

PHÁT HIỆN PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3 VÀ MỘT SỐ MẦM BỆNH KHÁC TRONG CÁC CA BỆNH HÔ HẤP PHỨC HỢP

*Đỗ Tiến Duy¹, Nguyễn Thế Hiển¹,
Đinh Xuân Phát², Nguyễn Văn Nhã¹, Nguyễn Tất Toàn¹*

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm bước đầu thăm dò sự hiện diện của Porcine circovirus type 3 (PCV3), đặc trưng kiểu gen ORF2 và sự đồng nhiễm với một số mầm bệnh khác trong các ca bệnh hô hấp phức hợp (PRDC) trên heo sau cai sữa. Tỷ lệ phát hiện PCV2 trên heo bệnh hô hấp phức hợp là cao nhất (88,3%; 53/60), tiếp đến là vi rút gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp - PRRSV (55,0%; 33/60), *Mycoplasma hyopneumonia* - Mh (51,7%; 31/60), *Haemophilus parasuis* - Hp (44,3%; 27/60), dịch tả heo - CSFV (13,3%; 8/60) và thấp nhất là PCV3 (6,67%; 4/60). Các nhóm mầm bệnh nhiễm ghép cao với nhau trong các ca hô hấp phức hợp là PCV2 + PRRSV (48,3%), PCV2 + Mh (50,0%), PCV2 + Hp (38,3%) và PCV2 + Mh + Hp (23,3%). Với PCV3, cả 4/4 trường hợp phát hiện đều nhiễm ghép với PCV2, PRRSV, Mh hoặc Hp; trong đó 4/4 nhiễm ghép với PCV2, 2/4 nhiễm ghép với PRRSV và Mh, 1/4 nhiễm ghép với Hp và 0/4 nhiễm ghép với CSFV. Mức tương đồng của trình tự nucleotide giữa 4 chủng PCV3 là 98,2 đến 97,2 %, trong đó 2 chủng PCV3_AV và PCV3_BL nằm tách biệt với các chủng PCV3 còn lại và các chủng tham khảo trên cây sinh dòng. Kết quả nghiên cứu cho thấy có sự hiện diện PCV3 ở các ca bệnh PRDC và chúng bắt đầu có sự đa dạng lớn về kiểu gen, nên nghiên cứu tiếp theo nhằm xác định vai trò gây bệnh giữa các chủng khác kiểu gen là rất cần thiết.

Từ khóa: PCV3, đồng nhiễm, PRDC và heo cai sữa.

Detection of Porcine circovirus type 3 and some other pathogens in respiratory disease complex

*Do Tien Duy, Nguyen The Hien,
Dinh Xuan Phat, Nguyen Van Nha, Nguyen Tat Toan*

SUMMARY

The aim of this study was to identify initially the presence of PCV3, characterize ORF2 characteristics and co-infection with other pathogens in porcine respiratory disease complex (PRDC) in the post-weaning piglets. The PCV2 detection rate in the PRDC pigs was highest (88.3%; 53/60), followed by PRRSV (55.0%; 33/60), Mh (51.7%; 31/60), Hp (44.3%; 27/60), CSFV (13.3%; 8/60) and the lowest rate was PCV3 (6.67%; 4/60). The co-infection groups of PRDC cases were PCV2 + PRRSV (48.3%), PCV2 + Mh (50.0%), PCV2 + Hp (38.3%) and PCV2 + Mh + Hp (23.3%). In term of PCV3, all 4/4 cases were co-infected with PCV2, PRRSV, Mh or Hp; of which 4/4 co-infected with PCV2, 2/4 co-infected with PRRSV and Mh and 1/4 co-infected with Hp and 0/4 co-infected with CSFV. The low nucleotide sequence similarity level among 4 isolates of PCV3 (98.2 to 97.2%) was determined, of which two isolates PCV3_AV and PCV3_BL were separately grouped from the remaining PCV3 isolates and reference strains in phylogenetic tree. The studied results showed that there was the presence of PCV3 in the PRDC cases and they began presenting a high diversity on genotype, therefore further research to identify the role of pathogenicity among the strains with different genotype will be very necessary.

Keywords: PCV3, co-infection, PRDC and weaned pigs.

¹ Khoa Chăn nuôi - Thú y, Đại học Nông Lâm Tp. HCM

² Bộ môn Công nghệ sinh học, Đại học Nông Lâm Tp. HCM

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

PCV3 thuộc họ Circoviridae, là virus không có vỏ bọc và mang bộ gen dạng vòng mạch đơn (Biagini và ctv., 2012). Bộ gen Circovirus chứa hai khung đọc mở chính (Open reading frames – ORFs) bao gồm ORF1 và ORF2 (Palinski và ctv., 2017). Hai loài Circovirus lưu hành ở heo đã được biết đến, trong đó PCV1 không gây biểu hiện lâm sàng (Cheung, 2003), nhưng PCV2 là một mầm bệnh quan trọng và phổ biến, liên quan đến nhiều hội chứng lâm sàng trên heo và gây thiệt hại về kinh tế (Clark, 1996). Các nghiên cứu di truyền cho thấy, sự tương đồng gen giữa PCV3 với PCV1 và PCV2 là khá thấp (khoảng 70%). Mặc dù mới được phát hiện, nhưng PCV3 đã được báo cáo về sự đa dạng, gồm hai nhóm PCV3a và PCV3b (Fux và ctv., 2018).

Năm 2015, PCV3 được phát hiện ở heo nái mắc hội chứng viêm da thận (PDNS), rối loạn sinh sản (RLSS), ở trại có biểu hiện tăng tỷ lệ chết và giảm tỷ lệ đậu thai thuộc bang North Carolina, Mỹ (Palinski và ctv., 2017). Sau đó, một loạt các quốc gia khác đã có báo cáo về sự hiện diện của virus mới này ở đàn heo trong nước như Brazil (Tochetto và ctv., 2017), Anh (Collins và ctv., 2017), Đan Mạch (Franzo và ctv., 2018), Ireland (Collins và ctv., 2017), Tây Ban Nha (Klaumann và ctv., 2018; Franzo và ctv., 2018), Thụy Điển (Ye và ctv., 2018), Ý (Faccini và ctv., 2017), Ba Lan (Stadejek và ctv., 2017), Trung Quốc (Chen và ctv., 2017; Fan và ctv., 2017; Zheng và ctv., 2017), Hàn Quốc (Kwon và ctv., 2017), Thái Lan (Kedkovid và ctv., 2018) và Việt Nam (Phạm Hồng Quân và ctv., 2017). PCV3 được phát hiện trên heo mắc bệnh có triệu chứng lâm sàng khác nhau như rối loạn hô hấp, sinh sản, tiêu hóa và thần kinh với tỷ lệ biến động từ 4,44% đến 59,46%; tuy nhiên, PCV3 cũng được phát hiện ở những cá thể khỏe mạnh ở tỷ lệ thấp hơn heo bệnh.

Phức hợp hô hấp trên heo (PRDC) là một hội chứng bệnh phổ biến nhất trên heo nuôi thịt hiện nay (Nguyễn Ngọc Hải và Đỗ Tiến Duy, 2019), gây tác hại nặng đến hệ thống hô hấp, không chỉ

trên heo ở nước ta mà cả thế giới. Biểu hiện bệnh khá đa dạng liên quan rối loạn hô hấp và rối loạn trên tất cả hệ thống cơ quan tùy thuộc vào mức độ bệnh, sự có mặt của các mầm bệnh khác nhau và sự tương tác giữa chúng trong các trường hợp bệnh cụ thể (Nguyễn Ngọc Hải và Đỗ Tiến Duy, 2019). PCV2 hiện diện thường xuyên trong các ca bệnh PRDC và sự đồng nhiễm giữa PCV2 và PCV3 khá cao, từ 12,5% (Kedkovid và ctv., 2018) tới 70% (Zhao và ctv., 2018) qua các báo cáo. Sự hiện diện của PCV3 trên heo ở miền Bắc Việt Nam đầu tiên đã được ghi nhận (Phạm Hồng Quân và ctv., 2017), tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào về sự hiện diện PCV3 ở miền Nam. Hiện nay, chưa có nhiều nghiên cứu thực địa và thực nghiệm về bệnh học được thực hiện để làm sáng tỏ vai trò của PCV3 trong các ca bệnh lâm sàng, do vậy, nghiên cứu này nhằm bước đầu thăm dò sự hiện diện của PCV3, đặc trưng kiểu gen và sự đồng nhiễm với các mầm bệnh khác trong các ca bệnh hô hấp phức hợp trên heo sau cai sữa, được thu thập từ nhiều trại heo thuộc phía Nam nước ta.

II. PHƯƠNG PHÁP VÀ VẬT LIỆU

2.1. Bố trí nghiên cứu

Heo con cai sữa 5 đến 12 tuần tuổi, có biểu hiện bệnh trên đường hô hấp được mổ khám xác định tình trạng bệnh PRDC. Mẫu bệnh phẩm gồm phổi, hạch phổi, lách và thận được thu thập và chia làm hai phần, một phần được bảo quản -20°C và một phần được nghiền nhỏ trong đệm PBS1x thành huyền dịch 20% để chuẩn bị cho việc phân tích mẫu (chiết tách DNA và RNA).

Tách chiết DNA/RNA

Ly tâm lấy dịch nổi để tách chiết DNA/RNA theo quy trình kỹ thuật của bộ kit thương mại GenJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Lithuania) và SV Total RNA Isolation System (Promega, Mỹ).

2.2. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Thăm dò sự hiện diện của PCV3 và sự đồng nhiễm với một số mầm bệnh khác.

DNA tách chiết được xét nghiệm PCV3 bằng kỹ thuật PCR đã được hiệu chỉnh và tối ưu hóa từ một công bố của nghiên cứu trước. Ngoài ra, DNA và RNA tách chiết cũng được xét nghiệm sự hiện diện của các mầm bệnh khác như PRRSV, dịch tả heo (CSFV), PCV2, *Mycoplasma hyopneumonia* (Mh), và *Haemophilus parasuis* (Hp) theo phương pháp PCR/RT-PCR thường quy (BVITY, Trường ĐHNH Tp. HCM).

Nội dung 2: Đặc trưng kiểu gen ORF2 của PCV3. Mẫu dương tính PCV3 tiếp tục dùng để khuếch đại gen ORF2 hoàn chỉnh, giải trình tự và phân tích đặc trưng gen.

2.3. Primers và quy trình PCR cho PCV3

Bảng 1. Thông tin trình tự primer và kích thước sản phẩm

Primer	Trình tự	Sản phẩm
ORF1/PCV3-R	5'-ATACTGCAGGCATCTTCTCCG-3'	336bp
ORF1/PCV3-F	5'-TATTGTGGAGTGTGGAGGCAGT-3'	
ORF2/PCV3-R	5'-CATCCATAATGGGATACCAC-3'	737bp
ORF2/PCV3-F	5'-CACTTAGAGAACGGACTTGTAACG-3'	

Quy trình PCR

100µl dịch tách chiết DNA được bảo quản -20°C sử dụng cho phản ứng PCR. Phản ứng PCR sau khi tối ưu gồm 12 µl Green Master mix 2X (Thermo Scientific, Mỹ), 10µM mỗi (ORF1/PCV3) hoặc 20µM mỗi (ORF2/PCV3), 0,5µl MgCl₂, 3µl DNA tách chiết và nước vừa đủ để đạt tổng phản ứng là 25µl. Quy trình luân nhiệt gồm 3 giai đoạn: giai đoạn 1 (1 chu kỳ), tiền biến tính trong 2 phút ở 94°C; giai đoạn 2 (35 chu kỳ), biến tính trong 20 giây ở 94°C, bắt cặp ở 54°C (mỗi ORF1/PCV3) hoặc 55°C (mỗi ORF2/PCV3), và kéo dài trong 30 giây ở 72°C; và giai đoạn 3 (1 chu kỳ), kéo dài cuối cùng trong 5 phút ở 72°C.

Ngoài ra, các quy trình PCR/RT-PCR thường quy của Bệnh viện Thú y (Trường ĐHNH Tp. HCM) được sử dụng để xét nghiệm mầm bệnh khác gồm virus gây hội chứng rối loạn sinh sản

Môi sử dụng

Hai cặp môi (primer) được tham khảo từ hai báo cáo trước đây (bảng 1; Ku và ctv., 2011; Kedkovid và ctv., 2018), được kiểm tra độ đặc hiệu, đặc tính hữu hiệu bằng công cụ OligoAnalyzer® của công ty Integrated DNA Technologies (Mỹ) và phần mềm BLAST trên NCBI. Ngoài ra, quy trình PCR được hiệu chỉnh nồng độ môi, nhiệt độ bắt cặp phù hợp và sản phẩm PCR được giải trình tự (Macrogen, Hàn Quốc) nhằm đảm bảo kết quả xét nghiệm chính xác (Nguyễn Thế Hiển và ctv., 2019; kết quả không trình bày). Đoạn môi ORF1/PCV3 để xét nghiệm sự hiện diện của PCV3 và sau đó môi ORF2/PCV3 dùng để giải trình tự đoạn gen hoàn chỉnh của nó.

và hô hấp (PRRSV), Porcine circovirus type 2 (PCV2), virus dịch tả heo (CSFV), *Mycoplasma hyopneumonia* (Mh), *Haemophilus parasuis* (Hp).

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose (1,5%, TBE 0,5x, 100V; máy VWRC®), hòa tan 3µl/25ml Ethidium bromide (Invitrogen brand, Mỹ), và kết quả điện di được đọc trên máy chiếu tia UV trực tiếp (máy Vilber Lourmat, Pháp) cùng với thang chuẩn 100bp (ladder 100bp; Promega, Mỹ) và đối chứng dương và âm tương ứng của các mầm bệnh xét nghiệm.

2.4. Phân tích trình tự gen ORF2-PCV3

Sản phẩm PCR đặc trưng của các chủng PCV3 được làm tinh sạch (DNA Purify Kit, Qiagen, USA) và được gửi đến phòng thí nghiệm giải trình tự có uy tín (Macrogen, Hàn Quốc) theo hướng dẫn kit thương mại BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing;

cả hai chuỗi xuôi và ngược đều được giải trình tự để so sánh và phân tích. Kết quả giải trình tự được phân tích sự tương đồng, mối liên hệ phân tử (cây sinh dòng) giữa các chủng phân lập được với nhau và với các chủng tham

khảo (dữ liệu GenBank NCBI; bảng 2) từ các nước trên thế giới. Các phần mềm sử dụng để thực hiện sánh dòng, phân tích sự tương đồng và xây dựng cây sinh dòng như ClustalW2 và Mega 6; với giá trị bootstrap 1000.

Bảng 2. Danh sách chủng PCV3 giải trình tự và tham khảo

STT	Chủng PCV3	Nơi phân lập	Nguồn
1	PCV3_BL	Bến Tre	Nghiên cứu này
2	PCV3_AC	Đồng Nai	Nghiên cứu này
3	PCV3_AV	Quảng Ngãi	Nghiên cứu này
4	PCV3_PS3	Đồng Nai	Nghiên cứu này
5	MF079253_BR/RS/6	Brazil	NCBI
	MF079254_BR/RS/8	Brazil	
6	KT869077_29160	Mỹ	NCBI
7	KX898030_US/MN2016	Mỹ	NCBI
8	KX966193_US/SD2016	Mỹ	NCBI
9	MF162298_IT/CO2017	Mỹ	NCBI
10	MF162298_IT/CO2017	Mỹ	NCBI
11	KY075987_CN/Fujian	Trung Quốc	NCBI
12	KY778777_CN/Shandong	Trung Quốc	NCBI
13	KY865242_CHN/Shanghai	Trung Quốc	NCBI
14	KY865243_CHN/Shanghai	Trung Quốc	NCBI
15	MF084994_CN/Anhui	Trung Quốc	NCBI
16	MF589104_CN/Guangdong	Trung Quốc	NCBI
17	MG310152_Thailand/PB01	Thái Lan	NCBI
18	KY996339_KU-1603	Hàn Quốc	NCBI
19	KY996342_KU-1606	Hàn Quốc	NCBI
20	MF611877_PCK3-1702	Hàn Quốc	NCBI
21	MF611878_PCK3-1703	Hàn Quốc	NCBI

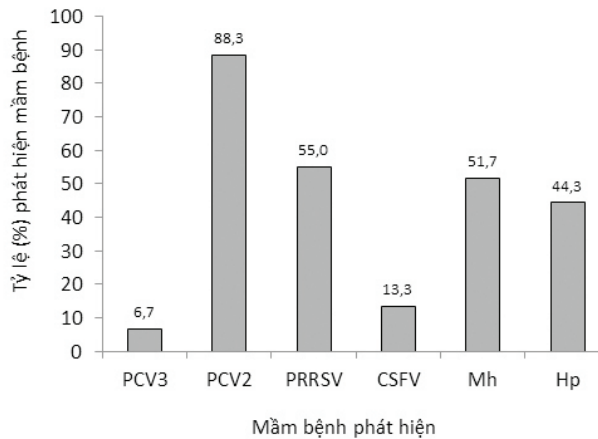
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự hiện diện của PCV3 và các mầm bệnh khác

Tỷ lệ phát hiện PCV2 là cao nhất (88,3%; 53/60) trên heo hô hấp phức hợp, tiếp đến là PRRSV (55,0%; 33/60), Mh (51,7%; 31/60), Hp (44,3%; 27/60), CSFV (13,3%; 8/60) và thấp nhất là PCV3 (6,67%; 4/60). PRRSV được xét nghiệm định chủng với tỷ lệ phát hiện chủ yếu là kiểu genotype 2 (55,2% NA và 28,8% HP), trong khi không phát hiện kiểu genotype

1 (EU) trong khảo sát này (hình 1). Sản phẩm PCR dương tính PCV3 (hình 2).

Bốn mầm bệnh thường xuyên có mặt trong các ca bệnh hô hấp phức hợp là PCV2, PRRSV, Mh và Hp. Ở khảo sát này, PCV2 có tỷ lệ phát hiện cao nhất, trong khi nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy PRRSV có tỷ lệ cao hơn (Brockmeier và ctv., 2002; Đỗ Tiến Duy và ctv., 2013). Đặc biệt, PCV3 và CSFV cũng được xác định trong các ca hô hấp phức hợp khảo sát. PCV3 là mầm bệnh được ghi nhận ở nhiều ca

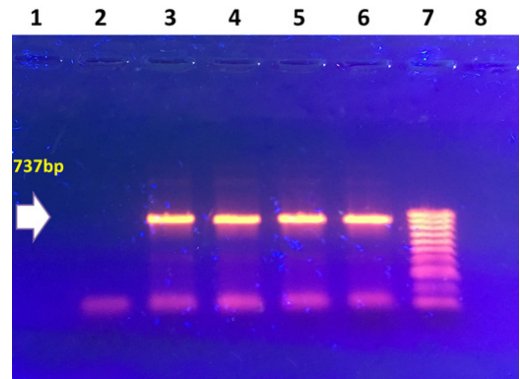


Hình 1. Tỷ lệ hiện diện của PCV3 và các mầm bệnh khác

bệnh khác nhau của các nước, nhưng chỉ số ít công trình báo cáo sự xuất hiện của PCV3 ở Việt Nam (Phạm Hồng Quân và ctv., 2017). PCV3 có thể hiện diện trong các ca bệnh PRDC, và thường nhiễm ghép PCV2 từ 12,5% (Kedkovid và ctv., 2018) tới 70,0% (Zhao và ctv., 2018). Tuy nhiên, vai trò gây bệnh thực sự của PCV3 trong PRDC hay các hội chứng lâm sàng khác (tiêu chảy, sảy thai, viêm da) thì vẫn cần nhiều nghiên cứu về sinh bệnh học chứng minh. Ở khảo sát này, tỷ lệ các tổ hợp nhiễm ghép PCV3 với các mầm bệnh khác (PRRSV, PCV2, CSFV, Mh và Hp) được đánh giá (bảng 3), cũng bước đầu cho thấy bức tranh về đồng nhiễm trong các ca PRDC trên heo.

Các nhóm mầm bệnh nhiễm ghép với nhau cao trong các ca PRDC là PCV2 + PRRSV (49,2%), PCV2 + Mh (50,0%), PCV2 + Hp (37,7%) và PCV2 + Mh + Hp (25%). Với PCV3, cả 4/4 trường hợp phát hiện đều nhiễm ghép với một mầm bệnh khác như PCV2, PRRSV, Mh hoặc Hp; trong đó 4/4 nhiễm ghép với PCV2, 2/4 nhiễm ghép với PRRSV và Mh và 1/4 nhiễm ghép với Hp và 0/4 nhiễm ghép với CSFV (bảng 3).

Tương tự, nghiên cứu này cũng ghi nhận tình trạng nhiễm ghép cao của PCV3 đối với các tác nhân gây PRDC khác nhau, cao nhất có thể kể



Hình 2. Hình sản phẩm PCR dương tính PCV3 với cặp mồi ORF2/PCV3-F và ORF2/PCV3-R

Giếng 2: đối chứng âm; giếng 3, 4, 5: các mẫu xét nghiệm; giếng 6: đối chứng dương; giếng 7: thang chuẩn 100bp

đến PCV3+PRRSV (50%), PCV3+Mh (50%), đặc biệt là ghép với PCV2 trong 100% trường hợp. Tỷ lệ nhiễm ghép tham khảo trên vùng Đông Bắc của Trung Quốc (Hắc Long Giang, Cát Lâm, Liêu Ninh) giữa PCV3+PRRSV là 11,4% (4/35 trường hợp), PCV3+PCV2 là 45,7% (16/35 trường hợp) (Ha và ctv., 2018). Xét về tỷ lệ đồng nhiễm, tỷ lệ nhiễm ghép tại Việt Nam có xu hướng phổ biến hơn tại Trung Quốc dựa trên các số liệu này. Tuy vậy, xu hướng nhiễm ghép giữa PCV2+PCV3 là cao hơn so với PCV3+PRRSV được ghi nhận ở cả hai nước.

Bên cạnh đó, khi xem xét chung hai tác nhân PCV2 và PCV3 đồng thời trong các ca nhiễm với những tác nhân khác, chúng tôi ghi nhận Mh (50%) và PRRSV (50%) là hai tác nhân đồng nhiễm cao nhất với PCV2 và PCV3. So sánh với Thái Lan, một quốc gia chăn nuôi heo khác trong khu vực Đông Nam Á, tỷ lệ đồng nhiễm PCV3+PCV2+PRRSV được ghi nhận ở mức 30,76% (4/13) (Sukmak và ctv., 2018), là thấp hơn so với tỷ lệ 50% trong nghiên cứu này. Sự xuất hiện đồng thời của 4 tác nhân trong số PCV2, PCV3, PRRSV, Mh, Hp có thể lên đến 25% các ca bệnh được khảo sát (bảng 3). Kết quả này cho thấy một thực tế phức tạp của bệnh hô hấp phức hợp trong các trang trại heo hiện

Bảng 3. Tỷ lệ nhiễm ghép các mầm bệnh

Tổ hợp nhiễm	Kết quả phát hiện	
	Tần số	Tỷ lệ (%)
PCV2	53/60	88,3
PCV2 + PRRSV	29/60	48,3
PCV2 + CSFV	6/60	10,0
PCV2 + Mh	30/60	50,0
PCV2 + Hp	23/60	38,3
PCV2 + PRRSV + CSFV	3/60	5,00
PCV2 + PRRSV + CSFV + Mh	1/60	1,67
PCV2 + PRRSV + CSFV + Mh + Hp	1/60	1,67
PCV2 + CSFV + Mh	3/60	5,00
PCV2 + CSFV + Mh + Hp	3/60	5,00
PCV2 + Mh + Hp	14/60	23,3
PCV3	4/60	6,67
PCV3 + PRRSV	2/4	50,0
PCV3 + Mh	2/4	50,0
PCV3 + Hp	1/4	25,0
PCV3 + PRRSV + Mh	1/4	25,0
PCV3 + Mh + Hp	1/4	25,0
PCV2 + PCV3	4/4	100
PCV2 + PCV3 + PRRSV	2/4	50,0
PCV2 + PCV3 + PRRSV + Mh	1/4	25,0
PCV2 + PCV3 + Mh	2/4	50,0
PCV2 + PCV3 + Hp	1/4	25,0
PCV2 + PCV3 + Mh + Hp	1/4	25,0

nay. Sự bội nhiễm nhiều tác nhân gây bệnh có khả năng gây suy kiệt hệ miễn dịch được ghi nhận trong nghiên cứu này góp phần giải thích tại sao chương trình tiêm phòng, liệu pháp kháng sinh trong quá trình phòng trị trên trang trại hiện nay rất khó đạt hiệu quả cao.

3.2. Phân tích di truyền các chủng PCV3

Đặc trưng và sự tương đồng kiểu gen của PCV3

Bốn chủng PCV3 thực địa được đặt tên là PCV3_AC, PCV3_AV, PCV3_BL, PCV3_PS3), được giải trình tự toàn đoạn ORF2. Đa dạng nucleotide được ghi nhận giữa các chủng

thực địa này với nhau và so với các chủng tham khảo. Sự sai khác về nucleotide giữa các chủng PCV3 xảy ra rải rác từ đoạn đầu cho đến đoạn cuối chuỗi nucleotides của ORF2.

Trình tự nucleotide giữa 4 chủng với nhau tương đồng từ 98,2 đến 97,2 % (bảng 4). So với các chủng tham khảo, chủng PCV3_AC có độ tương đồng cao nhất (98,5%) với chủng Hàn Quốc (Korea/MF611878_PCK3-1703); PCV3_AV có độ tương đồng cao nhất (98,5 %) với chủng Brazil và Trung Quốc (Brazil/MF079253_BR/RS/6 và China/KY778777_CN/Shandong); PCV3_BL có độ tương đồng cao nhất (97,9 %) với chủng Mỹ và Brazil (USA/MF162298_IT/

Bảng 4. Sự khác biệt (%) trình tự nucleotide giữa các chủng PCV3

Chủng so sánh	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1 Brazil/MF079253_BR/RS/6																						
2 USA/KT869077_29160	0,74																					
3 USA/KX898030_US/MN2016	1,50	1,88																				
4 USA/KX966193_US/SD2016	1,50	1,88	1,49																			
5 USA/MF162298_IT/CO2017	1,30	1,69	1,31	0,18																		
6 Brazil1/MF079254_BR/RS/8	1,30	1,69	1,31	0,18	0,00																	
7 China/KY075987_CN/Fujian	0,37	0,74	1,50	1,50	1,31	1,31																
8 China/KY778777_CN/Shandong	0,74	1,11	1,11	1,50	1,31	1,31	0,74															
9 China/KY865242_CHN_Shanghai	1,68	2,07	1,68	1,68	1,50	1,50	1,68	1,31														
10 China/KY865243_CHN_Shanghai	2,07	2,45	2,25	1,11	0,93	0,93	2,07	2,07	2,44													
11 China/MF084994_CN/Anhui	0,74	1,11	1,88	1,87	1,69	1,69	0,74	1,11	2,07	2,45												
12 China/MF589104_CN/Guangdong	1,50	1,88	1,50	0,56	0,37	0,37	1,50	1,50	1,68	1,31	1,88											
13 Thailand/MG310152_Thailand/PB01	1,68	2,07	1,31	1,30	1,11	1,11	1,69	0,93	0,74	2,06	2,07	1,31										
14 Korea/KY996339_KU-1603	1,68	2,07	1,68	0,56	0,37	0,37	1,69	1,68	1,87	1,30	2,06	0,74	1,49									
15 Korea/KY996342_KU-1606	1,68	2,07	1,68	0,74	0,56	0,56	1,69	1,68	1,87	1,50	2,07	0,56	1,50	0,93								
16 Korea/MF611877_PCK3-1702	0,56	0,93	1,69	1,69	1,50	1,50	0,56	0,93	1,88	2,26	0,93	1,69	1,88	1,88	1,88							
17 Korea/MF611878_PCK3-1703	1,31	1,69	0,93	1,30	1,11	1,11	1,31	0,56	1,11	2,06	1,69	1,31	0,74	1,50	1,50	1,50						
18 Thailand/MG310152_PB01/17	0,93	0,93	1,69	1,69	1,50	1,50	0,93	0,93	1,88	2,26	1,31	1,69	1,88	1,87	1,88	1,12	1,50					
19 PCV3_AC/ORF2	2,46	2,85	2,07	2,07	1,88	1,88	2,46	1,69	2,07	2,84	2,84	2,07	1,69	2,26	2,26	2,65	1,50	2,65				
20 PCV3_AV/ORF2	1,50	2,26	1,87	2,25	2,06	2,06	1,87	1,50	2,44	2,83	2,26	2,26	2,06	2,44	2,44	2,07	1,68	2,07	2,84			
21 PCV3_BL/ORF2	3,03	3,43	2,64	2,25	2,07	2,07	3,03	2,64	3,21	2,63	3,42	2,26	2,44	2,44	2,45	3,23	2,45	3,23	2,84	1,88		
22 PCV3_PS3/ORF2	1,31	1,69	1,31	1,31	1,11	1,12	1,31	1,31	1,50	2,07	1,69	1,31	1,50	1,50	1,50	1,12	1,50	1,88	2,07	2,45		

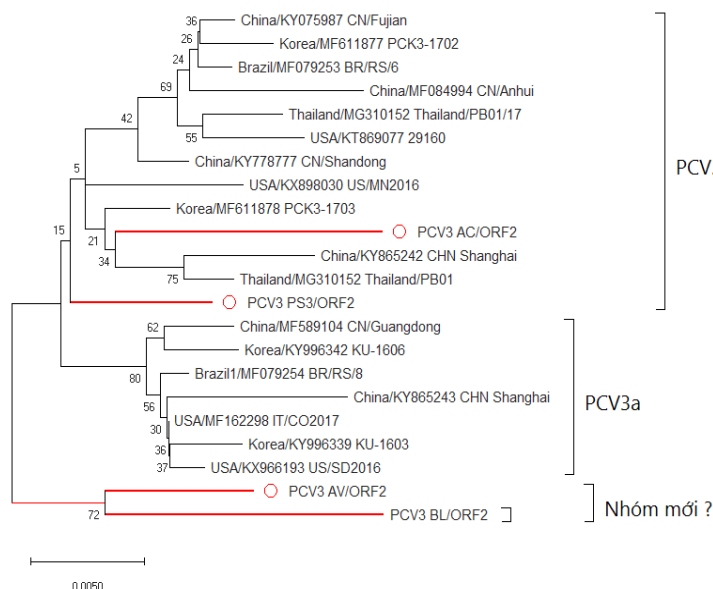
CO2017 và Brazil 1/MF079254_BR/RS/8); và PCV3_PS3 có độ tương đồng cao nhất (98,9 %) với chủng Mỹ (USA/MF162298_IT/CO2017). Điều này cho thấy những biến chủng PCV3 tại Việt Nam có độ tương đồng cao so với các chủng PCV3 được phân lập tại nhiều quốc gia có vùng địa lý khác nhau trên thế giới.

PVC3 được ghi nhận đầu tiên ở Mỹ năm 2015 (Palinski và ctv., 2017). Tiếp theo, một loạt các quốc gia khác trên thế giới đã có báo cáo sự hiện diện của virus mới này ở đàn heo vào các năm 2016, 2017 và 2018, trong đó có Việt Nam (Phạm Hồng Quân và ctv., 2017). Các chủng PCV3 của Việt Nam có sự tương đồng cao với các chủng ở Mỹ, Brazil, Hàn Quốc, Trung Quốc..., sự liên đới giữa các chủng tại Việt Nam với các chủng ở các quốc gia nêu trên là một câu hỏi thực tế cần được giải đáp trong thời gian tới. Tuy nhiên, 2 chủng thu thập thực địa PCV3_BL/ORF2 và PCV3_AV/ORF2 có sự khác biệt cao so với các chủng còn lại và với cả chủng tham khảo là một sự thú vị cần được nghiên cứu sâu hơn. Việc giải trình tự toàn bộ gen, gây nhiễm thực nghiệm để đánh giá đặc

điểm sinh học của 2 chủng PCV3 là một hứa hẹn mới về thông tin khoa học.

Mối liên hệ phân tử giữa chủng PCV3 thu thập với chủng tham khảo

Trên cây sinh dòng, 4 chủng PCV3 trong nghiên cứu này được phân vào hai nhóm. Trong đó, PCV3_AV và PCV3_BL thuộc phân nhóm tách biệt với các chủng còn lại; và hai chủng còn lại PCV3_PS3 và PCV3_AC thuộc phân nhóm nằm cùng với chủng tham khảo khác. Hai trong bốn (2/4) chủng thực địa của khảo sát này có quan hệ gần về mặt phân tử (ORF2) với các chủng của Trung Quốc, Hàn Quốc và Thái Lan (KY865242_CHN/Shanghai, MF611878_PCK3-1703 và MG310152_Thailand/PB01), nhưng chúng cũng tiếp tục được phân vào các nhánh nhỏ trong cùng nhóm. Khoảng cách biến dị cao của các chủng PCV3 thu thập thực địa ở nghiên cứu này đã được thấy rõ mặc dù số chủng phân tích chỉ là bốn. Đặc biệt, hai chủng PCV3_AV và PCV3_BL nằm tách biệt với tất cả các chủng PCV3 tham khảo còn lại, đặt ra nghi vấn PCV3 ở Việt Nam hình thành phân nhánh mới khác hoàn toàn với các chủng ở các nước (hình 3).



Hình 3. Cây sinh dòng dựa trên ORF2 của PCV3 đối với một số chủng tham khảo trên thế giới, xây dựng trên phần mềm Mega 6.0 với chỉ số bootstrap 1000

IV. KẾT LUẬN

PCV3 được phát hiện trong các ca bệnh PRDC trong nghiên cứu này với tỷ lệ thấp 6,67% (4/60), thường ở dạng nhiễm ghép với PCV2, PRRSV, Mh và Hp. Sự tương đồng trình tự nucleotide khá thấp giữa 4 chủng PCV3 (98,2 đến 97,2 %), trong đó 2 chủng PCV3_AV và PCV3_BL nằm tách biệt với các chủng PCV3 còn lại và các chủng tham khảo trên cây sinh dòng, đặt ra nghi vấn PCV3 ở Việt Nam hình thành phân nhánh mới khác hoàn toàn với các chủng ở các nước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Biagini P, Bendinelli M, Hino S, Kakkola L, Mankertz A, Niel C, Okamoto H, Raidal S, Teo CG, Todd D., 2012. *Circoviridae*. In King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (ed), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, New York, NY. pp 343–349.
- Brockmeier SL, Halbur PG, Thacker EL., 2002. *Porcine respiratory disease complex*. In *Polymicrobial Diseases*, ed. KA Brogden, JM Guthmiller, Washington, DC: ASM Press. pp 231–58.
- Chen GH, Mai KJ, Zhou L, Wu RT, Tang XY, Wu JL et al., 2017. *Detection and genome sequencing of porcine circovirus 3 in neonatal pigs with congenital tremors in South China*. *Transboundary Emerging Diseases*. 64:1650–1654.
- Cheung AK., 2003. *Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses*. *Virology* 310:41–49.
- Clark EG., 1996. Pathology of postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs. *Proc West Can Assoc Swine Prod* October 1996:22–25.
- Duy Tien Do, Le Thi Hanh Dung, Nguyen P. Huynh, Nguyen TT Nam, Nguyen TP Ninh, Nguyen T Toan, 2013. *The pathogens and pathology in pigs dealing with “Porcine Respiratory Disease Complex” in several farms in Southern, Vietnam*. The 6th Asian Pig Veterinary Society Congress, Hochiminh city, Vietnam, Hochiminh city, Vietnam; 09/2013.
- Faccini S., Barbieri I., Gilioli A., Sala G., Gibelli LR., Moreno A., et al., 2017. *Detection and genetic characterization of Porcine circovirus type 3 in Italy*. *Transboundary Emerging Diseases*. 64:1661–1664.
- Fan, S., Ku, X., Chen, F., Wang, Y., Yu, X., He, Q., 2017. *Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 3 strain, PCV3/CN/Hubei-618/2016, isolated from China*. *Genome Announcements* 5 (15), 2.
- Franzo G, Legnardi M, Hjulsager C.K, Klaumann F, Larsen L.E, Segales J et al., 2018. *Full-genome sequencing of porcine circovirus 3 field strains from Denmark, Italy and Spain demonstrates a high within-Europe genetic heterogeneity*. *Transboundary Emerging Diseases*. 65:602–606.
- Fux R, Söckler C, Link EK, Renken C, Krejci R, Sutter G et al. 2018. *Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains*. *Virology Journal*. 15:25-26.
- Ha Z, Xie CZ, Li JF, Wen SB, Zhang KL, Nan FL, Zhang H, Guo YC, Wang W, Lu HJ, Jin NY, 2018. *Molecular detection and genomic characterization of porcine circovirus 3 in pigs from Northeast China*. *BMC Veterinary Research*. 14(1): 321.
- Kedkovid R, Woonwong Y, Arunorat J, Sirisereewan C, Sangpratum N, Lumyai M et al., 2018. *Porcine circovirus type 3 (PCV3)*

- infection in grower pigs from a Thai farm suffering from porcine respiratory disease complex (PRDC). Veterinary Microbiology.* 215:71–76.
13. Klaumann F., Franzo G., Sohrmann M., Florencia CF., Drigo M., Núñez JI., et al., 2018. *Retrospective detection of Porcine circovirus 3 (PCV-3) in pig serum samples from Spain.* Transboundary Emerging Diseases. 65:1290–96.
 14. Ku X., Chen F., Li P., Wang Y., Yu X., Fan S., Qian P., Wu M., He Q., 2017. *Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China.* Transboundary Emerging Diseases. 64, 703–708.
 15. Kwon T., Yoo SJ., Park CK., Lyoo YS., 2017. *Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations.* Veterinary Microbiology. 207: 178–180.
 16. Nguyễn Ngọc Hải và Đỗ Tiến Duy., 2019. *Các bệnh truyền nhiễm quan trọng và mới nổi trên heo. Tái bản lần 1. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh.* 71-77, 109-119, 133-139.
 17. Phạm Hồng Quân, Nguyễn Văn Giáp, Nguyễn Thị Thanh Thuý và ctv., 2017. *Nghiên cứu sự lưu hành của loài virus mới (Porcine circovirus 3 - PCV3) ở đàn lợn nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam, Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.* 15(11): 1520-1528.
 18. Palinski R, Piñeyro P, Shang P et al., 2017. *A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure.* Journal of Virology. 91:1-13.
 19. Stadejek T., Wozniak A., Milek D., Biernacka K., 2017. *First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland.* Transboundary Emerging Diseases. 64:1350–1353.
 20. Sukmak M., Thanantong N, Poolperm P., Boonsoongnern A., Ratanavanichrojn N., Jirawattanapong P., Woonwong Y., Soda N., Kaminsonsakul T., Phuttipatimok S., Wajjwalku W., 2018. *The retrospective identification and molecular epidemiology of porcine circovirus type 3 (PCV3) in swine in Thailand from 2006 to 2017.* Short communication. Transboundary and Emerging Diseases. 66(1).
 21. Tochetto C., Lima DA., Varela APM., Loiko MR., Paim WP., Scheffer CM., et al., 2017. *Full-Genome Sequence of Porcine Circovirus type 3 recovered from serum of sows with stillbirths in Brazil.* Transboundary Emerging Diseases. 65:5–9.
 22. Ye X., Berg M., Fossum C., Wallgren P., Blomström AL., 2018. *Detection and genetic characterisation of porcine circovirus 3 from pigs in Sweden.* Virus Gens. 54:466–9. doi: 10.1007/s11262-018-1553-4.
 23. Zhao D., Wang X., Gao Q., Huan C., Wang W., Gao S., et al., 2017. *Retrospective survey and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 3 in Jiangsu province, China, 2008 to 2017.* Archives of Virology. 163:2531–38. 10.1007/s00705-018-3870-2.
 24. Zheng S., Wu X., Zhang L., Xin C., Liu Y., Shi J., Peng Z., Xu S., Fu F., Yu J., Sun W., Xu S., Li J., Wang J., 2017. *The occurrence of porcine circovirus 3 without clinical infection signs in Shandong Province.* Transboundary Emerging Diseases. 64: 1337–1341.

Ngày nhận 1-6-2019

Ngày phản biện 8-7-2019

Ngày đăng 1-9-2019