

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT NESTED PCR PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH TYPE PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) Ở ĐÀN LỢN NUÔI TẠI MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC

Huỳnh Thị Mỹ Lệ¹, Nguyễn Văn Giáp¹, Đặng Hữu Anh¹, Trần Thị Hương Giang¹, Mai Thị Ngân¹, Vũ Thị Ngọc¹, Lê Văn Trường¹, Ngô Minh Hà¹, Bong Kyun Park²

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định genotype PCV2 đang lưu hành ở đàn lợn nuôi tại 4 tỉnh Hà Nội, Hòa Bình, Bắc Giang và Hải Dương bằng kỹ thuật nested PCR. Kết quả sàng lọc 583 mẫu bệnh phẩm thu thập trong năm 2011-2012, đã phát hiện tỷ lệ dương tính với PCV2 là khác nhau giữa các địa phương. Trong 120 mẫu phủ tạng của lợn biểu hiện hội chứng liên quan đến PCV2 (Porcine circovirus type 2-associated disease, PCVAD), tỷ lệ dương tính trung bình là 54,17%, trong đó cao nhất là Bắc Giang (71,43%) và Hải Dương (70,00%) ($p < 0,05$). Toàn bộ các chủng PCV2 lưu hành ở đàn lợn thuộc 4 tỉnh đều thuộc genotype 2b. Kết quả này sẽ rất có ý nghĩa trong các nghiên cứu tiếp theo về PCV2 lưu hành tại Việt Nam, giúp đề xuất biện pháp phòng chống bệnh do PCV2 ở đàn lợn nuôi tại Việt Nam.

Từ khóa: Lợn, nested PCR, Porcine circovirus type 2, Định type, Bắc Việt Nam

Application of nested PCR for Porcine circovirus type 2 (PCV2) detection and genotyping recovered from pigs in some Northern provinces of Vietnam

Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Nguyễn Văn Giáp, Đặng Hữu Anh, Trần Thị Hương Giang, Mai Thị Ngân, Vũ Thị Ngọc, Lê Văn Trường, Ngô Minh Hà, Bong Kyun Park

SUMMARY

This study was carrying out with the aim of applying nested PCR method for PCV2 detection and genotyping recovered from pigs in some northern provinces of Vietnam. Total of 583 samples collected in year 2011-2012 were screened and showed different percentages of PCV2 positive samples among surveyed provinces. Nested PCR results on 120 tissue samples collected from pigs showing clinical signs which related to PCVAD from Hanoi, Hoa Binh, Bac Giang and Hai Duong provinces revealed the presence PCV2 nucleic acid in 65/120 (54.17%) samples. There was significant difference of PCV2 positive percentage between 4 provinces at $p < 0.05$. The highest percentages were in Bac Giang (71.43%) and Hai Duong (70.00%). All of PCV2 isolates were confirmed to be PCV2b genotype. The results might provide an important information for future studies on PCV2 in Vietnam.

Key words: Pig, Porcine circovirus type 2, nested PCR, , Genotyping, North Vietnam

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Porcine circovirus thuộc họ *Circoviridae*, bao gồm Porcine circovirus type 1 (PCV1) và Porcine circovirus type 2 (PCV2). Đối với ngành chăn nuôi lợn, chỉ có PCV2 được xác định là nguyên nhân khởi phát gây ra các tình trạng bệnh lý khác nhau ở lợn (Porcine Circovirus type 2-Associated Disease, PCVAD) bao gồm: hội chứng gầy còm ở lợn sau cai sữa (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome – PMWS), hội chứng viêm

¹ Bộ môn Vi sinh vật – Truyền nhiễm, khoa Thú y, trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội
² Phòng thí nghiệm virus học, Trường đại học Thú y, Đại học Quốc gia Seoul

da và viêm thận (Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome – PDNS), hội chứng viêm đường hô hấp (Porcine Respiratory Diseases Complex) và hội chứng rối loạn sinh sản (Porcine Reproductive Disorders) (Opriessnig và cộng sự, 2007). Trong các hội chứng bệnh do PCV2 gây ra, hội chứng gây còm ở lợn sau cai sữa được coi là nguyên nhân gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi lợn; danh từ “Hội chứng 30kg” (The 30kg syndrome) đôi khi được dùng để chỉ bệnh này do lợn bệnh chỉ đạt khối lượng khoảng 30kg, trong khi lợn không mắc bệnh cùng lứa tuổi có thể đạt 100kg.

Hiện đã xác định được 3 genotype gồm: PCV2c (Dupont và cộng sự, 2008), PCV2a (genogroup 2) và PCV2b (genogroup 1) (Olvera và cộng sự, 2007); trong đó PCV2a, PCV2b là hai genotype lưu hành phổ biến nhất. Genotype PCV2a, PCV2b và các hội chứng bệnh liên quan được xác định ở hầu hết các nước có ngành chăn nuôi lợn trên thế giới. Một số quốc gia Châu Á như Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Thái Lan, Malaysia ... đều công bố về sự xuất hiện của PCVAD (trích theo Hinton, 2003). Ở Việt Nam, thực trạng chăn nuôi lợn hiện nay đã tạo môi trường hết sức thuận lợi cho sự thường xuyên tồn tại nhiều loại mầm bệnh; cộng thêm sự xuất hiện của virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản (PRRSV) từ năm 2007 đã làm cho tình hình dịch bệnh lưu hành trên đàn lợn càng trở nên phức tạp. Do vậy nghiên cứu chỉ ra sự có mặt của PCV2 và PCVAD, xác định được genotype PCV2 lưu hành ở đàn lợn nuôi tại Việt Nam là hết sức cấp thiết để từ đó có được những chiến lược phòng bệnh, vaccin phòng bệnh kịp thời.

Theo Gillespie và cộng sự (2009), để chẩn đoán PCVAD có thể dựa vào triệu chứng lâm sàng nhưng để chẩn đoán khẳng định cần xác định được kháng nguyên PCV2 trong mô bào; và đây được coi là "tiêu chuẩn vàng" (gold standard) để chẩn đoán PCVAD. Các phương pháp "tiêu chuẩn vàng" được sử dụng là kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction), in situ hybridization (ISH) và hóa mô miễn dịch (immunohistochemistry - IHC); trong đó kỹ thuật phổ biến nhất được dùng hiện nay dựa vào phản ứng PCR nhằm xác định sự có mặt của nucleic acid đặc hiệu của virus (Fenaux và cộng sự, 2000). Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả ứng dụng kỹ thuật nested PCR để chẩn đoán và giám định genotype PCV2 lưu hành ở đàn lợn nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. Kết quả góp phần khẳng định sự lưu hành của PCV2 và PCVAD tại các tỉnh thuộc địa bàn nghiên cứu, cung cấp cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo về PCV2 tại Việt Nam.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung

- Xác định sự có mặt và tỷ lệ nhiễm của PCV2 trong mẫu nghiên cứu
- Xác định genotype của PCV2 đang lưu hành tại 4 tỉnh

2.2. Nguyên liệu

Mẫu (453 mẫu huyết thanh, 130 mẫu phủ tạng) được lấy tại các trại chăn nuôi lợn thuộc 4 tỉnh phía Bắc (Hà Nội, Hòa Bình, Bắc Giang và Hải Dương).

Chủng PCV2a và PCV2b chuẩn do Phòng thí nghiệm virus học, Trường đại học Thú y, Đại học Quốc gia Seoul cung cấp.

Hóa chất dùng tách chiết ADN tổng số gồm: (1) dung dịch ly giải mẫu có chứa 27% sucrose, 15 mM trisodium citrate, 0,15 M NaCl, 1 mM ethylene diaminetetraacetic acid, 1% sodium dodecyl sulphate, 200 µg/ml proteinase K; (2) phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1); (3) isopropyl; (4) cồn 70%; (5) dung dịch đệm TE (pH=8).

Sinh phẩm, hóa chất dùng cho phản ứng nested PCR: (1) hot start PCR kit (i-StarMaster, iNtRON Biotechnology, Korea); (2) cặp mồi đặc hiệu dùng cho phát hiện và giám định type PCV2 được lựa chọn dựa theo các nghiên cứu đã công bố trước đây (bảng 1).

Bảng 1. Trình tự cặp môi dùng trong chẩn đoán và xác định genotype PCV2

Môi xuôi/ngược	Loại môi	Trình tự môi (5' - 3')	Kích thước (bp)	Vị trí nucleotide	Tài liệu tham khảo
CV1/CV2	Đặc hiệu chung	AGGGCTGTGGCCTTTGTTAC	989	1329-1348	Fenaux và cs, 2000
		TCTTCCAATCACGCTTCTGC		530-549	
VF2/VR2	Đặc hiệu chung	GAAGAATGGAAGAAGCGG	359	62-79	Yang và cs, 2003
		CTCACAGCAGTAGACAGGT		403-421	
2aF/2aR	Đặc hiệu type 2a	GGGTATAGAGATTTTGTGTTGGTC GCACCTTCGGATATACTGTC	125	1460-1481 1584-1603	Kim và cs, 2010
2bF/2bR	Đặc hiệu type 2b	CACAGAGCGGGGGTTTGGAGC CCGTTACCGCTGGAGAAGGA	172	1460-1481 1633-1652	

Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Vi sinh vật – Truyền nhiễm, khoa Thú y, trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp thu thập mẫu huyết thanh, mẫu phủ tạng

Mẫu được thu thập ngẫu nhiên ở lợn mọi lứa tuổi từ các đàn chưa từng sử dụng vacxin phòng bệnh do PCV2 gây ra.

- Huyết thanh: 453 mẫu được lấy ngẫu nhiên từ lợn khỏe mạnh hoặc có triệu chứng PCVAD (tiêu chảy, có triệu chứng hô hấp, còi cọc...). Dùng seringe lấy máu tĩnh mạch tai hoặc vịnh tĩnh mạch cổ, để 1 giờ ở 37⁰C, sau đó để qua đêm ở 4⁰C. Tiến hành chiết huyết thanh vào ống Eppendorf và bảo quản ở -20⁰C cho đến khi kiểm tra.

- Phủ tạng: gồm gan, hạch amidan, hạch lympho, thận, lách, phổi, ruột của 120 lợn có triệu chứng PCVAD (tiêu chảy, có triệu chứng hô hấp, còi cọc...). Bệnh tích khi mổ khám thường quan sát được là hạch lympho sưng, xuất huyết; phổi viêm. Tiến hành đồng nhất mẫu và bảo quản ở -20⁰C cho đến khi kiểm tra.

Ngoài ra chúng tôi còn lấy 10 mẫu phủ tạng (gồm gan, lách, hạch lympho...) của lợn khỏe mạnh để làm đối chứng, tiến hành đồng nhất và bảo quản mẫu ở -20⁰C.

Mẫu được thu thập trong thời gian từ năm 2011 – 2012.

2.3.2. Phương pháp tách ADN

Các bước chiết tách ADN tổng số từ mẫu huyết thanh/huyết dịch bệnh phẩm 10% gồm: (1) ly giải mẫu (250 µl) trong dung dịch sucrose/proteinase K (500 µl) ở 56⁰C/90 phút, (2) tách pha ADN bằng dung dịch phenol-chloroform-isoamyl (200 µl), (3) rửa ADN bằng isopropyl ở -20⁰C/15 phút, (4) tinh sạch ADN bằng cồn 70%, (5) rửa ADN được hòa tan trong 30µl dung dịch đệm TE. Thao tác ly tâm (12000 vòng/phút/15 phút/4⁰C) được lặp lại từ bước 2 đến bước 4.

2.3.3. Phương pháp nested PCR chẩn đoán và định genotype PCV2

Nghiên cứu này ứng dụng kỹ thuật nested PCR nhằm tăng độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp PCR. Các bước thực hiện gồm: (1) tổng hợp sản phẩm PCR vòng ngoài sử dụng cặp môi đặc hiệu CV1/CV2 chung cho các genotype; (2) xác định sự có mặt của PCV2 với cặp môi VF2/VR2 chung cho tất cả genotype; (3) định type bằng cặp môi đặc hiệu genotype 2aF/2aR (PCV2a) và 2bF/2bR (PCV2b). Thành phần phản ứng PCR được phối trộn theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chu trình nhiệt của phản ứng được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR chẩn đoán và định type PCV2

Cặp môi	Các giai đoạn của phản ứng	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giây)	Số vòng lặp
CV1/CV2	Tiền biến tính	94	300	1
	Biến tính	94	20	
	Bắt môi	61	20	35
	Kéo dài	72	90	
	Kéo dài cuối cùng	72	300	1
VF2/VR2	Tiền biến tính	94	300	1
	Biến tính	94	20	
	Bắt môi	55	20	35
	Kéo dài	72	30	
	Kéo dài cuối cùng	72	300	1
2aF/2aR 2bF/2bR	Tiền biến tính	94	300	1
	Biến tính	94	20	
	Bắt môi	57	20	35
	Kéo dài	72	20	
	Kéo dài cuối cùng	72	300	1

Sản phẩm PCR được phân tích bằng phương pháp điện di trong thạch agarose 1,5% có bổ sung 0,5 µg/ml ethidium bromide.

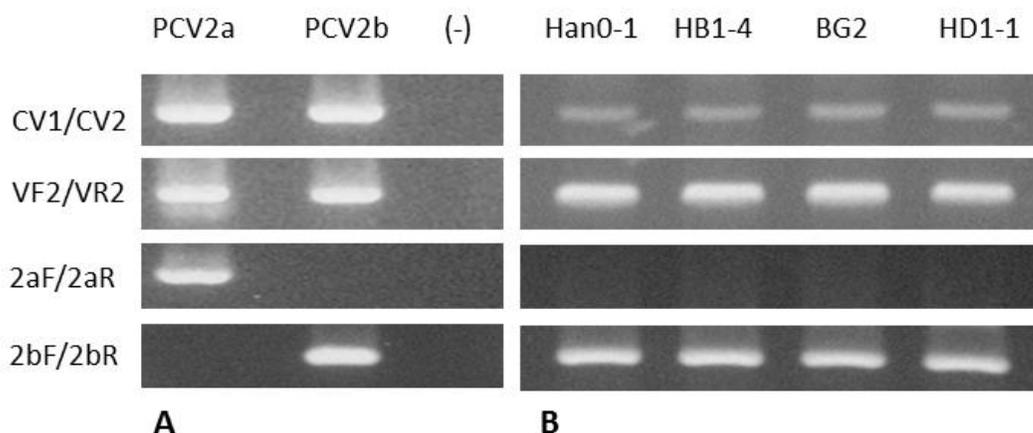
2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng chương trình Excel 2003; so sánh sự sai khác giữa các yếu tố bằng phép thử χ^2 với phần mềm Minitab 14.0.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định sự có mặt của PCV2 trong mẫu bệnh phẩm thu thập được từ các địa phương

Phản ứng nested PCR trước tiên được thực hiện trên mẫu ADN dương chuẩn của PCV2a và PCV2b nhằm khẳng định sự hoạt động bình thường và đặc hiệu của phản ứng PCR. Kết quả (hình 1A) cho thấy ở mẫu đối chứng âm không xuất hiện sản phẩm PCR với bất kỳ cặp môi đặc hiệu chung hoặc đặc hiệu genotype. Ngược lại, mẫu ADN dương chuẩn của genotype 2a hoặc 2b cho vạch đặc hiệu với tất cả các cặp môi, trừ cặp môi đặc hiệu cho genotype 2b hoặc genotype 2a.



Hình 1. Kết quả nested PCR trên mẫu ADN dương chuẩn và mẫu bệnh phẩm

Kết quả áp dụng phản ứng nested PCR trên các mẫu bệnh phẩm thu thập được tại các địa phương được minh họa ở hình 1B và trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả nested PCR xác định sự có mặt của PCV2 trong mẫu thu thập được từ các địa phương

TT	Địa điểm	Huyết thanh		Phủ tạng	
		Số mẫu kiểm tra	Dương tính (Tỷ lệ %)	Số mẫu kiểm tra	Dương tính (Tỷ lệ %)
1	Hà Nội	129	4 (3,10)	40	14 (35,00)
2	Hòa Bình	102	43 (42,16)	25	5 (24,00)
3	Bắc Giang	123	10 (8,13)	35	25 (71,43)
4	Hải Dương	99	26 (26,26)	30	21 (70,00)
Tổng hợp		453	83 (18,32)	130	65 (50,00)

So sánh với kết quả dương tính kháng thể khi kiểm tra huyết thanh bằng phản ứng ELISA (70,57%) (kết quả không trình bày) thì tỷ lệ phát hiện được PCV2 trong huyết thanh bằng kỹ thuật nested PCR (18,32%) thấp hơn đáng kể với $p < 0,001$. Điều này được giải thích đây có thể là kháng thể thụ động hoặc do ảnh hưởng của thời gian nhiễm nên virut không còn tồn tại trong máu, vì vậy không phát hiện được khi tiến hành xét nghiệm bằng PCR.

Chứng minh sự có mặt của PCV2 trong phủ tạng của lợn rất có ý nghĩa trong chẩn đoán PCVAD (Gillespie và cộng sự, 2009). Trong nghiên cứu này, tỷ lệ trung bình phát hiện được PCV2 trong phủ tạng của lợn nuôi tại 4 tỉnh là 50,00%; trong đó cao nhất là tỉnh Bắc Giang (71,43%) và Hải Dương (70,00%), cao hơn rõ rệt so với tỉnh Hòa Bình (24,00%) và Hà Nội (35,00%) với mức ý nghĩa $p < 0,05$. Chúng tôi cho rằng kết quả của sự sai khác này là do trong những năm qua, chăn nuôi lợn tại Bắc Giang và Hải Dương chịu ảnh hưởng nặng

nề của dịch rối loạn hô hấp và sinh sản (PRRS) làm cho sức đề kháng của lợn giảm, sự lưu hành của PRRSV cùng với việc gây dựng đàn mới không kiểm soát có thể là nguyên nhân làm cho PCV2 lây lan, phù hợp với nghiên cứu của Rovira và cộng sự (2002), sự nhiễm PRRSV trong đàn sẽ làm tăng sự nhân lên của PCV2. Tương tự, Chen và cộng sự (2007) cũng cho biết những đàn lợn có tỷ lệ huyết thanh dương tính với PRRSV cao thì luôn có tỷ lệ dương tính huyết thanh kháng PCV2 cao và ngược lại; đồng thời việc đàn lợn bị nhiễm PRRSV sẽ khiến cho nguy cơ nhiễm PCV2 tăng lên.

Một số nghiên cứu trước đó tại Việt Nam bằng phương pháp PCR cho thấy tỷ lệ dương tính PCV2 khác nhau. Lê Tiến Dũng (2006) khảo sát trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh cho biết bằng kỹ thuật PCR đã phát hiện 50,77% (33/65) lợn còi dương tính với PCV2 tại 17/22 trại khác nhau của 5/6 địa bàn lấy mẫu; Lâm Thị Thu Hương và cộng sự (2006) khi xét nghiệm hạch bẹn của 36 lợn còi cộc thì có 47,22% dương tính (trích theo Nguyễn Thị Thu Hồng và cộng sự, 2008). Trong nghiên cứu của mình, Nguyễn Thị Thu Hồng (2008) lại chỉ xác định được 4 trong tổng số 14 mẫu bệnh phẩm dương tính, chiếm tỷ lệ 28,57%. Theo chúng tôi tỷ lệ PCV2 dương tính khác nhau như đã trình bày ở trên có thể do nguồn mẫu lấy từ các địa phương khác nhau cũng như ảnh hưởng của độ đặc hiệu của kỹ thuật PCR được sử dụng trong từng nghiên cứu.

Ở một số nước châu Á đã có rất nhiều công trình nghiên cứu sử dụng PCR xác định sự lưu hành của PCV2 ở đàn lợn như Đài Loan, Hàn Quốc, Nhật Bản, Trung Quốc (trích theo Hinton, 2003). Jaganathan và cộng sự (2011) khi sử dụng kỹ thuật nested PCR cũng cho biết có đến 80% trại lợn của Malaysia dương tính với PCV2. Tại Thái Lan, Jantafong và cộng sự (2011) kiểm tra 70 mẫu phân và 70 mẫu máu của lợn mắc PMWS thì tỷ lệ PCV2 dương tính lần lượt là 50% và 57,14%. Những kết quả như đã trình bày ở trên cho thấy PCV2 đang lưu hành rất phổ biến ở các nước Châu Á. Vì vậy khi nhập con giống từ một số nước trong khu vực cần lưu ý đến tình trạng nhiễm PCV2 và PCVAD nhằm hạn chế sự lây lan bệnh, đặc biệt nguy cơ xuất hiện các genotype mới, biến đổi về độc lực khiến cho công tác phòng bệnh của Việt Nam sẽ gặp rất nhiều khó khăn.

3.2. Kết quả xác định sự có mặt của PCV2 ở các đàn có/không biểu hiện triệu chứng của PCVAD

Trong quá trình thực hiện đề tài, cùng với việc lấy mẫu lợn biểu hiện triệu chứng liên quan đến PCVAD, chúng tôi tiến hành lấy mẫu lợn khỏe mạnh nhằm so sánh sự sai khác về tỷ lệ nhiễm PCV2 trong bệnh phẩm của hai nhóm lợn này. Kết quả phản ứng nested PCR xác định sự có mặt của PCV2 ở các đàn có/không có triệu chứng bệnh được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. So sánh tỷ lệ dương tính PCR ở nhóm lợn khỏe mạnh và nhóm lợn có triệu chứng bệnh

<i>Nhóm xét nghiệm</i>	<i>Huyết thanh^a</i>		<i>Phủ tạng^b</i>	
	<i>Số mẫu kiểm tra</i>	<i>Dương tính Tỷ lệ (%)</i>	<i>Số mẫu kiểm tra</i>	<i>Dương tính Tỷ lệ (%)</i>
Khỏe mạnh	337	61 (18,10)	10	0
Có triệu chứng	116	22 (18,96)	120	65 (54,17)

Tổng hợp	453	83 (18,32)	130	65 (50,00)
-----------------	------------	----------------------	------------	----------------------

^a: nhóm xét nghiệm được xét theo tình trạng đàn

^b: nhóm xét nghiệm được xét theo tình trạng cá thể

Tỷ lệ phát hiện được PCV2 trong tổng số 453 mẫu huyết thanh kiểm tra không có sự sai khác giữa đàn có triệu chứng cũng như đàn khỏe mạnh ($p > 0,05$); trong khi đó với mẫu phủ tạng chỉ dương tính ở lợn có triệu chứng, toàn bộ bệnh phẩm lấy từ lợn khỏe mạnh đều cho kết quả âm tính. Kết quả này cũng phù hợp với công bố của Jantafong và cộng sự (2011) khi kiểm tra 70 mẫu máu của lợn khỏe mạnh không phát hiện được trường hợp nào dương tính nhưng với 70 mẫu lấy từ lợn có triệu chứng PMWS thì 57,14% mẫu dương tính. Mặc dù số lượng mẫu kiểm tra với lợn khỏe mạnh chưa nhiều nhưng kết quả này sẽ rất có ý nghĩa trong nghiên cứu tiếp theo về PCV2 và PCVAD ở đàn lợn nuôi tại Việt Nam, đặc biệt trong công tác chẩn đoán và phòng chống bệnh. Trong thực tế, lợn khỏe mạnh hoặc lợn có triệu chứng đều có thể bị nhiễm PCV2 tại một thời điểm nào đó trong quá trình sống, vì vậy có thể lợn khỏe cũng cho kết quả PCR dương tính. Tomás và cộng sự (2008) cho rằng PCV2 là điều kiện cần, cùng với các tác nhân gây nhiễm khác và điều kiện ngoại cảnh để gây thành bệnh PCVAD; khi chẩn đoán cần kết hợp giữa kết quả PCR và biểu hiện triệu chứng của lợn để khẳng định. Tuy nhiên, với kết quả kiểm tra sự hiện diện của PCV2 trong phủ tạng của lợn có triệu chứng của PCVAD như đã trình bày ở trên cho phép khẳng định sự lưu hành của PCV2 và PCVAD ở đàn lợn nuôi tại 4 tỉnh.

3.3. Kết quả xác định genotype của các chủng PCV2 lưu hành

Trong nghiên cứu về sự lưu hành của PCV2 và bệnh do PCV2 gây ra, việc xác định genotype của virut đặc biệt có ý nghĩa về mặt dịch tễ học. Đặc biệt, nhiều kết quả nghiên cứu đang dần làm sáng tỏ vai trò của PCV2b trong hội chứng PCVAD và cho rằng genotype 2b có độc lực cao hơn so với genotype 2a (Opriessnig, 2006). Kết quả xác định genotype của 148 mẫu bệnh phẩm dương tính với PCV2 bằng cặp mồi VF2/VR2 trong nghiên cứu này được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả xác định genotype PCV2 lưu hành ở đàn lợn nuôi tại 4 tỉnh

TT	Địa điểm	Huyết thanh			Phủ tạng		
		Số mẫu dương tính	Genotype 2a	Genotype 2b	Số mẫu dương tính	Genotype 2a	Genotype 2b
1	Hà Nội	4	0/4	4/4	14	0/14	14/14
2	Hòa Bình	43	0/43	43/43	5	0/5	5/5
3	Bắc Giang	10	0/10	10/10	25	0/25	25/25
4	Hải Dương	26	0/26	26/26	21	0/21	21/21
Tổng hợp		83	0/83	83/83	65	0/65	65/65

Kết quả định type cho thấy trong tổng số 148 mẫu được xét nghiệm, chỉ xác định được sự lưu hành của PCV2b, genotype lưu hành phổ biến nhất trên thế giới cũng như trong khu vực (Dupont và cộng sự, 2008; Cortey và cộng sự, 2010). Kết quả giám định genotype kể trên đã được khẳng định lại thông qua kết quả giải trình tự toàn bộ bộ gen của virut (kết quả không trình bày). Theo đó, chỉ xác định được motif đặc trưng của genotype

2b ở vị trí nucleotid 1469-1479 là CG/GGG/GTT/T_GA hoặc AG/GGG/GTT/T_GA (Cheung và cộng sự, 2007). Trên cơ sở đó, chúng tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu chi rõ các cluster của PCV2 lưu hành; so sánh trình tự nucleotide, amino acid giữa các chủng PCV2 của Việt Nam và các chủng lưu hành trên thế giới, giúp tìm ra nguồn gốc cũng như sự biến đổi của PCV2 ở đàn lợn nuôi tại Việt Nam.

IV. KẾT LUẬN

Ứng dụng kỹ thuật Nested PCR đã xác định được sự có mặt của PCV2 trong bệnh phẩm của lợn được nuôi tại 4 tỉnh Hà Nội, Hòa Bình, Bắc Giang và Hải Dương, theo đó:

- Tỷ lệ dương tính PCV2 có sự khác nhau giữa các địa phương, trong đó cao nhất là trong phủ tạng của lợn thu thập từ Bắc Giang (71,43%) và Hải Dương (70,00%),
- Với các mẫu phủ tạng được kiểm tra, chỉ phát hiện được PCV2 ở lợn có các triệu chứng của PCVAD với tỷ lệ 54,17%,
- Các chủng PCV2 lưu hành ở đàn lợn thuộc 4 tỉnh trong phạm vi nghiên cứu đều thuộc genotype PCV2b.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen, Q. X., J. X. Ye, J. Y. Zhou, T. F. Chen, H. G. Shen, and S. B. Shang. 2007. Serological survey of serum antibodies against porcine circovirus type 2 (PCV2) in swine, chicken, duck, goat and cattle from Zhejiang province, China. *Revue Méd. Vét* **8-9**:458-462.
2. Cheung, A. K., K. M. Lager, O. I. Kohutyuk, A. L. Vincent, S. C. Henry, R. B. Baker, R. Rowland, and A. G. Dunham. 2007. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Archives of Virology* **152**:1035-1044.
3. Cortey, M., E. Pileri, M. Sibila, J. Pujols, M. Balasch, J. Plana, and J. Segales. 2010. Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. *Vet J doi:10.1016/j.tvjl.2009.12.023*
4. Dupont, K., E. O. Nielsen, P. Bækbo, and L. E. Larsen. 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Veterinary Microbiology* **128**:56-64..
5. Gillespie, J., T. Opriessnig, X. J. Meng, K. Pelzer, and V. Buechner-Maxwell. 2009. Porcine Circovirus Type 2 and Porcine Circovirus-Associated Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **23**:1151-1163.
6. Nguyễn Thị Thu Hồng, Lê Thị Thu Phương, Đặng Hùng, Nguyễn Tiến Hà, Nguyễn Ngọc Hải, Chris. J. Morrissy, Darren Schfer. 2008. Phân tích di truyền circovirus lợn typ 2 (PCV2) trên lợn tại khu vực Nam Bộ. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, tập XV, số 2, tr. 5 – 12.
7. Hinton, D. 2003. Intimate Relationships between Host and Pathogen & a Close-up on Asia. 1st APVS, Seoul, Korea.
8. Jaganathan, S., O. Toung, P. Yee, T. Yew, C. Yoon, and L. Keong. 2011. Genetic characterization of Porcine circovirus 2 found in Malaysia. *Virology Journal* **8**:437.
9. Jantafong, T., A. Boonsoongnorn, P. Poolperm, K. Urairong, C. Lekcharoensuk, and P. Lekcharoensuk. 2011. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 in piglets from PMWS-affected and -negative farms in Thailand. *Virology Journal* **8**:88.
10. Olvera, A., M. Cortey, and J. Segales. 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* **357**:175-185.

11. Opriessnig, T., X. J. Meng, and P. G. Halbur. 2007. Porcine Circovirus Type 2 associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* **19**:591-615.
12. Rovira, A., M. Balasch, J. Segalés, L. García, J. Plana-Durán, C. Rosell, H. Ellerbrok, A. Mankertz, and M. Domingo. 2002. Experimental Inoculation of Conventional Pigs with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus 2. *Journal of Virology* **76**:3232-3239.20.
13. Tomás, A., Fernandes, L.T., Valero, O., Segalés, J., 2008. A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet. Microbiol.* *132* (3–4), 260–273.