kit chẩn đoán, nghiên cứu sản xuất vaccin... Kết quả phân lập virus PRRS cho thấy sau 3 đời cấy truyền mù (blind passage) trên môi trường tế bào Marc-145, virus PRRS được phân lập từ mẫu phổi của lợn nghi mắc bệnh PRRS có khả năng gây bệnh tích tế bào (CPE) điển hình (hình 1).



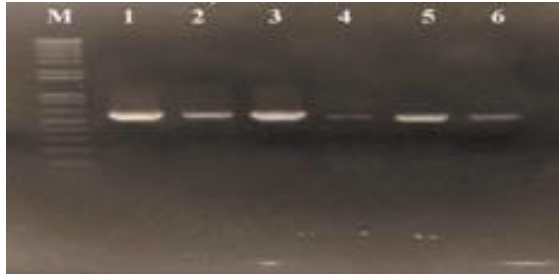
Hình 1. Kết quả phân lập virus PRRS trên môi trường tế bào Marc-145

1: Đối chứng âm tế bào không được gây nhiễm virus;

2-7: Tế bào Marc-145 sau khi được gây nhiễm với 6 chủng virus khác nhau là HUA-HP1963, HUA-HP2228, HUA-HP1, HUA-HP2, HUA-HP3, và HUA-HP4.

Kết quả ở hình 1 cho thấy 100% tế bào Marc-145 bị phá hủy hoàn toàn sau 72 giờ gây nhiễm virus.

Để biết chính xác virus phân lập được là virus PRRS, phản ứng RT-PCR, cặp mồi đặc hiệu của Feng và cộng sự (2008) đã được sử dụng. Kết quả chẩn đoán cho thấy cả 6 chủng virus đều đã được phân lập thành công (hình 2).

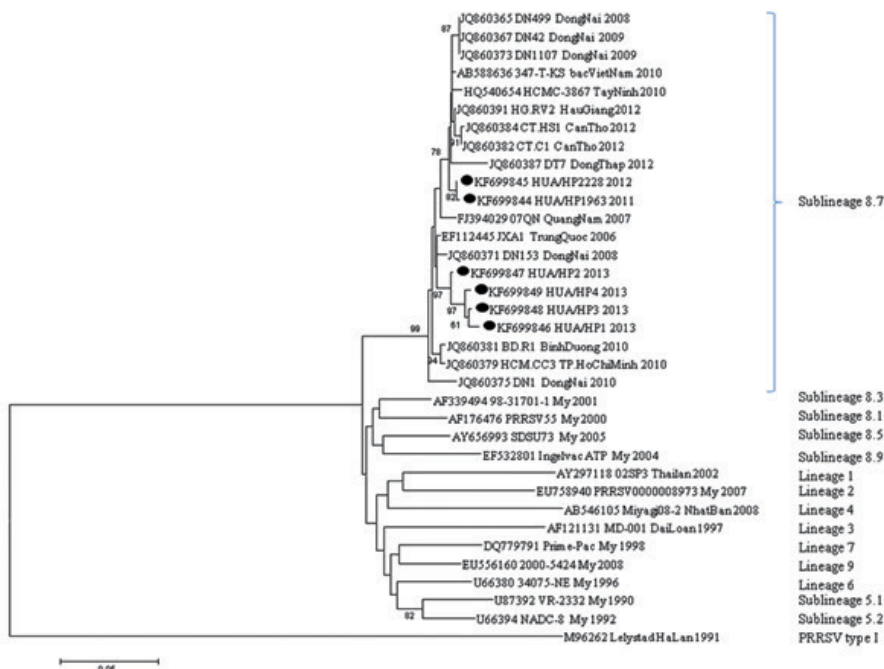


Hình 2. Kết quả chẩn đoán virus PRRS bằng phản ứng RT-PCR

M: DNA Marker, giếng 1 - 6: 6 chủng virus khác nhau là HUA-HP1963, HUA-HP2228, HUA-HP1, HUA-HP2, HUA-HP3, và HUA-HP4.

3.2 Phân tích trình tự gen ORF5 và xây dựng cây phân phả hệ (phylogenetic tree)

Nghiên cứu dịch tễ học phân tử dựa trên việc phân tích cây phả hệ là một vấn đề quan trọng nhằm đánh giá sự biến đổi di truyền của các chủng virus PRRS ngoài thực địa, từ đó đánh giá sự biến chủng của virus theo thời gian (Nguyễn Văn Giáp và cộng sự, 2014). Trong nghiên cứu này, trình tự gen ORF5 của 6 chủng virus PRRS (bảng 1) đã được giải trình tự gen, được phân tích và so sánh với các chủng virus PRRS tham chiếu khác của Việt Nam đã được công bố trước đây (Nguyễn Thị Diệu Thủy và cộng sự, 2013). Kết quả phân tích và so sánh về trình tự gen ORF5 giữa 6 chủng virus PRRS trong nghiên cứu này với nhau (bảng 1) và với các chủng virus PRRS tham chiếu khác trên ngân hàng gen (GenBank) cho thấy cả 6 chủng virus đều thuộc kiểu gen (genotype) loại 2 hay còn gọi là kiểu gen dòng Bắc Mỹ (NA-type), nhánh (sublineage) 8.7 (Nelsen và cộng sự, 1999), kết quả này giống với kết quả đã được công bố trước đây của Nguyễn Thị Diệu Thủy và cộng sự (2013) (Hình 3).



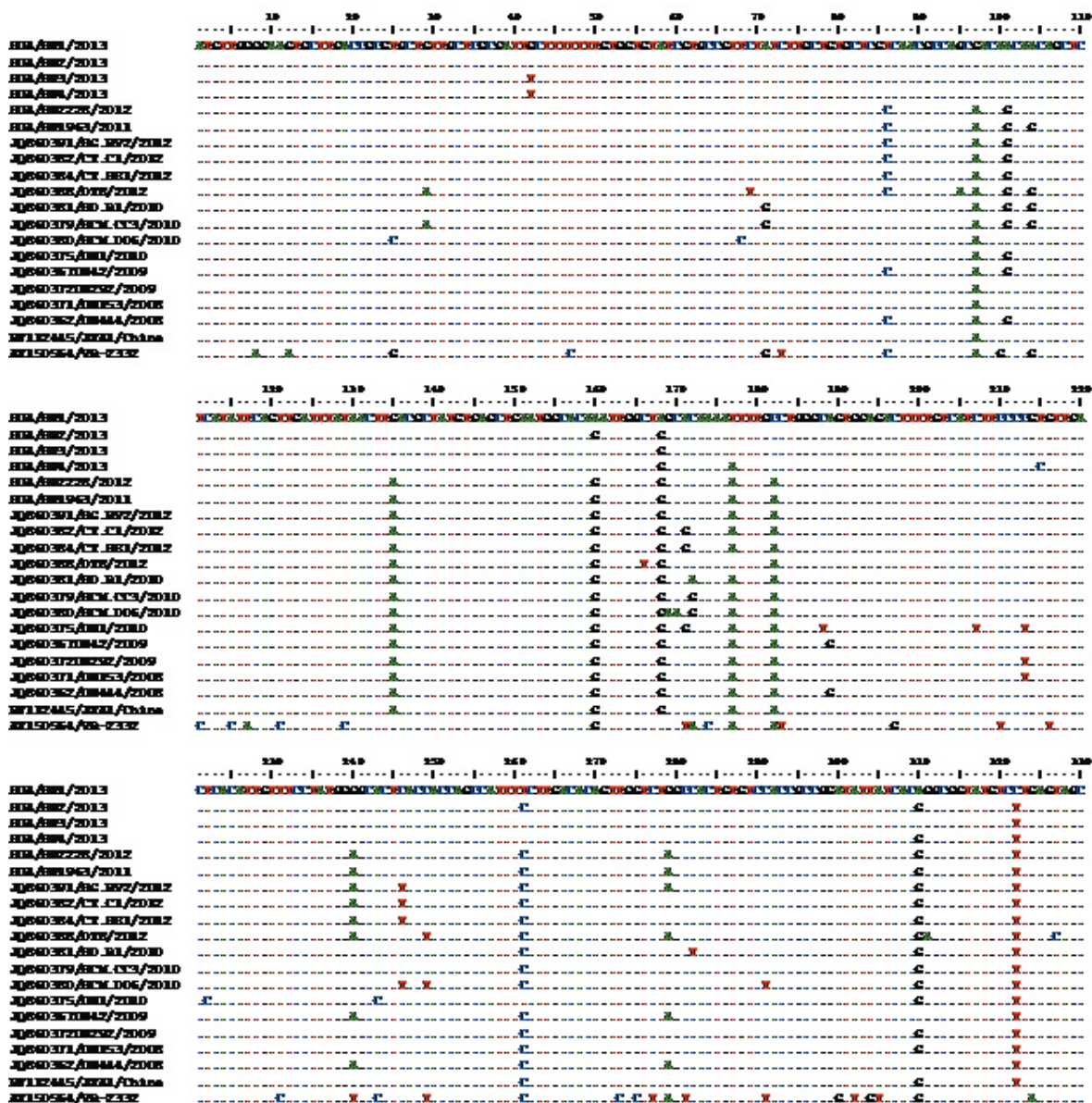
Hình 3. Mối quan hệ di truyền giữa các chủng virus PRRS phân lập được với nhau và với các chủng virus PRRS tham chiếu khác. Những chủng virus PRRS sử dụng trong nghiên cứu này được đánh dấu hình tròn (●).

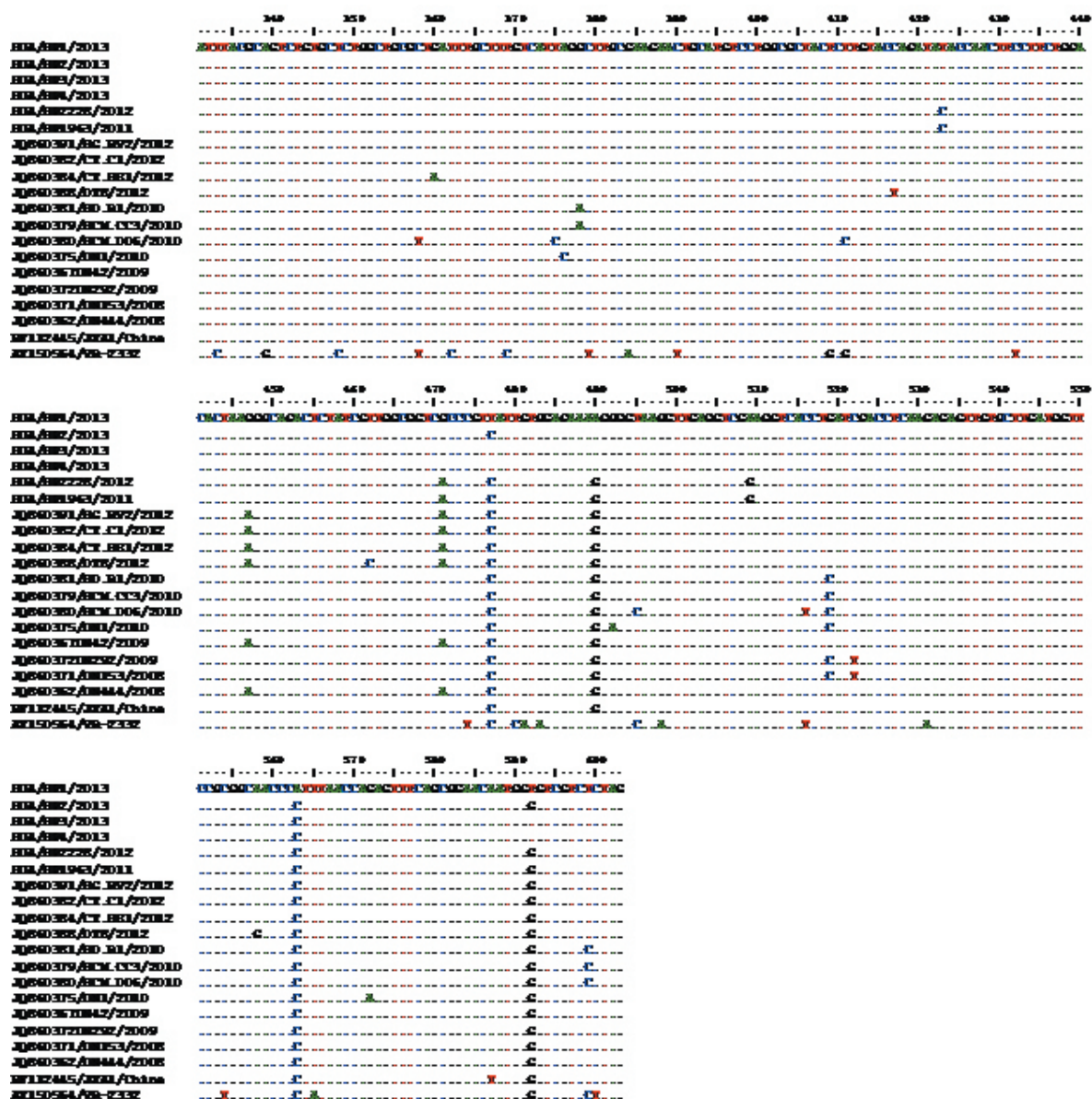
Mức độ tương đồng về nucleotide của cả 6 chủng virus phân lập với nhau nằm trong khoảng 96,5 – 99,8% và so với các chủng phân lập trước đây trong khoảng 95,1 - 99,3% (bảng 2). Khi so sánh với chủng virus vaccin VR2332, mức độ tương đồng về trình tự nucleotide dao động trong khoảng 88,2% - 89,2%. Trong nghiên cứu này, chủng virus vaccin JXA1 cũng được sử dụng nhằm đánh giá mức độ tương đồng di truyền. Kết quả cho thấy, mức độ tương đồng về nucleotide của các chủng phân lập được với chủng JXA1 rất cao, trong khoảng 97,6 – 99% (bảng 2). Đặc biệt trong đó, các chủng phân lập được trong năm 2013 có mối quan hệ gần gũi với nhau và nằm cùng một nhánh với chủng

JXA1 độc lực cao của Trung Quốc. Phân tích kỹ hơn các đột biến trên trình tự cho thấy, các chủng phân lập được trong năm 2013 chia sẻ các sai khác so với các chủng phân lập được trong năm 2011 và 2012 trong nghiên cứu này và các nghiên cứu khác. Cụ thể, các đột biến gen ở các vị trí 86 (C-T), 97 (A-G), 101 (G-A), 135 (A-G), 182 (A-C), 490 (G-A) được quan sát thấy ở cả 4 chủng phân lập được trong năm 2013. Bên cạnh đó, các đột biến gen ở các vị trí 160 (G-A), 177 (A-T), 261 (C-T), 477 (C-T), 592 (G-T) được quan sát thấy ở 3 trong 4 chủng virus phân lập được trong năm 2013 (Bảng 2, Hình 4).

Bảng 2. Tỷ lệ tương đồng (%) về trình tự nucleotide của 6 chủng virus PRRS phân lập được với nhau và với các chủng virus PRRS tham chiếu khác

Stt Chủng virus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 HUA/HP1/2013																				
2 HUA/HP2/2013	0.986																			
3 HUA/HP3/2013	0.993	0.99																		
4 HUA/HP4/2013	0.988	0.988	0.995																	
5 HUA/HP2228/2012	0.966	0.98	0.97	0.971																
6 HUA/HP1963/2011	0.965	0.978	0.968	0.97	0.998															
7 JQ860391/HG.RV2/2012	0.966	0.98	0.97	0.971	0.993	0.991														
8 JQ860382/CT.C1/2012	0.966	0.98	0.97	0.971	0.99	0.988	0.996													
9 JQ860384/CT.HS1/2012	0.965	0.978	0.968	0.97	0.988	0.986	0.995	0.998												
10 JQ860388/DT8/2012	0.951	0.965	0.955	0.953	0.975	0.976	0.978	0.975	0.973											
11 JQ860381/BD.R1/2010	0.965	0.978	0.968	0.97	0.978	0.98	0.978	0.978	0.976	0.963										
12 JQ860379/HCM.CC3/2010	0.965	0.978	0.968	0.97	0.978	0.98	0.978	0.978	0.976	0.966	0.995									
13 JQ860380/HCM.D06/2010	0.953	0.966	0.956	0.958	0.963	0.961	0.966	0.966	0.965	0.948	0.97	0.971								
14 JQ860375/DN1/2010	0.961	0.971	0.965	0.966	0.971	0.97	0.971	0.975	0.973	0.953	0.973	0.973	0.958							
15 JQ860367/DN42/2009	0.968	0.978	0.971	0.97	0.991	0.99	0.995	0.991	0.99	0.976	0.976	0.976	0.961	0.97						
16 JQ860372/DN292/2009	0.973	0.986	0.976	0.978	0.983	0.981	0.983	0.983	0.981	0.965	0.985	0.985	0.973	0.981	0.981					
17 JQ860371/DN153/2008	0.973	0.986	0.976	0.978	0.983	0.981	0.983	0.983	0.981	0.965	0.985	0.985	0.973	0.981	0.981	1				
18 JQ860362/DN444/2008	0.968	0.978	0.971	0.97	0.991	0.99	0.995	0.991	0.99	0.976	0.976	0.976	0.961	0.97	1	0.981	0.981			
19 EF112445/JXA1/China	0.976	0.99	0.98	0.981	0.986	0.985	0.986	0.986	0.985	0.968	0.985	0.985	0.973	0.978	0.985	0.993	0.993	0.985		
20 AY150564/VR-2332	0.885	0.892	0.882	0.883	0.89	0.892	0.89	0.888	0.887	0.878	0.893	0.892	0.893	0.878	0.888	0.888	0.888	0.888	0.888	0.892





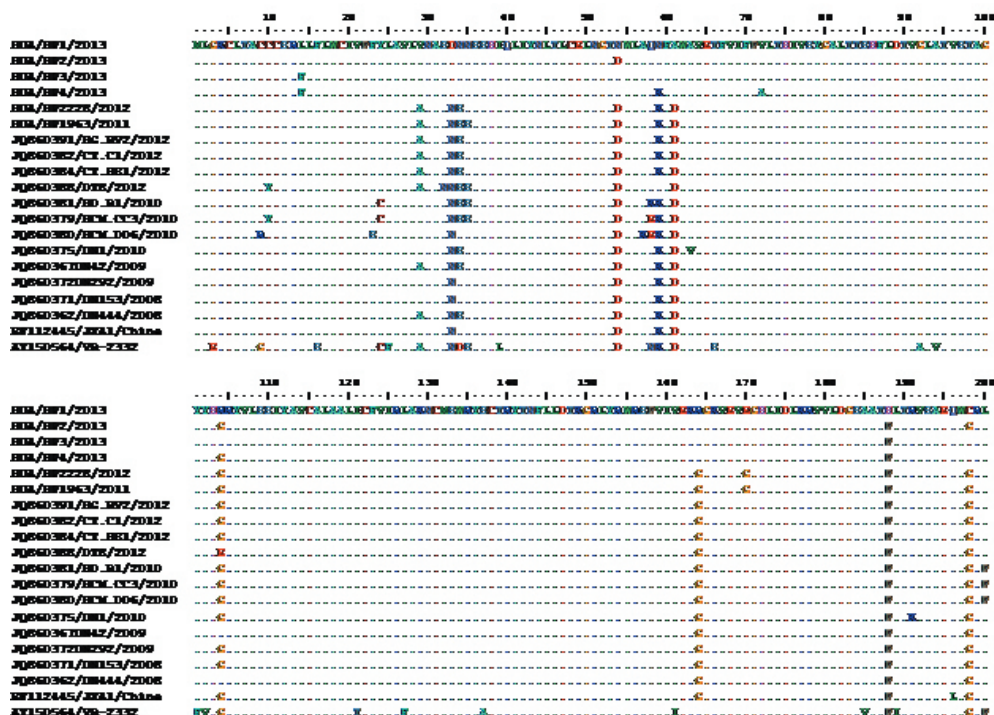
Hình 4. So sánh trình tự nucleotide của gen ORF5 giữa 6 chủng virus PRRS phân lập được với nhau và với các chủng virus PRRS tham chiếu khác

Ngoài việc so sánh trình tự nucleotide, trình tự amino acid suy diễn (deduced amino acid) của gen ORF5 của cả 6 chủng cũng được so

sánh sự tương đồng với nhau và với các chủng tham chiếu khác (Bảng 3, Hình 5).

Bảng 3. Tỷ lệ tương đồng (%) về trình tự amino acid suy diễn (deduced amino acid) của 6 chủng virus PRRS phân lập được với nhau và với các chủng virus PRRS tham chiếu

Stt	Chủng virus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	HUA/HP1/2013																				
2	HUA/HP2/2013	0.98																			
3	HUA/HP3/2013	0.99	0.98																		
4	HUA/HP4/2013	0.975	0.975	0.985																	
5	HUA/HP2228/2012	0.945	0.965	0.945	0.95																
6	HUA/HP1963/2011	0.94	0.96	0.94	0.945	0.995															
7	JQ860391/HG.RV2/2012	0.95	0.97	0.95	0.955	0.995	0.99														
8	JQ860382/CT.C1/2012	0.95	0.97	0.95	0.955	0.995	0.99	1													
9	JQ860384/CT.HS1/2012	0.95	0.97	0.95	0.955	0.995	0.99	1	1												
10	JQ860388/DT8/2012	0.94	0.955	0.94	0.93	0.97	0.975	0.975	0.975	0.975											
11	JQ860381/BD.R1/2010	0.935	0.955	0.935	0.94	0.97	0.975	0.975	0.975	0.975	0.96										
12	JQ860379/HCM.CC3/2010	0.93	0.95	0.93	0.935	0.965	0.97	0.97	0.97	0.97	0.965	0.99									
13	JQ860380/HCM.D06/2010	0.935	0.955	0.935	0.94	0.96	0.955	0.965	0.965	0.965	0.94	0.965	0.965								
14	JQ860375/DN1/2010	0.945	0.965	0.945	0.95	0.98	0.975	0.985	0.985	0.985	0.96	0.97	0.965	0.96							
15	JQ860367/DN42/2009	0.955	0.965	0.955	0.95	0.99	0.985	0.995	0.995	0.995	0.975	0.97	0.965	0.96	0.98						
16	JQ860372/DN292/2009	0.96	0.98	0.96	0.965	0.985	0.98	0.99	0.99	0.99	0.965	0.975	0.97	0.975	0.985	0.985					
17	JQ860371/DN153/2008	0.96	0.98	0.96	0.965	0.985	0.98	0.99	0.99	0.99	0.965	0.975	0.97	0.975	0.985	0.985	1				
18	JQ860362/DN444/2008	0.955	0.965	0.955	0.95	0.99	0.985	0.995	0.995	0.995	0.975	0.97	0.965	0.96	0.98	1	0.985	0.985			
19	EF112445/JXA1/China	0.955	0.975	0.955	0.96	0.98	0.975	0.985	0.985	0.985	0.96	0.97	0.965	0.97	0.98	0.98	0.995	0.995	0.98		
20	AY150564/VR-2332	0.855	0.875	0.855	0.86	0.885	0.89	0.89	0.89	0.89	0.875	0.9	0.895	0.88	0.875	0.885	0.885	0.885	0.885	0.88	



Hình 5. So sánh trình tự amino acid suy diễn của gen ORF5 giữa 6 chủng virus PRRS phân lập được với nhau và với các chủng virus PRRS tham chiếu khác

Mức độ tương đồng về trình tự amino acid suy diễn của gen ORF5 của các chủng virus PRRS trong nghiên cứu này với nhau nằm trong khoảng 94 – 99,5% và so với các chủng virus PRRS tham chiếu khác ở Việt Nam nằm trong khoảng từ 93,0 – 99,0%. Khi so sánh với chủng virus PRRS độc lực cao phân lập từ Trung Quốc, đại diện là chủng virus vacxin JAX1, mức độ tương đồng về trình tự amino acid dao động khoảng từ 95,5 – 98,0% (bảng 3). Phân tích chi tiết về trình tự amino acid cho thấy, 4 chủng phân lập được năm 2013 có cùng một số đột biến ở các vị trí aa 33 (N – D), 61 (D – A); 164 (G – R) so với các chủng khác lưu hành trước đó ở Việt Nam. Ngoài ra, 2 chủng phân lập tại Vĩnh Phúc có cùng đột biến tại vị trí aa 14 (L-F) (Hình 5).

IV. THẢO LUẬN

ORF5 là gen mã hóa cho một glycoprotein xuất hiện phần lớn trên bề mặt virus PRRS. Trình tự protein GP5 được dự đoán có chứa vùng trình tự tín hiệu (từ amino acid 1 – 32), 2 vùng trình tự ectodomain ngắn (từ amino acid 32 – 64 và amino acid 89 – 109) và vùng trình tự endodomain (từ amino acid 110 – 200) (Li và Murtaugh, 2012; Nguyen Van Giap và cộng sự, 2014). Nghiên cứu mức độ tương đồng của gen ORF5 cho thấy, các chủng PRRSV lưu hành ở Việt Nam có mức độ tương đồng cao với các chủng của Trung Quốc (Metwally, 2010). Mức độ tương đồng về trình tự nucleotide của gen ORF5 ở các chủng phân lập được tại Việt Nam so với chủng độc lực cao của Trung Quốc JAX1 nằm trong khoảng 96,5 – 98,6%, và độ tương đồng về trình tự amino acid của protein này nằm trong khoảng 95 – 98% (Nguyen Thi Dieu Thuy và cộng sự, 2013). Nghiên cứu trên trình tự nucleotide của gen này cho thấy, các chủng virus phân lập được trong năm 2013 của nghiên cứu này chia sẻ một số đột biến ở các vị trí 97, 135, 182 và 490, trong đó đột biến ở các vị trí 97, 182 và 490 đã làm thay đổi amino acid mã hóa trên protein GP5 (Hình 4).

Những nghiên cứu về dịch tễ học phân tử dựa trên việc phân tích gen ORF5 của các

chủng PRRSV cho thấy các chủng PRRSV của Việt Nam đều thuộc sublineage 8.7, bao gồm cả các chủng độc lực cao được phân lập tại Trung Quốc trong năm 2006 – 2011 (Nguyen Thi Dieu Thuy và cộng sự, 2013). Kết quả của nghiên cứu này cho thấy cả 6 chủng phân lập được đều thuộc dòng virus PRRS độc lực cao.

GP5 đóng vai trò quan trọng trong việc xâm nhiễm của virus PRRS vào tế bào kí chủ và có chứa một số epitop quan trọng trong việc tạo đáp ứng miễn dịch của lợn (Dea và cộng sự, 2000; Gonin và cộng sự, 1999). Thay đổi ở các vị trí amino acid 32 – 34, 38 – 39, 57 – 59, 137 và 151 ảnh hưởng đến sự miễn dịch của virus đối với kháng thể trung hòa (Kim và cộng sự, 2013). Trong nghiên cứu này, trình tự amino acid mã hóa GP5 ở 2 chủng phân lập được trong 2 năm 2011 và 2012 không có sự thay đổi so với các nghiên cứu khác. Tuy nhiên, trình tự amino acid ở các chủng phân lập được trong năm 2013 có sự thay đổi so với các chủng phân lập được trong những năm trước đó, 4 chủng phân lập được năm 2013 có cùng một số đột biến ở các vị trí 33 (N – D), 61 (D – A), 164 (G – R) so với các chủng khác lưu hành trước đó ở Việt Nam, 3 trong 4 chủng phân lập được trong năm 2013 có đột biến ở các vị trí 59 (K – N) và 198 (G – R). Sự sai khác này có thể ảnh hưởng đến hiệu quả bảo hộ của các loại vacxin đang được sử dụng đối với việc phòng chống bệnh tai xanh. Hơn nữa, 2 chủng phân lập tại Vĩnh Phúc có cùng đột biến tại vị trí 14 (L-F). Kết quả tương tự cũng được quan sát ở các chủng virus phân lập được tại Điện Biên (Nguyen Thi Dieu Thuy và cộng sự, 2013).

Dịch bệnh tai xanh đã và đang gây hậu quả nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi lợn ở Việt Nam. Nghiên cứu của chúng tôi phần nào cung cấp thêm thông tin về các đặc điểm di truyền của các chủng virus đang lưu hành ở Việt Nam. Kết quả thu được từ nghiên cứu này gợi ý rằng rất cần có những nghiên cứu liên tục, sâu hơn và rộng hơn về các chủng virus PRRS đang lưu hành và gây bệnh trên đàn gia súc ở Việt Nam trên phạm vi cả nước.

V. KẾT LUẬN

- Đã phân lập thành công 6 chủng virus PRRS từ mẫu bệnh phẩm thu thập được tại Lào Cai, Hà Nội, Bắc Giang và Vĩnh Phúc trong giai đoạn từ 2011 – 2013. Kết quả phân tích về trình tự nucleotide (nt) và amino acid (aa) của gene ORF5 cho thấy cả 6 chủng virus có mức độ tương đồng với nhau rất cao, tỷ lệ tương đồng về nt là 96,5 – 99,8% và về aa là 94,0 – 99,5%.

- Kết quả phân tích về cây phả hệ cho thấy cả 6 chủng virus đều thuộc dòng (type) Bắc Mỹ, nhánh (sub-lineage) 8.7.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Feng, Y., T. Zhao, T. Nguyen, K. Inui, Y. Ma, T. H. Nguyen, V. C. Nguyen, D. Liu, Q. A. Bui, L. T. To, C. Wang, K. Tian and G. F. Gao. 2008. Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus Variants, Vietnam and China, 2007. *Emerging Infectious Disease*, 14 (11), 1774 – 1776.
2. Han, W., J. J. Wu, X. Y. Deng, Z. Cao, X. L. Yu, C. B. Wang, T. Z. Zhao, N. H. Chen, H. H. Hu, W. Bin, L. L. Hou, L. L. Wang, K. G. Tian, Z. Q. Zhang. 2009. Molecular mutations associated with the in vitro passage of virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Genes*, 38, 276 – 284.
3. Kim, W. I., J. J. Kim, S. H. Cha, W. H. Wu, V. Cooper, R. Evans, E. J. Choi and K. J. Yoon. 2013. Significance of genetic variation of PRRSV ORF5 in virus neutralization and molecular determinants corresponding to cross neutralization among PRRS viruses. *Veterinary Microbiology*, 162, 10 – 22.
4. Li, J. and M. P. Murtaugh. 2012. Dissociation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus neutralization from antibodies specific to major envelope protein surface epitopes. *Virology*, 433, 367-376.
5. Mayo, M.A. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol* 147, 1655-63.
6. Metwally, S., F. Mohamed, K. Faaberg, T. Burrage, M. Prarat, K. Moran, A. Bracht, G. Mayr, M. Berninger, L. Koster, T. L. To, V. L. Nguyen, M. Reising, J. Landgraf, L. Cox, J. Lubroth, C. Carrillo. 2010. Pathogenicity and Molecular Characterization of Emerging Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Vietnam in 2007. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57, 315 – 329.
7. Meulenbergh, J.J., Petersen den Besten, A., de Kluyver, E., van Nieuwstadt, A., Wensvoort, G. and Moormann, R.J. 1997. Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol*, 55, 197-202.
8. Nguyễn Văn Cẩm. 2012. Điều tra sự lưu hành hội chứng sinh sản và hô hấp (PRRS) trên đàn lợn một số tỉnh ở Việt Nam. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, 18(1), 16-24.
9. Nguyen Van Giap, H. K. Kim, H. J. Moon, S. J. Park, H. C. Chung, M. K. Choi, A. R. Kim, B. K. Park. 2014. ORF-5 based evolutionary and epidemiological dynamics of the type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus circulating in Korea. *Infection, Genetic and Evolution*, 21, 320-328.
10. Nguyen Thi Dieu Thuy, Nguyen Thi Thu, Nguyen Giang Son, Le Thi Thu Ha, Vo Khanh Hung, Nguyen Thao Nguyen, Do Vo Anh Khoa. 2013. Genetic analysis of ORF5 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in Vietnam. *Microbiol. Immunol.* 57, 518 – 526.
11. Nguyễn Ngọc Tiến. 2012. Tình hình dịch lợn tai xanh (PRRS) ở Việt Nam và công tác phòng chống dịch. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, 18(1), 8-15.

Nhận ngày 22-1-2015

Phản biện ngày 15-3-2015