

Khảo sát đặc điểm di truyền của virus gây bệnh viêm da nổi cục trên bò tại tỉnh Tiền Giang

Survey of genetic characteristics of the Virus Causing Lumpy Skin Disease on cows in Tien Giang province

Nguyễn Quốc Thái¹, Trần Ngọc Bích^{1*}, Nguyễn Trần Phước Chiến¹, Huỳnh Trường Giang¹, Võ Tuấn Khải Huyền², Thái Quốc Hiếu², Nguyễn Vũ Thụy Hồng Loan³ và Mai Thị Ngọc Hương⁴

¹ Trường Đại học Cần Thơ *tnbich@ctu.edu.vn

² Chi cục Chăn nuôi và Thú y tỉnh Tiền Giang

³ Trường Đại học Công Nghệ TP.HCM

⁴ Trường Đại học Bạc Liêu

Ngày nhận bài:

20/8/2023

Ngày chấp nhận đăng:

25/9/2023

Keywords: Lumpy Skin Disease, RPO30, Tien Giang, virus.

Từ khóa: Bệnh viêm da nổi cục, kiểu gene RPO30, Tiền Giang, virus.

ABSTRACT

A survey on genetic characteristics of dermatophytosis virus in Tien Giang was carried out from June to November 2022 at the Faculty of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Can Tho University and Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine of Tien Giang province aiming at identifying its genetic variations to assist in the diagnosis and prevention of epidemics. Therefore, patient samples from outbreaks were collected to sequence the RPO30 gene segment. The results show that there was high similarity among strains of LSD/RPO30/01TienGiang, LSD/RPO30/02TienGiang, LSD/RPO30/03TienGiang, strain in Northern Vietnam (2020), strain in China (MN518933.China/XJ/2019) and vaccine strains circulating in Vietnam.

TÓM TẮT

Khảo sát đặc điểm di truyền của virus viêm da nổi cục ở Tiền Giang được thực hiện từ tháng 6 đến tháng 11 năm 2022 tại Khoa Thú y, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ và Chi cục Chăn nuôi - Thú y tỉnh Tiền Giang với mục tiêu xác định một số đặc điểm di truyền của virus viêm da nổi cục nhằm hỗ trợ trong công tác chẩn đoán, phòng chống dịch. Vì vậy những mẫu bệnh phẩm ở các ổ dịch được thu thập để giải mã trình tự đoạn gen RPO30. Kết quả chỉ ra rằng có sự tương đồng cao giữa các chủng LSD/RPO30/01TienGiang, LSD/RPO30/02TienGiang và LSD/RPO30/03TienGiang, chủng viêm da nổi cục ở miền Bắc Việt Nam (2020), Trung Quốc (MN518933.China/XJ/2019) và chủng vaccine đang lưu hành ở Việt Nam.

1. Đặt vấn đề

Ở Việt Nam, sau các đợt bệnh dịch tả lợn Châu Phi trên heo, bò là đối tượng vật nuôi được người dân quan tâm chăn nuôi. Đối tượng vật nuôi

càng phát triển thì tỷ lệ bệnh tật càng tăng, nhất là một số loại bệnh truyền nhiễm nguy hiểm trên trâu bò như: bệnh lở mồm long móng, bệnh tụ huyết trùng... Đặc biệt có sự xuất hiện của bệnh viêm da

nổi cục (Lumpy Skin Disease - LSD) trong những năm gần đây, đây là một bệnh mới và đã gây ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe đối với gia súc. Viêm da nổi cục được Tổ chức Thú y Thế giới (OIE) xếp là loại bệnh xuyên biên giới bởi bệnh này là mối đe dọa lớn đối với chăn nuôi bò do tính chất lây lan nhanh và thiệt hại kinh tế nghiêm trọng (Tuppurainen & Oura, 2012; Givens, 2018). Theo Lu và cộng sự (2021) đã báo cáo ổ dịch viêm da nổi cục đầu tiên ở Trung Quốc vào ngày 03/8/2019; Tran và cộng sự (2021) đã có những công bố đầu tiên tại ổ dịch viêm da nổi cục ở tỉnh Lạng Sơn, Việt Nam vào tháng 10/2020.

Bệnh viêm da nổi cục do virus (LSD) gây ra là chủng Neethling. Phương thức lây truyền chủ yếu là cơ học bởi các côn trùng chân đốt. LSD phát bệnh hầu hết ở những tháng ẩm áp và ẩm ướt trong năm liên quan trực tiếp đến sự phát triển của côn trùng (Gari và cộng sự, 2010). Theo báo cáo

Bảng 1. Đoạn mồi dùng để khuếch đại một phần đoạn gene RPO30 của virus viêm da nổi cục bằng kỹ thuật PCR (Molini *et al.*, 2018)

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước (bp)
RPO30 (LSDV36)	F: CAGCTGTTTGTTCATTGATTTT R: TCGTATAGAAACAAGCCTTAATAGA	544

Chu trình thực hiện phản ứng PCR của gene RPO30:

Bảng 2. Pha thành phần hỗn hợp phản ứng PCR

Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μL)
Master Mix 2X TD	2X	12
Mồi xuôi (F)	10 pM	1
Mồi ngược (R)	10 pM	1
Mẫu DNA	-	2
Nước khử ion (chạy PCR)	-	9
Tổng	-	25

Đặt các PCR eppendorf đã chuẩn bị cho vào máy luân nhiệt PCR T100 (Biorad, USA) với điều kiện phản ứng.

của Chi cục Chăn nuôi và Thú y Tiền Giang, từ ngày 16/8/2021 ở xã Song Bình, huyện Chợ Gạo. Vì vậy, nghiên cứu “Đặc điểm di truyền của virus Viêm da nổi cục ở Tiền Giang” được thực hiện.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 6 đến tháng 10/2022 tại Tiền Giang.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Những mẫu bệnh phẩm có kết quả Realtime PCR dương tính với virus viêm da nổi cục.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Có 5 mẫu swab dịch mũi ở bò nghi mắc bệnh viêm da nổi cục, có 4 mẫu dương tính đã được xác định bằng phương pháp Realtime PCR để thực hiện phản ứng PCR khuếch đại đoạn gene RPO30.

Phản ứng PCR

Bảng 3. Chu trình nhiệt cho phản ứng RPO30

Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ
94°C	4 phút	1
95°C	30 giây	
55°C	30 giây	40
72°C	45 giây	
72°C	7 phút	1

Sản phẩm được điện di trên thạch agarose 1,5% ở hiệu điện thế 100V trong 30 phút. Quan sát và chụp ảnh kết quả điện di sản phẩm PCR trên máy chụp ảnh gel.

Phương pháp giải trình tự gene và phân tích di truyền cây phả hệ

Sau khi điện di sản phẩm sẽ được giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Phần mềm Mega X được sử dụng để xây dựng cây phả hệ di truyền của virus viêm da nổi cục phát hiện được tại các tỉnh khảo sát và các chủng tham chiếu. Trong đó, phương pháp tiếp cận cực đại (Maximum likelihood) với hệ số kiểm định tin tưởng bootstrap

là 1.000 lần lặp lại được sử dụng để phân tích.

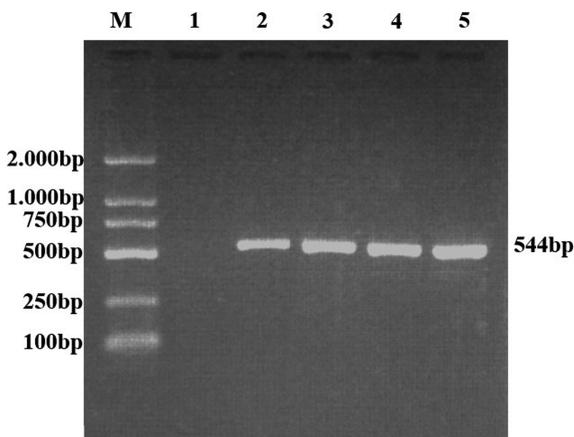
Phần mềm BioEdit X được sử dụng để phân tích trình tự nucleotide giữa các chủng trong nghiên cứu với các chủng tham chiếu nhằm xác định vị trí sai khác (xóa, chèn, thay thế).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả khuếch đại một phần gene RPO30

Kết quả điện di sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được thể hiện ở Hình 1. Cặp mồi RPO30 (LSDV36) F: CAGCTGTTTGTTTACATTTGATTTTT và R: TCGTATAGAAACAAGCCTTTAATAGA của tác giả Molini và cộng sự (2018) được sử dụng để xác định các chủng của kiểu gene RPO30 phát hiện trên địa bàn tỉnh Tiền Giang. Từ kết quả này ta có thể tiến hành gửi đi giải trình tự gene và xác định kiểu gene để xây dựng cây phả hệ.

Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR virus viêm da nổi cục



Giếng 1: âm tính; Giếng 2,3,4,5: dương tính

3.2. Kết quả so sánh độ tương đồng giữa các chủng virus viêm da nổi cục tại Tiền Giang với các chủng tham chiếu

Kết quả so sánh mức độ tương đồng nucleotide các chủng được phát hiện tại Tiền Giang được thể hiện ở Bảng 3. Kết quả cho thấy 3 chủng của gene RPO30 của virus viêm da nổi cục ở Tiền Giang là LSD/RPO30/01TienGiang, LSD/RPO30/02TienGiang và LSD/RPO30/03TienGiang có mức độ tương đồng cao với nhau về trình tự nucleotide (dao động trong khoảng 99,2 - 100%). Bên cạnh đó, 3 chủng virus viêm da nổi cục ở Tiền Giang có tỷ lệ tương đồng cao với chủng MN518933.China/XJ/2019 (Trung Quốc, 2019) với tỷ lệ tương đồng nucleotide trong khoảng 99,2-100%. So với các chủng tham chiếu còn lại, 3 chủng virus viêm da nổi cục ở Tiền Giang có tỷ lệ tương đồng nucleotide trong khoảng 98,1-99,2%.

Kết quả so sánh mức độ tương đồng acid amin của 3 chủng của gene RPO30 tại Tiền Giang có tỷ lệ tương đồng cao trong khoảng 99,4-100%. So với chủng MN518933.China/XJ/2019 (Trung Quốc, 2019) 3 chủng viêm da nổi cục ở Tiền Giang có tỷ lệ tương đồng acid amin với nhau trong khoảng 99,2-100%. Tỷ lệ tương đồng acid amin của 3 chủng virus viêm da nổi cục ở Tiền Giang với các chủng tham chiếu còn lại dao động từ 99,1-99,6%.

Kết quả cho thấy 3 chủng của gene RPO30 của virus viêm da nổi cục ở Tiền Giang có tỷ lệ tương đồng cao với chủng MN518933.China/XJ/2019 (Trung Quốc, 2019) về nucleotide và acid amin. Điều này giống với nghiên cứu của Tran và cộng sự (2021), virus được phân lập trong đợt bùng phát dịch ở Lạng Sơn của Việt Nam (giáp với Trung Quốc) giống 100% dựa trên gene RPO30.

Bảng 4. Kết quả so sánh tỷ lệ phần trăm tương đồng nucleotide (dưới đường chéo) và amino acid (trên đường chéo) của virus gây bệnh viêm da nổi cục được giải trình tự trong nghiên cứu và các chủng tham chiếu trên thế giới

TT	Chủng	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	LSD/RPO30/01TienGiang		100	99,4	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,3	99,5	100	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5
2	LSD/RPO30/02TienGiang	100		99,4	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,3	99,5	100	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5
3	LSD/RPO30/03TienGiang	99,2	99,2		99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	99,1	99,2	99,4	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2
4	GU119938.Sudan/06	99,2	99,2	98,5		100	100	100	100	99,6	100	99,5	100	100	100	100	100	100	100
5	GU119947.Egypt/89_Ismalia	99,2	99,2	98,5	100		100	100	100	99,6	100	99,5	100	100	100	100	100	100	100
6	GU119952.Niger_Tougounous	99,2	99,2	98,5	100	100		100	100	99,6	100	99,5	100	100	100	100	100	100	100
7	GU119945.RSA/07_Brahman	99,2	99,2	98,5	100	100	100		100	99,6	100	99,5	100	100	100	100	100	100	100
8	GU119943.RSA/08_M143/08_10/6/08	99,2	99,2	98,5	100	100	100	100		99,6	100	99,5	100	100	100	100	100	100	100
9	GU119944.Sudan/99_Atbara	98,8	98,8	98,1	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6		99,6	99,3	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6
10	MT074112.IND/ODI/1KK/2019	99,2	99,2	98,5	100	100	100	100	100	99,6		99,5	100	100	100	100	100	100	100
11	MN518933.China/XJ/2019	100	100	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	98,8	99,2		99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5
12	KJ462780.LSD/Sivas/0114/TUR	99,2	99,2	98,5	100	100	100	100	100	99,6	100	99,2		100	100	100	100	100	100
13	GU119951.RSA/06_Springbok	99,2	99,2	98,5	100	100	100	100	100	99,6	100	99,2	100		100	100	100	100	100
14	GU119948.RSA/00_OP126402	99,2	99,2	98,5	100	100	100	100	100	99,6	100	99,2	100	100		100	100	100	100
15	KP663687.Wenji/B01/2011	99,2	99,2	98,5	100	100	100	100	100	99,6	100	99,2	100	100	100		100	100	100
16	KJ818289.Kenyavac_(KSGP_0-240)	99,2	99,2	98,5	100	100	100	100	100	99,6	100	99,2	100	100	100	100		100	100
17	KJ818290.KS-1	99,2	99,2	98,5	100	100	100	100	100	99,6	100	99,2	100	100	100	100	100		100
18	MT074116.IND/ODI/31MR/2019	99,2	99,2	98,5	100	100	100	100	100	99,6	100	99,2	100	100	100	100	100	100	

3.3. Kết quả phân tích di truyền phả hệ của các chủng virus viêm da nổi cục tại Tiền Giang

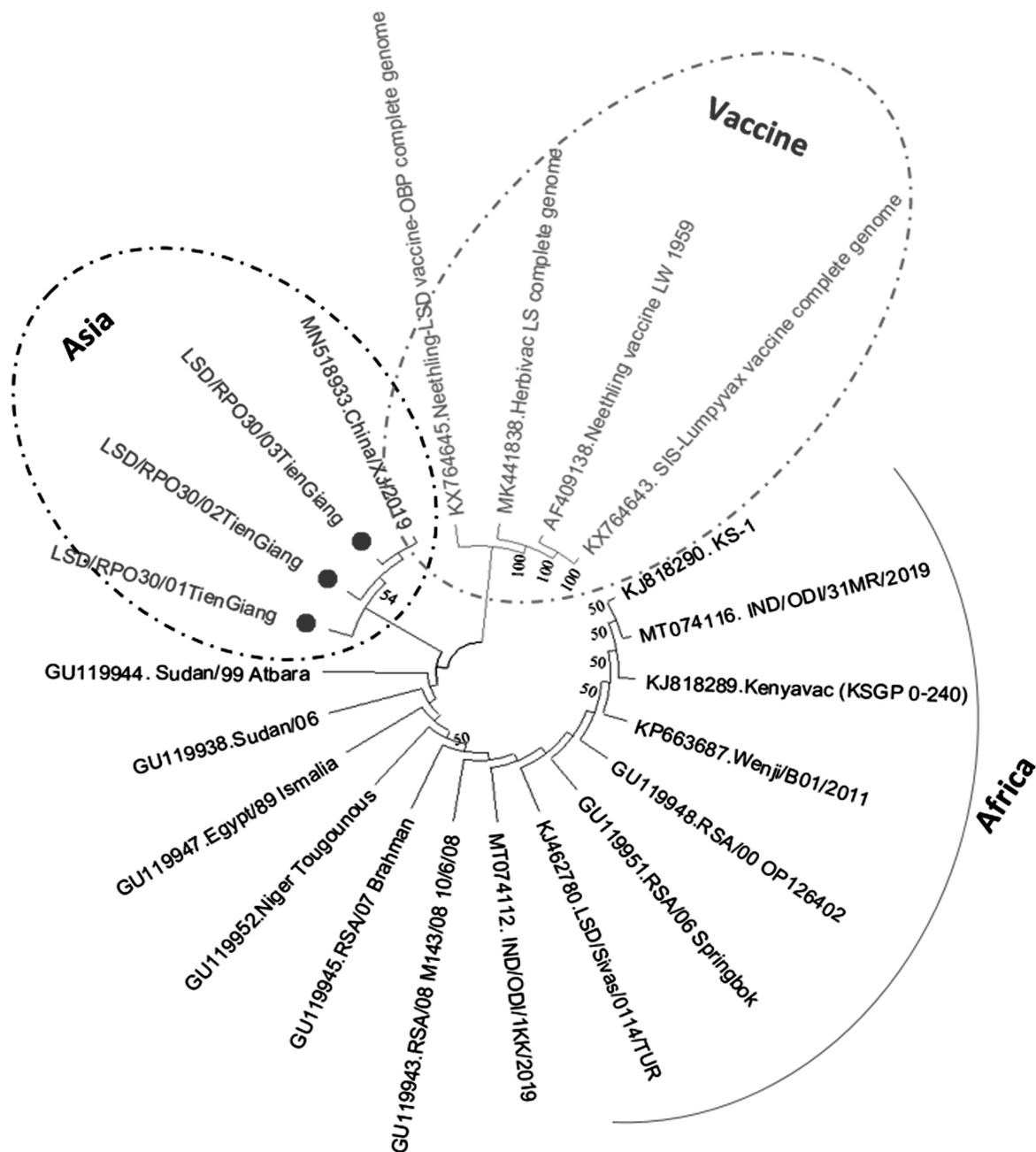
Trình tự nucleotide một phần gene RPO30 đã được sử dụng để xác định đặc điểm di truyền và kiểu gene của virus viêm da nổi cục. Kết quả phân tích phả hệ di truyền trình tự nucleotide của gene RPO30 của các chủng LSD/RPO30/01TienGiang, LSD/RPO30/02TienGiang và LSD/RPO30/03TienGiang với 15 chủng tham chiếu đã được công bố trên Genbank được thể hiện ở Bảng 3. Kết quả Hình 2. Quan sát thấy các 3 chủng virus viêm da nổi cục tại Tiền Giang với chủng virus viêm da nổi cục của Trung Quốc (MN518933.China/XJ/2019) nằm gần nhau và được nhóm vào các chủng thuộc nhóm Asia và nằm khác nhóm với 4 chủng vaccine (KX764645.Neething-LSD vaccine-OBP, MK441838.Herbivac LS, AF409138.Neething vaccine LW 1959, KX764643-Lumpyvax vaccine) và nằm xa so với các chủng ở Châu Phi.

Qua kết quả có thể nhận ra rằng bệnh viêm da nổi cục lây lan từ Trung Quốc vào Việt Nam, có thể do nhập khẩu gia súc kiểm soát bệnh chưa đúng hoặc do vận chuyển đường tiêu ngạch..... Tuy nhiên nguồn gốc chính xác cho việc đưa mầm bệnh này vào Việt Nam vẫn chưa xác định. Điều quan trọng là kiểm soát khả năng lây lan của virus viêm da nổi cục ở Việt Nam, mức độ cấp bách của

việc tiêm phòng viêm da nổi cục của tại Việt Nam. Ngoài ra còn phải nâng cao nhận thức về an toàn sinh học, tăng cường kiểm soát việc di chuyển động vật, vận chuyển sản phẩm động vật bất hợp pháp, đồng thời giảm vector của virus viêm da nổi cục có thể làm giảm khả năng lây truyền virus viêm da nổi cục ở Việt Nam (Tran và cộng sự, 2021).

Bệnh có thể lây lan theo hai cách thông qua lây truyền động vật chân đốt và di chuyển của động vật bị nhiễm bệnh. Lây lan qua lây truyền tiếp xúc và vật mang mầm bệnh được coi là không hiệu quả nhưng vẫn là một con đường lây truyền có thể xảy ra (Alexander và cộng sự, 2020). Bên cạnh đó, theo Aleksandr và cộng sự (2020), các nghiên cứu cho thấy virus tái tổ hợp có thể lây truyền theo chiều ngang mà không cần sự hỗ trợ của động vật chân đốt, vì cả côn trùng và ve đều không được phát hiện trong suốt thời gian thử nghiệm. Bệnh có thể được truyền gián tiếp qua việc dùng chung máng thức ăn và nước và lây truyền trực tiếp qua niêm mạc do động vật tiếp xúc liền kề. Tuy nhiên, sự phức tạp của việc lây truyền phải được tiếp tục tìm hiểu.

Hình 2. Phát sinh chủng loài của virus viêm da nổi cục tại Tiền Giang trên đoạn gene RPO30



Vaccine chống lại virus viêm da nổi cục có sẵn dưới dạng phân lập virus viêm da nổi cục sống giảm độc lực (vaccine Neethling và Kenyavac) và các chủng dựa trên virus thủy đậu cừu (SPPV). Việc lựa chọn vaccine rất phức tạp bởi những phát hiện mâu thuẫn về tính an toàn, hiệu quả và khả năng lây truyền của chúng. Xem xét năng lực sao chép của vaccine sống, nguy cơ đồng nhiễm và tái tổ hợp sau đó được coi là thấp đối với các vaccine *Poxvirus* này và khiến nó trở thành lựa chọn ưu tiên ở hầu hết các quốc gia. Theo Alexander và

cộng sự (2020) cho thấy việc sử dụng vaccine SPPV có khả năng bảo vệ chéo chống lại virus viêm da nổi cục ở Nga.

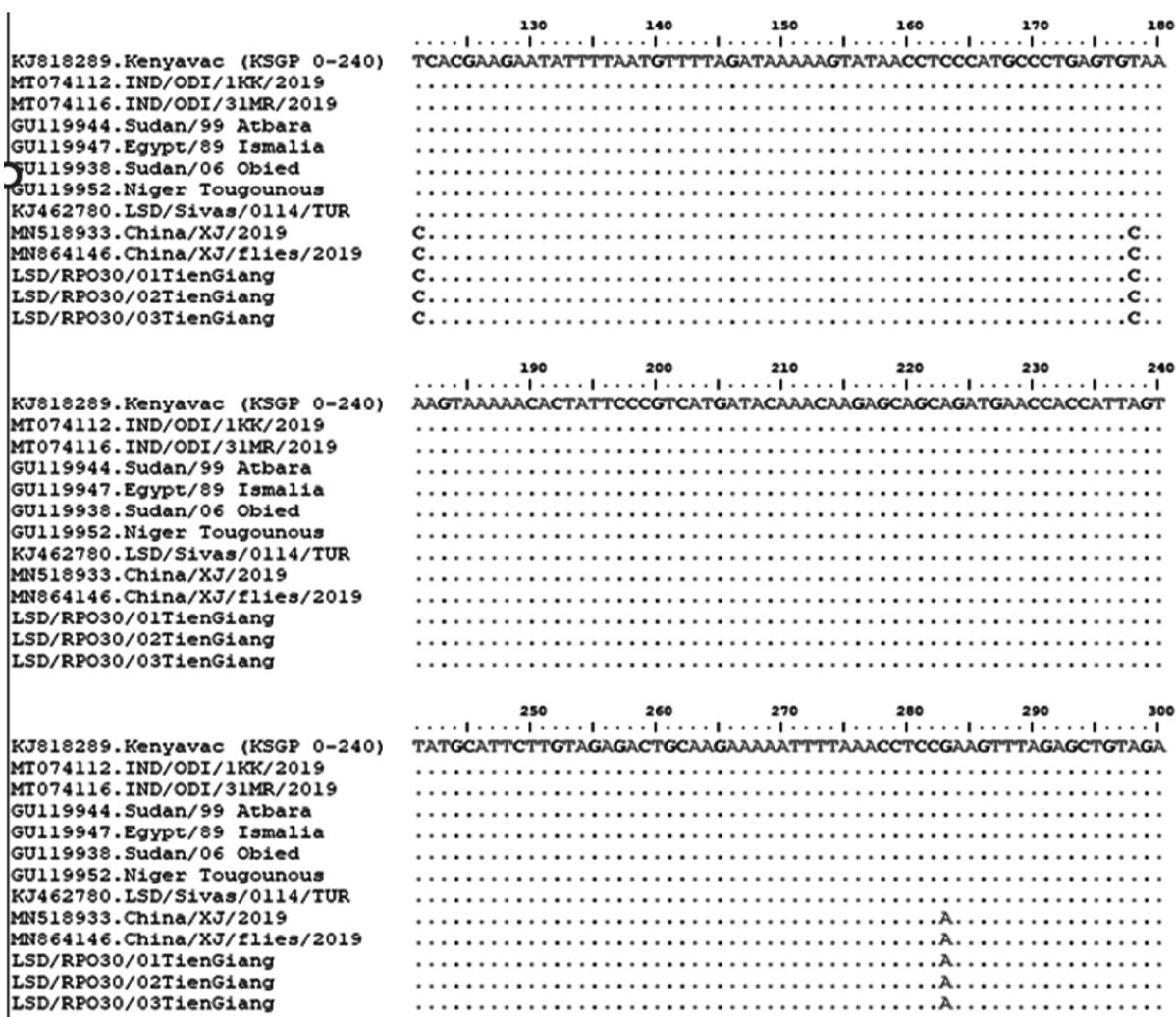
3.4. So sánh sự sai khác về trình tự nucleotide chủng Tiền Giang với các dòng tham chiếu

Trình tự nucleotide gene RPO30 virus viêm da nổi cục tại Tiền Giang đã được căn chỉnh và so sánh với các chủng tham chiếu lưu hành ở Africa: KJ818289.Kenyavac (KSGP 0-240), MT074112.IND/ODI/1KK/2019,

MT074116.IND/ODI/31MR/2019, GU119944. Sudan/99 Atbara, GU119947.Egypt/89 Ismalia, GU119938.Sudan/06 Obied, GU119952.Niger Tougounous, KJ462780.LSD/Sivas/0114/TUR và chủng ở Asia MN518933.China/XJ/2019, MN864146.China/XJ/flies/2019 được thể hiện ở Hình 4.8. Kết quả cho thấy trình tự nucleotide của 3 chủng của gene RPO30 của virus viêm da nổi cục ở Tiền Giang (LSD/RPO30/01TienGiang, LSD/RPO30/02TienGiang, LSD/RPO30/03TienGiang) giống nhau và giống với trình tự nucleotide của Trung Quốc (MN518933.China/XJ/2019 và MN864146.China/XJ/flies/2019). Điều này chứng tỏ chủng virus viêm da nổi cục lưu hành tại Tiền Giang có cùng kiểu

gene với các chủng của Trung Quốc. Bên cạnh đó, 3 chủng của kiểu gene RPO30 virus viêm da nổi cục tại Tiền Giang có sự thay đổi trình tự nucleotide so với chủng vaccine (Kenyavac (KSGP 0-240)) và các chủng còn lại tại vị trí 121 (T/C), vị trí 178 (T/C), vị trí 283 (G/A). Tất cả những vị trí sai khác này do đột biến thay thế. Ba chủng virus viêm da nổi cục ở Tiền Giang tuy có sự thay đổi trình tự nucleotide với chủng tham chiếu Kenyavac nhưng sự thay đổi không đáng kể, nên vẫn có kết quả tốt đối với vaccine viêm da nổi cục đang lưu hành tại Việt Nam (Vaccine Kenyavac được sản xuất tại nước Kenya, được Cục Thú Y liệt kê vào 10 loại vaccine viêm da nổi cục, 2020).

Hình 3. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của gene RPO30 virus viêm da nổi cục tại Tiền Giang với các chủng tham chiếu



4. Kết luận

Kết quả so sánh sự tương đồng cao giữa các chủng LSD/RPO30/01TienGiang, LSD/RPO30/02TienGiang và LSD/

RPO30/03TienGiang, chủng viêm da nổi cục ở miền Bắc Việt Nam (2020), Trung Quốc (MN518933.China/XJ/2019) và chủng vaccine đang lưu hành ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aleksandr, K., Pavel, P., Olga, B., Svetlana, K., Vladimir, R., Yana, P. & Alexander, S. (2020). Emergence of a new lumpy skin disease virus variant in Kurgan Oblast, Russia, in 2018. *Archives of Virology*, 165(6), 1343-1356.
- Alexander, S., Olga, B., Svetlana, K., Valeriy, Z., Yana, P., Pavel, P. & Aleksandr, K. (2019). A real-time PCR screening assay for the universal detection of lumpy skin disease virus DNA. *BMC Research Notes*, 12(1), 1-5.
- Cục Thú y (2020). Quy trình xét nghiệm phát hiện virus gây bệnh Viêm da nổi cục trên trâu bò (Lumpy skin disease). Cục Thú y TCCS 04:2020/TY-DT.
- Chi cục Chăn nuôi-Thú y tỉnh Tiền Giang (2021 & 2022). Báo cáo tình hình chăn nuôi và dịch bệnh tại tỉnh Tiền Giang.
- Gari, G., Waret-Szkuta, A., Grosbois, V., Jacquiet, P. & Roger, F. (2010). Risk factors associated with observed clinical lumpy skin disease in Ethiopia. *Epidemiology & Infection*, 138(11), 1657-1666.
- Givens, M.D. (2018). Risks of disease transmission through semen in cattle. *Animal*, 12(s1), s165-s171.
- Lu, G., Xie, J., Luo, J., Shao, R., Jia, K. & Li, S. (2021). Lumpy skin disease outbreaks in China, since 3 August 2019. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(2), 216-219.
- Molini, U., Aikukutu, G., Khaiseb, S., Haindongo, N.N., Lilungwe, A.C., Cattoli, G., Angela, C.L., Giovanni, C., William, G.D. & Lamien, C.E. (2018). Molecular characterization of lumpy skin disease virus in Namibia, 2017. *Archives of virology*, 163, 2525-2529.
- Tuppurainen, E.S.M. & Oura, C.A.L. (2012). lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transboundary and emerging diseases*, 59(1), 40-48.
- Tran, H.T.T., Truong, A.D., Dang, A.K., Ly, D.V., Nguyen, C.T., Chu, N.T. & Dang, H.V. (2021). Lumpy skin disease outbreaks in vietnam. (2020). *Trans-boundary and Emerging Diseases*, 68(3): 977-980.