

Nghiên cứu khoa học

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ GIẢI TRÌNH TỰ GEN VIRUS ĐẬU TRÊN DÊ Ở VIỆT NAM

*Nguyễn Thị Lan, Lại Thị Lan Hương, Nguyễn Thị Huyền,
Trương Quang Lâm, Nguyễn Thị Yến, Nguyễn Thị Hoa
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

TÓM TẮT

Nghiên cứu đã được tiến hành trên 90 con dê nghi mắc bệnh đậu, thu thập tại Ba Vì, Hà Nội, Ninh Bình, Hòa Bình và Nghệ An. Bằng phương pháp PCR với các mẫu dê thu thập để phát hiện virus đậu dê, đã phát hiện được 72 con dê dương tính với virus đậu, chiếm tỷ lệ 80%. Từ các mẫu dê dương tính, đã lấy những mẫu phổi hoặc mụn đậu rồi tiến hành phân lập virus đậu dê trên tế bào tinh hoàn cừu sơ cấp. Kết quả đã phân lập thành công 7 chủng virus đậu dê từ số lượng mẫu dê và địa điểm thu mẫu nêu trên. Nghiên cứu đặc tính sinh học của 7 chủng virus này, đã chọn ra được 5 chủng có hiệu giá cao, đó là GTPV-BV1, GTPV-HB1, GTPV-NA1, GTPV-NB1, GTPV-NB2, và đã tiến hành giải trình tự gen của chúng. Kết quả phân tích mức độ tương đồng về trình tự nucleotide và amino acid của 5 chủng nghiên cứu cho thấy mức tương đồng về trình tự nucleotide đạt 90,1% - 98,38% và mức tương đồng về trình tự amino acid đạt 81,1% - 95,99%. Kết quả phân tích cây sinh học phân tử cho thấy 5 chủng nghiên cứu thuộc cùng 1 nhánh phát sinh. Đáng chú ý là chủng phân lập GTPV-HB1 ở cùng nhánh với các chủng phân lập tại Trung Quốc, Mỹ và chủng vacxin AY077836/G20-LKV.

Từ khóa: đậu dê, PCR, phân lập, giải trình tự gen

Isolation and gene sequence analysis of goat pox virus in Viet Nam

*Nguyen Thi Lan, Lai Thi Lan Hương, Nguyen Thi Huyen,
Truong Quang Lam, Nguyen Thi Yen, Nguyen Thi Hoa*

SUMMARY

A total of ninety goats suspecting infection with goat pox disease were collected from Ba Vi - Ha Noi, Ninh Binh, Hoa Binh and Nghe An provinces for this study. By using polymerase chain reaction (PCR) technique for identifying the positive samples, 72 goats were found to be positive with goat pox virus, accounting for 80% of the total studied animals. The lung and pustule samples were collected from the positive goats for isolating goat pox virus in primary lamb testis cells. There were 7 different goat pox virus strains were successfully isolated. Based on biological properties, the 5 most virulent virus strains including GTPV-BV1, GTPV-HB1, GTPV-NA1, GTPV-NB1, GTPV-NB2 were selected and gene sequences of these virus strains were analysed. The identity/similarity level of amino acid and nucleotide sequences of 5 virus strains reached 81.1 to 95.99% and 90.1 to 98.38%, respectively. The result of phylogenetic analysis revealed that these strains belonged to the same genotype. Remarkably, the GTPV- HB1 isolate was classified into sub-lineage which closely related with goat pox virus strains from China, America and vaccine strain AY077836/G20-LKV.

Keywords: goat pox, PCR, isolation, gene sequence.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, ngành nông nghiệp nói chung và ngành chăn nuôi thú y nói riêng đã có những chuyển biến rõ rệt. Chăn nuôi dê tiếp tục phát triển và đóng vai trò ngày càng quan trọng. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã đưa ra mục tiêu phát triển tổng đàn dê, cừu giai đoạn 2010 - 2020 như sau: tổng đàn dê, cừu đạt 1,52 triệu con năm 2006; 1,89 triệu con năm 2008; 2,24 triệu con năm 2010; phấn đấu đạt 3,18 triệu con năm 2015 và 3,89 triệu con năm 2020. Tỷ lệ dê lai các loại là 40% năm 2006, 45% năm 2010; phấn đấu đạt tỷ lệ 50% năm 2015 và 60% năm 2020. Sản lượng thịt đạt 10,67 nghìn tấn năm 2006; 16,23 nghìn tấn năm 2010; phấn đấu đạt 24,98 nghìn tấn năm 2015 và 32,73 nghìn tấn năm 2020. Chăn nuôi dê, cừu cần ít vốn, quay vòng vốn nhanh, tận dụng được lao động do kỹ thuật chăn nuôi không quá phức tạp, phù hợp với trình độ của người chăn nuôi ở các vùng và điều kiện tự nhiên ở mọi vùng sinh thái. Phát triển chăn nuôi dê là định hướng hợp lý cho phát triển chăn nuôi của nông dân nghèo. Khuyến khích chăn nuôi gia súc nhai lại nhỏ là cuộc cách mạng thích hợp để giải quyết các vấn đề đói nghèo trong nông thôn hơn các chương trình phát triển đại gia súc khác (Lê Đình Cường, 1997).

Tuy nhiên, tình hình dịch bệnh ở dê vẫn còn diễn ra hết sức phức tạp với nhiều bệnh như bệnh viêm loét miệng truyền nhiễm, bệnh viêm mắt truyền nhiễm, bệnh viêm phổi, bệnh tụ huyết trùng, bệnh đậu dê. Trong đó bệnh đậu dê là một bệnh truyền nhiễm cấp tính cho dê, cừu với đặc trưng lây lan nhanh trên diện rộng và có tỷ lệ chết cao.

Bệnh đậu dê, cừu (sheep and goat pox - SGPX) là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, xảy ra ở dê và cừu ở tất cả các lứa tuổi, mọi giống, trên cả con đực và con cái, được Tổ chức Thú y thế giới (OIE) xếp trong bảng A các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm (OIE, 1999; OIE, 2010). Theo Pháp lệnh Thú y Việt Nam, bệnh này được xếp

trong danh mục các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm phải được công bố bệnh dịch nguy hiểm.

Ở Việt Nam, các công trình nghiên cứu về bệnh đậu dê chủ yếu tập trung về dịch tễ học và chẩn đoán xác định virus gây bệnh từ các ổ dịch, có rất ít công trình nghiên cứu về phân lập virus, giải trình tự gen virus đậu dê.

Xuất phát từ thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu phân lập và giải trình tự gen virus đậu trên dê ở Việt Nam, với mong muốn tạo được chủng giống virus đậu dê làm tiền đề cho việc phát triển sản xuất vacxin phòng bệnh đậu trên dê từ chính chủng virus đậu dê phân lập tại Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu bệnh phẩm dê nghi mắc bệnh đậu thu thập được tại Ba Vì – Hà Nội, Ninh Bình, Nghệ An, Hòa Bình.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu thập mẫu dựa vào quan sát triệu chứng lâm sàng

Để thu thập được mẫu xác định các triệu chứng lâm sàng chủ yếu của dê mắc bệnh đậu: gầy sút, sốt cao trên 40°C, đi lại khó khăn, bị loét ở niêm mạc lợi, lưỡi, mụn nước ở môi, mép, chảy nhiều rớt dãi lẫn nhiều bọt và có mùi hôi khó chịu, chúng tôi tiến hành quan sát các biến đổi ở vùng da mỏng như mép, bụng, bẹn, mắt, chân, tim và thu thập nốt đậu, đồng thời tiến hành mổ khám quan sát bệnh tích đại thể, thu thập phổi, các nốt sần trên ruột, phổi, gan. Mẫu được bảo quản ở -80°C phục vụ nghiên cứu.

2.2.2. Phương pháp tách chiết DNA

Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ mẫu máu và bệnh phẩm theo bộ kit DNeasy Blood & Tissue của QIAGEN (Đức).

2.2.3. Phương pháp PCR

Mẫu DNA sau khi tách chiết sẽ được hỗn hợp với các thành phần được trình bày ở bảng sau:

Bảng 1. Cặp mồi được sử dụng cho phản ứng PCR (Mangana-Vougiouka et al., 2000)

Trình tự mồi	Band
GTP VF1: AGA AAC GAG GTC TCG AAG CA GTP VR1: GGA GGT TGC TGG AAA TGT GT	289bp

Tiến hành phản ứng khuếch đại sản phẩm trong máy PCR theo chu kỳ nhiệt sau:

Bảng 2. Thành phần và thể tích cho phản ứng PCR

TT	Hóa chất	Thể tích (μl)
1	Go taq green master mix	12,5
2	Primer Forwad	0,5
3	Primer Reverse	0,5
4	Nước	6,5
5	Mẫu DNA	5,0
Tổng thể tích		25

Sau đó điện di để kiểm tra sản phẩm PCR trên máy chụp ảnh gel.

Bảng 3. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

Giai đoạn	Bước tổng hợp	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kì
1	Duỗi mạch	95	2 phút	1
2	Duỗi mạch	95	1 phút	35
	Gắn mồi	55	1 phút	
	Tổng hợp sợi mới	72	1 phút	
3	Hoàn chỉnh	72	10 phút	1
4	Giữ sản phẩm	4	10 phút	1

2.2.4. Phương pháp phân lập virus đậu dê trên tế bào tinh hoàn cừu sơ cấp

Tế bào tinh hoàn cừu sơ cấp được chuẩn bị ở bình T25, nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung 5% FCS (Fetal calf serum). Khi mật độ tế bào đạt 70% đến 80% diện tích đáy bình thì tiến hành phân lập virus. Các mẫu thu thập được xử lý phù hợp, gây nhiễm vào bình tế bào đã chuẩn bị, hàng ngày theo dõi sự phá hủy tế bào bằng

kính hiển vi soi nổi và thu virus khi tế bào bị phá hủy khoảng 80% - 90% diện tích đáy của bình nuôi cấy, hỗn dịch virus được bảo quản ở -80°C.

2.2.5. Phương pháp giải trình tự gen virus đậu dê

Quá trình thực hiện giải trình tự bao gồm các bước sau:

Phản ứng PCR sequencing: Chuẩn bị phản ứng trong ống PCR 0,2ml theo bảng sau:

Trình tự môi cho giải trình tự:

Môi xuôi: GTP VF1: AGA AAC GAG GTC TCC AAG CA

Môi ngược: GTP VR1: GGA GGT TGC TGG AAA TGT GT

Bảng 4. Thành phần phản ứng PCR giải trình tự

Thành phần	Thể tích cho 1 phản ứng (µl)
DTCS Quick Start Master Mix	8,0
DNA	7
Primer	0,2
dH ₂ O	4,8
Tổng thể tích	20

Với chương trình chạy PCR giải trình tự sau:

Bảng 5. Chương trình chạy PCR giải trình tự

Bước tổng hợp	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
Biến tính chuỗi DNA	96°C	20 giây	30 chu kỳ
Gắn môi	50°C	20 giây	
Kéo dài chuỗi DNA	60°C	4 phút	
Giữ sản phẩm ở 4°C			

Tinh sạch sản phẩm PCR giải trình tự:

Sản phẩm của phản ứng PCR sequence sẽ được tinh sạch bằng Ethanol kèm theo hóa chất và hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất (Beckman Coulter-Mỹ).

Sản phẩm sau khi tinh sạch được chuyển vào đĩa chạy mẫu để tiến hành giải trình tự.

2.2.6. Phương pháp xây dựng cây sinh học phân tử

Phân tích xác nhận chuỗi gen thu được qua chương trình Blast trên ngân hàng gen (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Truy cập ngân hàng gen, thu nhận và xác định tính tương đồng về nucleotide của các chuỗi gen tương ứng của virus với các phân đoạn gen thu được trong nghiên cứu. Xác định nguồn gốc phả hệ phát sinh chủng loại trên cơ sở trình tự gen của chủng virus thu nhận bằng phần mềm

Genetyx (version 5.0.4) và MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu thập mẫu bệnh phẩm nghi mắc bệnh đậu trên dê ở phía Bắc Việt Nam

Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi dựa vào các triệu chứng lâm sàng đã được xác định ở nội dung nghiên cứu trước, tiến hành thu thập các mẫu dê nghi mắc bệnh đậu ở các vùng có dịch bệnh, kết quả được trình bày tại bảng 6.

Các dê nghi mắc bệnh đậu được lấy mẫu đều có triệu chứng: sốt 40 - 42,5°C, gầy sút, ủ rũ, có mụn đậu nổi cộm trên da, mắt có nhiều dử, xuất hiện mụn nước trên môi, mép; chảy nhiều nước mũi, rớt dãi lẫn nhiều bọt, có mùi hôi khó chịu; bỏ ăn, có vết loét trên da, phía dưới tổ chức có phủ lớp keo bựa màu vàng.

Bảng 6. Kết quả thu mẫu dê tại các địa phương (n = 90)

Địa phương	n	Ký hiệu	Triệu chứng lâm sàng
Ba Vì – Hà Nội	15	GTPV-BV từ 1 đến 15	Mụn đậu nổi cộm trên da, môi, mép; ủ rũ, kém ăn.
Hòa Bình	25	GTPV-HB từ 1 đến 25	Vết loét trên da, chảy nhiều nước mũi, bóc vảy ra thấy dưới lớp tổ chức phủ keo bựa vàng.
Ninh Bình	27	GTPV-NB từ 1 đến 27	Gầy sút, sốt cao trên 40°C, đi lại khó khăn, bị loét ở niêm mạc lợi, lưỡi.
Nghệ An	23	GTPV-NA từ 1 đến 23	Gầy yếu, ủ rũ, lông xơ xác, kém ăn, gầy sút, mụn nước ở môi, mép, chảy nhiều rớt dài lẫn nhiều bọt và có mùi hôi khó chịu.

Mỗi dê nghiên cứu được lấy 2 mẫu: mẫu mụn đậu trên da và mẫu phổi để tiến hành tách chiết DNA và chạy PCR.

Kết quả phát hiện sự có mặt virus đậu dê bằng phương pháp PCR được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Kết quả phát hiện virus gây bệnh đậu trên dê bằng kỹ thuật PCR

Địa phương	Số dê thu mẫu	Số dê dương tính	Tỷ lệ %
Ba Vì – Hà Nội	15	12	80
Hòa Bình	25	20	80
Ninh Bình	27	22	81,5
Nghệ An	23	18	78
Tổng	90	72	80

Qua bảng kết quả cho thấy trong tổng số 90 dê thu thập tại 4 tỉnh khác nhau, đã phát hiện được 72 ca bệnh dương tính, chiếm 80% tổng số mẫu thu thập được. Tỷ lệ dương tính đối với virus đậu dê trong nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với báo cáo của Kamran và cộng sự (2015), các tác giả này cho thấy tỷ lệ nhiễm bệnh trong vụ dịch trên dê ở Iran dao động trong khoảng 75 đến 100%.

Kết quả này cũng phù hợp với tỷ lệ nhiễm bệnh đã được công bố bởi chương trình quản lý bệnh đậu trên dê tại Ethiopia năm 2008 (70 – 90%). Đồng thời, kết quả khảo sát bệnh tại Australia cho thấy tỷ lệ nhiễm bệnh vào khoảng trên dưới 50%, tuy nhiên đối với dê non, tỷ lệ nhiễm bệnh có thể lên tới 100%.

3.2. Kết quả phân lập virus đậu dê

Trên cơ sở kết quả của phản ứng PCR đối với

72 mẫu bệnh phẩm có kết quả dương tính với virus đậu dê, chúng tôi chọn ra 7 mẫu phổi hoặc mụn đậu đại diện cho các tỉnh nghiên cứu để phân lập virus. Kết quả phân lập virus thu được trình bày ở bảng 8.

Từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 9, các giếng tế bào gây nhiễm chưa xuất hiện bệnh lý tế bào. Tại thời điểm ngày thứ 10, cả 7 chủng virus gây nhiễm có bệnh tích tế bào đặc trưng: Các giếng tế bào có bệnh tích tế bào quan sát dưới kính hiển vi soi ngược thấy có nhiều đám tế bào co cụm lại với nhau, sau đó nguyên sinh chất tế bào có dấu hiệu co rút, tế bào co lại thành méo mó. Ở giai đoạn tiếp theo, nhân bị đẩy ra ngoài, nhiều đám tế bào chét dồn lại với nhau thành từng cụm. Lúc đầu bệnh tích tế bào chỉ xuất hiện ở một vài chỗ, 14 ngày sau gây nhiễm, bệnh tích tế bào lan rộng ra và phủ trên toàn bộ thảm tế bào.

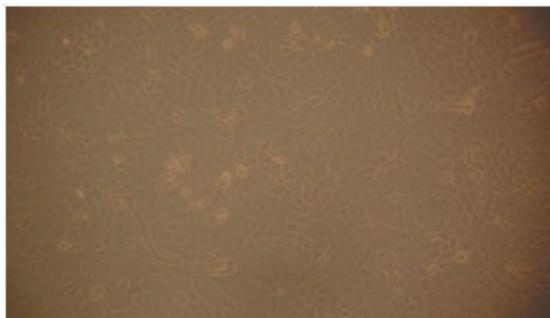
Bảng 8. Kết quả phân lập virus đậu dê trên môi trường tế bào tinh hoàn cừu sơ cấp

Tên mẫu (chủng virus)	Địa điểm lấy mẫu	Cơ quan phân lập	Thời điểm xuất hiện CPE (ngày)	Thời điểm CPE đạt 100% (ngày)	Số giếng có bệnh tích/ Số giếng kiểm tra
GTPV-BV1	Ba Vì-Hà Nội	Mụn đậu	10	14	3/3
GTPV-HB1	Hòa Bình	Phổi	10	14	3/3
GTPV-HB2	Hòa Bình	Mụn đậu	10	14	3/3
GTPV-NA1	Nghệ An	Phổi	10	14	3/3
GTPV-NB1	Ninh Bình	Phổi	10	14	3/3
GTPV-NB2	Ninh Bình	Mụn đậu	10	14	3/3
GTPV-NB3	Ninh Bình	Phổi	10	14	3/3

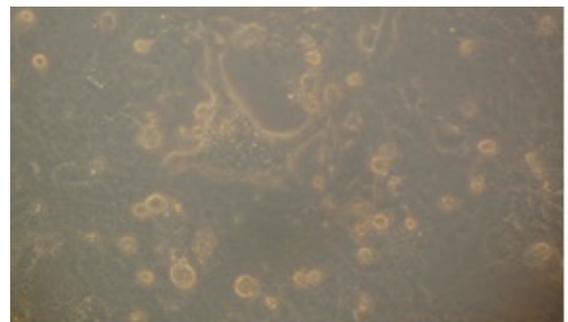
Như vậy, tế bào tinh hoàn cừu sơ cấp có tính cảm thụ cao với virus đậu dê, sử dụng có hiệu quả trong lần phân lập đầu tiên.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Ramisse và cs (1978);

Ramesh (1980); Bhanuprakash và cs (2003), các tác giả này đều cho rằng các chủng virus đậu dê phân lập trên tế bào tinh hoàn cừu dễ thích ứng ngay ở lần gây nhiễm đầu tiên và gây bệnh tích tế bào đặc trưng.



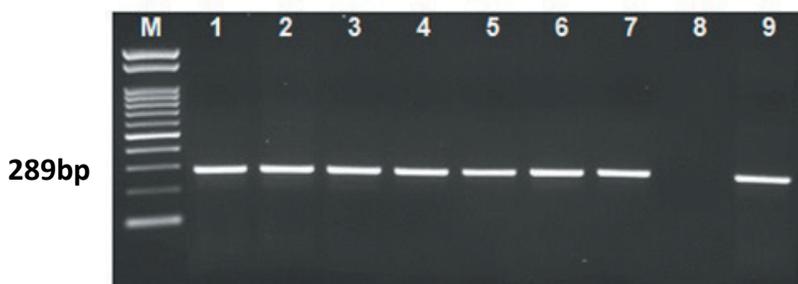
Hình 1. Tế bào tinh hoàn cừu bình thường



Hình 2. Bệnh tích tế bào tinh hoàn cừu do virus đậu dê gây ra (sau gây nhiễm 12 ngày)

Để khẳng định chắc chắn virus phân lập được là virus gây bệnh đậu trên dê, chúng tôi

tiến hành làm phản ứng PCR giám định kết quả phân lập, kết quả thu được như sau:



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR giám định kết quả phân lập (Thang chuẩn Marker- M:100bp; giếng từ 1 đến 7 là mẫu phổi và mụn đậu của 7 chủng đậu dê phân lập được; giếng 8 là đối chứng âm; giếng 9 là đối chứng dương).

Kết quả điện di kiểm tra đối với các chủng virus phân lập trên tế bào tinh hoàn cừu cho thấy cả 7 chủng virus phân lập đều cho kết quả PCR dương tính với virus đậu dê bằng cặp mồi GTPVF1 - GTPVR1 cho sản phẩm PCR có độ dài đoạn gen là 289bp. Như vậy,

chúng tôi đã thành công trong việc phân lập virus đậu dê trên môi trường tế bào tinh hoàn cừu sơ cấp. Để nghiên cứu giải trình tự gen virus đậu dê, tiến hành đo hiệu giá 7 chủng virus đã phân lập, kết quả thu được 5 chủng có hiệu giá cao, thể hiện ở bảng 9.

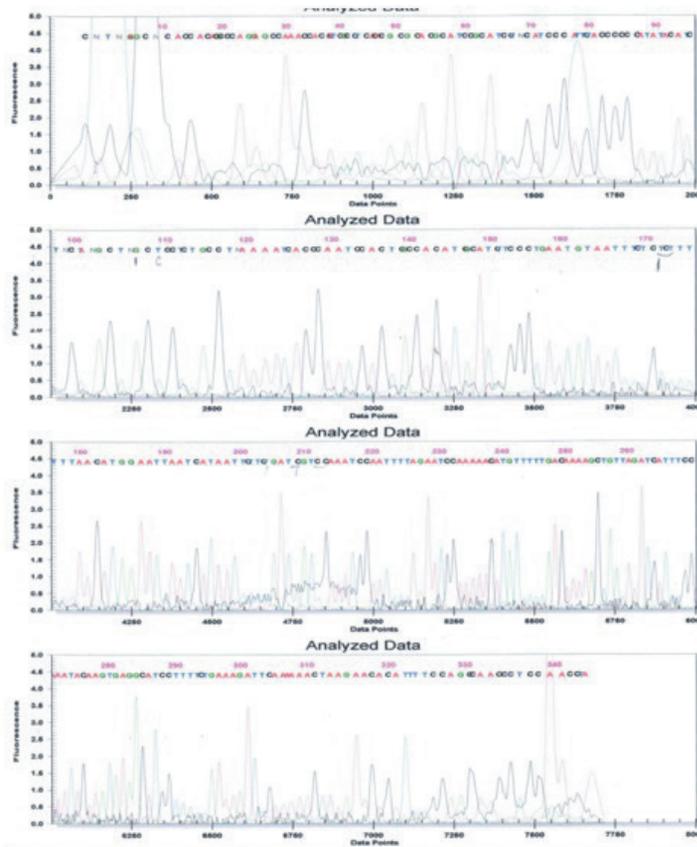
Bảng 9. Hồ sơ 5 chủng virus đậu dê nghiên cứu

Chủng virus	Địa phương	Cơ quan phân lập	Hiệu giá virus (TCID ₅₀ /ml)
GTPV-BV1	Ba Vì – Hà Nội	Mụn đậu	1,36x10 ⁵
GTPV-HB1	Hòa Bình	Phổi	1,36x10 ⁴
GTPV-NA1	Nghệ An	Phổi	6,32x10 ⁴
GTPV-NB1	Ninh Bình	Phổi	2,94x10 ⁵
GTPV-NB2	Ninh Bình	Mụn đậu	2,94x10 ⁴

3.3. Nghiên cứu đặc tính sinh học phân tử của các chủng virus đậu dê

trình tự đoạn gen của virus đậu dê từ 5 chủng virus phân lập được, chúng tôi tiến hành phân tích kết quả giải trình tự gen và thu được tín hiệu giải trình tự gen, được trình bày ở hình 4.

Sau khi sử dụng cặp mồi đặc hiệu để giải



Hình 4. Tín hiệu giải trình tự gen của chủng virus GTPV-NB1

Kết quả so sánh trình tự nucleotide giữa 5 chủng virus đậu dê được trình bày ở hình 5.

```

AY077836 (USA_2006) .txt 1:AGAAACGAGGTCTCGAAGCAATACCAACACTTTCACAGAAGAACAAGTTGGAGATGATT 60
GTPVBV1 1:AGAAACGAGGTCTCGAAGCAATACCAACACTTTCATAGAAGAACAAGTTGGAGATGATT 60
GTPVHB1 1:AGAAACGAGGTCTCGAAGCAATACCAACACTTTCACAGAAGAACAAGTTGGAGATGATT 60
GTPVNA1 1:AGAAACGAGGTCTCGAAGCAATACCATCACTTTCATAGAAGACCAAGTTGGAGATGATT 60
GTPVNB1 1:AGAAACGAGGTCTCGAAGCAATACCAACACTTTCATAGAAGTACAAGTTGGAGATGTTAC 60
GTPVNB2 1:AGAAACGAGGTCTCGAAGCAATACCAACACTTTCATAGAAGTACAAGAAGGAGATATGCC 60
*****

AY077836 (USA_2006) .txt 61:ACCACCCCAATATTCTGCTGCTCTTGCTAAAATACCAATCACTGCACATGATTCCCTAAT 120
GTPVBV1 61:TCCACCCCAATATTCTGCTGCTCTTGCTAAAATCCAATCACTGCACATGATTCCCTAAT 120
GTPVHB1 61:ACCACCCCAATATTCTGCTGCTCTTGCTAAAATACCAATCACTGCACATGATTCCCTAAT 120
GTPVNA1 61:TCCACCCCAATATTCTGCTGCTCTTGCTAAAATCCAATCACTGCACATGATTCCCTAAT 120
GTPVNB1 61:TCCACCCCAATATTCTGCTGCTCTTGCTCGAATCCAATCACTGCACATGATTCCCTCGT 120
GTPVNB2 61:TCCACCCCAACATTCTGCTGCTCTTGCTCGAATCCAATCACTGCACATGATTCCCTCGT 120
**.*

AY077836 (USA_2006) .txt 121:GTAATTTTCTTTTTTAAACATGGAATTAATCATAATTTTGATTGTTCAAATCCAATTTT 180
GTPVBV1 121:GTGATTTTCTTTTTTAAACATGGAATTAATCATAATTTTGATTGTTCAAATCCAATTTT 180
GTPVHB1 121:GTAATTTTCTTTTTTAAACATGGAATTAATCATAATTTTGATTGTTCAAATCCAATTTT 180
GTPVNA1 121:GTGATTTTCTTTTTTAAACATGGAATTAATCATAATTTTGATTGTTCAAATCCAATTTT 180
GTPVNB1 121:GTGATTTTCTTTTTTTCGCATGGAATTCGTCATCGTTTTTGATTGTTCAAATCCAATTTT 180
GTPVNB2 121:GTGATTTTCTTTTTTTCGCATGGAATTCGTCATCGTTTTTGATTGTTCAAATCCAATTTT 180
**.*

AY077836 (USA_2006) .txt 181:AGAATCCAAAACATGTTTTGACAAAAGCTGTTAGATCATTCCAAATACAAGTGAGGC 240
GTPVBV1 181:AGAATCCAAAACATGTTTTGACAAAAGCTGTTAGATCATTCCAAATACAAGTGAGGC 240
GTPVHB1 181:AGAATCCAAAACATGTTTTGACAAAAGCTGTTAGATCATTCCAAATACAAGTGAGGC 240
GTPVNA1 181:AGAATCCAAAACATGTTTTGACAAAAGCTGTTAGATCATTCCAAATACAAGTGAGGC 240
GTPVNB1 181:AGAATCCAAAACATGTTTTGACAAAAGCTGTTAGATCATTCCAAATACAAGTGAGGC 240
GTPVNB2 181:AGAATCCAAAACATGTTTTGACAAAAGCTGTTAGATCATTCCAAATACAAGTGAGGC 240
*****

AY077836 (USA_2006) .txt 241:ATCCTTTT 249
GTPVBV1 241:ATCCTTTT 249
GTPVHB1 241:ATCCTTTT 249
GTPVNA1 241:ATCCTTTT 249
GTPVNB1 241:ATCCTTTT 249
GTPVNB2 241:ATCCTTTT 249
*****
    
```

Hình 5. Kết quả so sánh trình tự gen mã hóa hypothetical protein của 5 chủng virus đậu dê
 Ghi chú: * là giống nhau; . là khác nhau

Kết quả so sánh trình tự đoạn gen mã hóa protein của 5 chủng virus đậu dê cho thấy có 27 vị trí sai khác về nucleotide, giữa 2 chủng GTPV-NA1 và chủng GTPV-NB2 có sự sai khác về nucleotide lớn nhất (24 vị trí), tiếp theo là chủng GTPV-HB1 và GTPV-NB2 (23 vị trí);

ít vị trí sai khác nhất thuộc về 2 chủng GTPV-BV1 và GTPV-NA1 có 4 vị trí: 27 (A-T), 31 (C-T), 43 (A-C), 64 (A-C).

Kết quả so sánh mức độ tương đồng về nucleotide và amino acid của 5 chủng virus nghiên cứu được tổng hợp ở bảng 10 và 11.

Bảng 10. Kết quả so sánh sự tương đồng về nucleotide

Chủng	GTPV-BV1	GTPV-HB1	GTPV-NA1	GTPV-NB1	GTPV-NB2
GTPV-BV1	100,00				
GTPV-HB1	97,96	100,00			
GTPV-NA1	98,38	97,13	100,00		
GTPV-NB1	93,70	91,47	91,93	100,00	
GTPV-NB2	92,38	90,10	90,58	96,7	100,00

Qua bảng 10 cho thấy mức độ tương đồng về trình tự nucleotide giữa 5 chủng nghiên cứu đạt 90,1% - 98,38%, trong đó, chủng GTPV-NA1 và chủng GTPV-BV1 có mức độ tương đồng

lớn nhất (98,38%), tiếp theo là chủng GTPV-HB1 và chủng GTPV-BV1 (97,96%), mức độ tương đồng về nucleotide thấp nhất ở 2 chủng GTPV-NB2 và GTPV-HB1.

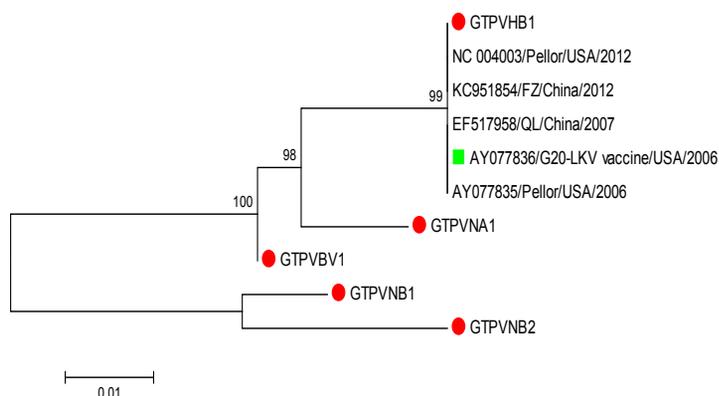
Bảng 11. Kết quả so sánh sự tương đồng về amino acid

Chủng	GTPV-BV1	GTPV-HB1	GTPV-NA1	GTPV-NB1	GTPV-NB2
GTPV-BV1	100,00				
GTPV-HB1	95,99	100,00			
GTPV-NA1	94,53	93,09	100,00		
GTPV-NB1	90,95	86,26	84,38	100,00	
GTPV-NB2	87,86	83,08	81,10	92,94	100,00

Qua bảng 11 cho thấy mức độ tương đồng về trình tự amino acid giữa 5 chủng nghiên cứu là 81,1% - 95,99%. Mức độ tương đồng thấp nhất ở 2 chủng GTPV-NB2 và GTPV-NA1, 2 chủng GTPV-HB1 và GTPV-BV1 có mức độ tương đồng cao nhất (95,99%), tiếp đến là 2 chủng GTPV-NA1 và GTPV-BV1 (94,53%).

Sau khi so sánh mức độ tương đồng về

nucleotide và amino acid giữa các chủng nghiên cứu, dựa vào phần mềm MEGA 6, chúng tôi tiến hành xây dựng cây sinh học phân tử để xác định và phân tích nguồn gốc phát sinh của các chủng đậu dê nghiên cứu với việc sử dụng các chủng virus đậu dê tham chiếu. Kết quả phân tích nguồn gốc phát sinh của các chủng đậu dê nghiên cứu dựa trên sự sai khác nucleotide được thể hiện tại hình 6.



Hình 6. Cây sinh học phân tử dựa trên trình tự nucleotide của các chủng virus đậu dê nghiên cứu

Qua phân tích kết quả cây sinh học phân tử cho thấy:

+ Chủng GTPV-HB1 nằm trong cùng 1 nhánh với các chủng phân lập trước đây của Trung Quốc, Mỹ, chủng vaccin AY077836/

G20-LKV.

+ Chủng GTPV-NA1 và GTPV-BV1 cùng trong 1 nhánh.

+ 2 chủng GTPV-NB1 và GTPV-NB2 nằm trong 1 nhánh.

Kết quả cây sinh học phân tử cũng chỉ ra 5 chủng nghiên cứu thuộc cùng 1 nhánh phát sinh, đáng chú ý chủng GTPV-HB1 cùng nhánh với các chủng phân lập tại Trung Quốc, Mỹ và cùng nhánh với chủng vacxin AY077836/G20-LKV.

IV. KẾT LUẬN

- Đã thu thập được 90 dê nghi mắc bệnh đậu tại các tỉnh: Ba Vì – Hà Nội, Hòa Bình, Nghệ An, Ninh Bình; kiểm tra bằng phương pháp PCR cho thấy có 72 dê dương tính với virus đậu, chiếm 80%.

- Đã phân lập được 7 chủng virus đậu dê từ mẫu phổi, mụn đậu trên môi trường tế bào tinh hoàn cừu sơ cấp: GTPV-BV1; GTPV-HB1; GTPV-HB2; GTPV-NA1; GTPV-NB1; GTPV-NB2; GTPV-NB3.

- Bệnh tích tế bào (CPE) xuất hiện sau 10 ngày gây nhiễm, các tế bào co cụm lại với nhau, nguyên sinh chất co rút, tế bào co lại méo mó, nhân bị đẩy ra ngoài, đám tế bào chết dồn lại với nhau thành từng cụm. CPE đạt 100% sau 14 ngày gây nhiễm.

- Đoạn gen virus đậu dê được giải trình tự có độ dài 289bp, mức độ tương đồng về nucleotide giữa các chủng nghiên cứu là 90,1% đến 98,38%, mức độ tương đồng về amino acid là 81,1% đến 95,99% ; các chủng virus nghiên cứu thuộc cùng 1 nhánh phát sinh, cùng nhánh với các chủng phân lập tại Trung Quốc, Mỹ và chủng vacxin AY077836/G20-LKV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bhanuprakash V., Indrani B. K., Moorthy A. R. S., Krishnappa G. (2003), *Isolation, purification and comparison of protein profiles of sheep poxviruses*, Indian J Comp Microbiol Immunol Infect Dis, 24(1), pp. 15-20.
2. https://web.oie.int/eng/normes/MMANUAL/2008/pdf/2.07.14_S_POX_G_POX.pdf
3. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/SHEEP_GOAT_POX.pdf
4. <http://www.esgpi.org/PDF/Technical%20bulletin%20No.29.pdf>
5. Kamran Mirzaie, Seyed Mohammad Barani and Saied Bokaie. (2015). *A review of sheep pox and goat pox: perspective of their control and eradication in Iran*. J. Adv. Vet. Anim. Res., 2(4): 373-381.
6. Lê Đình Cường (1997), “*Hiện trạng và hướng phát triển của nghề nuôi dê, cừu ở Ninh Thuận*”, Tạp chí Người nuôi dê, 2 (2).
7. Mangana-Vougiouka O, et al. Mol Cell Probes. (2000), *Sheep poxvirus identification from clinical specimens by PCR, cell culture, immunofluorescence and agar gel immunoprecipitation assay*.
8. Ramesh K. G. (1980), *Immunological studies on the Ranipet strain of sheep poxvirus propagated in lamb testes cell culture*, MVSc Thesis. Uni Agric Sci, Bangalore, Karnataka, India.
9. Ramisse J., Asso J., Hassan A., Anane O., Jemli J. (1978), *Cell culture of sheep pox virus: application to vaccine production and testing of immunity*, Revue d’Elevage et de Med. Vet. des pays trop. 31, pp. 11-19.
10. Sheep and goat pox: Disease strategy. Australian veterinary emergency plan. 1996. <http://www.international-food-safety.com/pdf/ausvet-sheepgoatpox.pdf>
11. Sileshi Zewdie, Alemu Yami, R. C. Merkel and L. Dawson. (2009). *Sheep and goat pox: Causes, prevention and treatment. Technical bulletin No.29. ESGPIP – Ethiopia sheep and goat productivity improvement program*.
12. OIE (1999), *Bulletin de l'Office International des Epizooties, Paris, France, World Organization for Animal Health*.
13. OIE Manual (2000), *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4th ed.*

Ngày nhận 11-8-2017

Ngày phản biện 15-1-2018

Ngày đăng 1-5-2018