

PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN ORF2 CỦA PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) THU THẬP Ở MỘT SỐ TỈNH/THÀNH VIỆT NAM TRONG GIAI ĐOẠN TỪ 2007 ĐẾN 2016

Lê Thị Thu Phương¹, Nguyễn Ngọc Hải², Nguyễn Thị Thu Hồng¹, Quách Võ Ngôn¹, Nguyễn Ngọc Hồng Phúc¹, Trần Xuân Hạnh¹, Nguyễn Văn Dung¹

TÓM TẮT

Porcine circovirus type 2 (PCV2) là tác nhân liên quan đến nhiều bệnh, gây thiệt hại nghiêm trọng trong chăn nuôi heo. PCV2 có tốc độ thay thế nucleotide nhanh tạo điều kiện để virus tiến hóa và xuất hiện các genotype mới. Sự lưu hành và biến đổi của các genotype PCV2 ở Việt Nam được đánh giá qua việc giải trình tự nucleotide toàn bộ ORF2 của 48 chủng PCV2 phân lập thực địa từ 13 tỉnh/thành, Việt Nam trong giai đoạn từ năm 2007 đến năm 2016, phân tích cây di truyền và so sánh mức tương đồng với các chủng PCV2 tham khảo ở Việt Nam và trên thế giới. Kết quả phân tích cho thấy, có sự lưu hành đồng thời của các genotype PCV2b, PCV2d và nhóm tái tổ hợp, trong đó phổ biến nhất là PCV2b (24/48), cùng với sự xuất hiện và ngày càng phổ biến của PCV2d (16/48), đặc biệt là PCV2d2 (15/16). Các phân lập PCV2 xếp trong cùng genotype có mức độ tương đồng về nucleotide là khá cao, từ 98,7% - 100% đối với PCV2b, từ 98,5 - 100% đối với PCV2d2 và từ 98,7% đến 100% đối với nhóm PCV2 tái tổ hợp. Khoảng cách di truyền giữa các genotype là khá cao, biến động từ $0,0595 \pm 0,0096$ đến $0,0663 \pm 0,0102$. Ngoài ra, có sự biến đổi genotype theo thời gian xảy ra ở mức độ trang trại. Kết quả này góp phần làm rõ hơn về dịch tễ học của PCV2 ở Việt Nam.

Từ khóa: PCV2, ORF2, genotype, cây di truyền, Việt Nam.

Genetic characteristic analysis of ORF2 of Porcine circovirus type 2 (PCV2) in some provinces, Viet Nam, in the period 2007 - 2016

Le Thi Thu Phuong, Nguyen Ngoc Hai, Nguyen Thi Thu Hong, Quach Vo Ngon, Nguyen Ngoc Hong Phuc, Tran Xuan Hanh, Nguyen Van Dung

SUMMARY

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a causative agent relating to several porcine circovirus diseases - PCVDs, causing heavy economic losses in the swine industry. With a high nucleotide substitution rate, PCV2 continues to evolve and shift to novel genotypes. To determine the prevalence of PCV2 genotypes in Viet Nam, full-length of ORF2 of 48 PCV2 isolates collecting from 13 provinces in Viet Nam in the period from 2007 to 2016 was analysed to determine nucleotide sequence, build phylogenetic tree and compare to PCV2 strains that reported in Viet Nam and other countries. The analysed results showed that genotypes of PCV2b, PCV2d and recombinant cluster were co-existed and prevalent. Of which, the most common was PCV2b (24/48) and the emergence of PCV2d, especially PCV2d2 (15/16). The nucleotide similarity level of the PCV2 isolates classifying in the same genotype was relatively high, such as: 98.7% - 100% for PCV2b, 98.5 - 100% for PCV2d2 and 98.7 - 100% for recombinant cluster. Genetic divergence among the genotypes was also quite high ranging from 0.0595 ± 0.0096 to 0.0663 ± 0.0102 . Besides, genotype change by time had occurred at the farm level. These studied results contribute to further clarification of PCV2 epidemiology in Viet Nam.

Keywords: PCV2, ORF2, genotype, phylogenetic tree, Viet Nam.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Porcine circovirus type 2 (PCV2) thuộc giống *Circovirus*, họ *Circoviridae*, là một virus DNA sợi đơn dạng vòng kích thước nhỏ, khoảng 1,76 kb,

không có vỏ bọc. PCV2 liên quan đến một số bệnh trên heo, gọi chung là các bệnh do circovirus trên heo (Porcine circovirus diseases – PCVDs) (Segalés và ctv, 2012), trong đó quan trọng nhất là hội chứng còi

¹ Công ty CP Thuốc Thú y Trung ương NAVETCO

² Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

cọc trên heo sau cai sữa (postweaning multisystemic wasting syndrome - PMWS). PCV2 có cấu trúc bộ gen khá đơn giản, gồm 11 khung đọc mở (open reading frame – ORF) giả định (Hamel và ctv, 1998), trong đó ORF1 và ORF2 là hai khung đọc mở lớn nhất, mã hóa các protein tương ứng là Rep/Rep' cần thiết cho sự nhân lên của virus, và protein capsid (Cap), protein cấu trúc duy nhất của PCV2. Dựa vào kết quả phân tích bộ gen, các phân lập PCV2 được chia thành 5 genotype chính là PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d và PCV2e (Xiao và ctv, 2015; Davies và ctv, 2016). Riêng PCV2d còn được xếp thành 2 subgenotype, đó là PCV2d1 và PCV2d2 (Xiao và ctv, 2015). Ngoài ra, một số tác giả còn ghi nhận có sự hiện diện của nhóm PCV2 tái tổ hợp trong thực địa (Cai và ctv, 2012).

Nghiên cứu hồi cứu cho thấy PCV2 xuất hiện ở miền Nam Việt Nam từ năm 2000 hoặc sớm hơn (Nguyễn Thị Thu Hồng và ctv, 2006). PCV2 lưu hành ở Việt Nam thuộc genotype PCV2b, PCV2d và nhóm tái tổ hợp (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và ctv, 2012; Huỳnh Thị Mỹ Lệ và ctv, 2013; Nguyễn Ngọc Hải và ctv, 2013). Đến nay, các bệnh do circovirus trên heo, đặc biệt là hội chứng còi cọc trên heo sau cai sữa (PMWS), đã trở thành một trong những yếu tố gây thiệt hại kinh tế hàng đầu cho ngành chăn nuôi heo. Để đối phó với PMWS, nhiều trại đã áp dụng biện pháp tiêm phòng vaccin PCV2. Tuy nhiên, ở Việt Nam hiện nay chỉ lưu hành các loại vaccin thương mại ngoại nhập, được sản xuất chủ yếu dựa trên PCV2 thuộc genotype 2a. Takahagi và ctv (2010) cho rằng genotype của PCV2 có thể ảnh hưởng đến hiệu quả phòng PMWS bằng vaccin. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích trình tự toàn bộ gen ORF2 của 48 phân lập PCV2 thực địa thu thập từ năm 2007 đến năm 2016 ở một số tỉnh/thành phía Nam Việt Nam, xác định genotype PCV2 lưu hành ở Việt Nam làm cơ sở để chọn chủng PCV2 trong nghiên cứu vaccin phòng PMWS và các nghiên cứu đánh giá hiệu quả của vaccin trong việc phòng chống PMWS trên heo.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Bảng 1. Các phân lập PCV2 thu thập từ năm 2007 đến năm 2016 được giải trình tự gen ORF2 (sắp xếp theo năm lấy mẫu)

| STT | Ký hiệu mẫu | Nơi lấy mẫu | Năm thu thập mẫu | Loại heo | Triệu chứng lâm sàng |
|-----|---------------|-------------|------------------|-------------|----------------------|
| 1 | CaMau/2007 | Cà Mau | 2007 | Sau cai sữa | Mắc bệnh tai xanh |
| 2 | KhanhHoa/2007 | Khánh Hòa | 2007 | Sau cai sữa | Còi cọc |

2.1. Thu thập mẫu bệnh phẩm

Tổng cộng 48 mẫu bệnh phẩm heo dương tính DNA PCV2 được thu thập từ năm 2007-2016 ở 13 tỉnh/thành phía Nam Việt Nam được lưu trữ ở -70°C tại phòng thí nghiệm Trung tâm Nghiên cứu Thú y – NAVETCO (bảng 1), bao gồm: 10 mẫu huyết thanh và 19 mẫu hạch, 17 mẫu phổi, 1 mẫu lách và 1 mẫu cuống rốn. Các chủng PCV2 tham khảo: vietnam1/2002, vietnam2/2006, NAVET-vietnam3/2004 (có mã số Genbank JX506730) và vietnam5/2007 (Nguyễn Thị Thu Hồng và ctv, 2008) (bảng 2) và một chủng có nguồn gốc từ Úc ký hiệu là AAHL-strain (chủng PCV2 này được phòng thí nghiệm quốc gia Úc - Australian Animal Health Laboratory - cung cấp) được dùng trong nghiên cứu này.

2.2. Cập môi dùng phát hiện và giải trình tự ORF2

ORF2-PCV2 được khuếch đại và giải trình tự nucleotide bằng cặp mồi cap Fw 5'-CTT TTT TAT CAC TTC GTA ATG-3' và cap Rw 5'-CGC ACT TCT TTC GTT TTC-3' được tham khảo từ Fort và ctv (2007). Sản phẩm khuếch đại được giải trình tự có chiều dài 720 nucleotide. Các thành phần cho một phản ứng PCR bao gồm PCR buffer 1X, 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTPs, 0,5 μM mỗi đoạn mồi, 2,5 UI *Taq* DNA polymerase và 1 μl DNA khuôn mẫu/ 25 μl . Quy trình PCR: $94^{\circ}\text{C}/2$ phút, 35 chu kỳ (94°C 15 giây, 55°C 1 phút, 68°C 20 giây), 68°C 7 phút, giữ ở 4°C . Sản phẩm PCR được gửi giải trình tự nucleotide tại 1st BASE – Malaysia.

2.3. Phân tích trình tự và xây dựng cây di truyền

Trình tự chuỗi nucleotide gen ORF2 của các phân lập PCV2 thu thập được (bảng 1) và các phân lập PCV2 tham khảo (bảng 2) và các chủng PCV2 tham khảo từ GenBank được sắp xếp vào cột và so sánh tương đồng bằng phần mềm BioEdit version 7.2.5 (2013). Cây di truyền được thiết lập bằng phần mềm MEGA version 5.2.2 (2012) theo phương pháp Maximum Likelihood (ML) với bootstrap 1000 lần lặp lại.

| | | | | | |
|----|-----------------------|------------|------|-------------|--|
| 3 | CanTho/2008 | Cần Thơ | 2008 | Sau cai sữa | Không có dữ liệu |
| 4 | BinhDuong1/2009 | Bình Dương | 2009 | Sau cai sữa | Còi cọc |
| 5 | NAVET-BinhDuong2/2009 | | 2009 | Sau cai sữa | Còi cọc |
| 6 | BinhDuong3/2009 | | | Sau cai sữa | Còi cọc |
| 7 | BinhDuong4/2009 | | | Sau cai sữa | Còi cọc |
| 8 | BinhDuong5/2010 | | 2009 | Sau cai sữa | Không có dữ liệu |
| 9 | DongNai1/2009 | Đồng Nai | 2009 | 12 tuần | Mắc bệnh tai xanh, bệnh dịch tả heo |
| 10 | NAVET-DongNai2/2009 | | 2009 | 16 tuần | Còi cọc, khó thở, viêm da, da nhợt nhạt |
| 11 | TpHCM1/2010 | Tp. HCM | 2010 | Sau cai sữa | Mắc bệnh tai xanh, viêm da |
| 12 | TpHCM2/2010 | | 2010 | Sau cai sữa | Mắc bệnh tai xanh, viêm da |
| 13 | TpHCM3/2010 | | 2010 | Sau cai sữa | Mắc bệnh tai xanh, viêm da |
| 14 | TpHCM4/2010 | | 2010 | Sau cai sữa | Mắc bệnh tai xanh, viêm da |
| 15 | TpHCM5/2010 | | 2010 | Sau cai sữa | Mắc bệnh tai xanh, bệnh dịch tả heo |
| 16 | TpHCM6/2010 | | 2010 | Sau cai sữa | Triệu chứng hô hấp |
| 17 | TpHCM7/2010 | | 2010 | Sau cai sữa | Mắc bệnh tai xanh, bệnh dịch tả heo |
| 18 | DongNai3/2012 | Đồng Nai | 2012 | Sau cai sữa | Mắc bệnh tai xanh |
| 19 | BinhDuong6/2012 | Bình Dương | 2012 | 1 tuần tuổi | Gãy trơ xương, tiêu chảy nặng |
| 20 | LongAn1/2012 | Long An | 2012 | Sau cai sữa | Mắc bệnh tai xanh, viêm da |
| 21 | NAVET-LongAn2/2012 | | 2012 | Sau cai sữa | Mắc bệnh tai xanh, viêm da |
| 22 | LongAn3/2012 | | 2012 | Sau cai sữa | Mắc bệnh tai xanh, viêm da |
| 23 | BinhDinh1/2013 | Bình Định | 2013 | Thai | Thai sẩy |
| 24 | BinhDinh2/2013 | Bình Định | 2013 | Sau cai sữa | Không có dữ liệu |
| 25 | BinhDinh3/2013 | Bình Định | 2013 | Sau cai sữa | Không có dữ liệu |
| 26 | BinhDinh4/2013 | Bình Định | 2013 | Sau cai sữa | Không có dữ liệu |
| 27 | BinhDinh5/2013 | Bình Định | 2013 | Nái | Mắc bệnh tai xanh, sinh ra heo con chết |
| 28 | BinhDinh6/2013 | Bình Định | 2013 | Nái | Mắc bệnh tai xanh, sẩy thai |
| 29 | LamDong1/2013 | Lâm Đồng | 2013 | 12 tuần | Mắc bệnh tai xanh, viêm da |
| 30 | LamDong2/2013 | Lâm Đồng | 2013 | 12 tuần | Mắc bệnh tai xanh, viêm da |
| 31 | LamDong3/2013 | Lâm Đồng | 2013 | 12 tuần | Mắc bệnh tai xanh, viêm da |
| 32 | DongNai4/2013 | Đồng Nai | 2013 | 3 tuần | Mắc bệnh tai xanh, bệnh dịch tả heo |
| 33 | BinhDuong7/2013 | Bình Dương | 2013 | 12 tuần | Còi cọc |
| 34 | BinhDuong8/2013 | Bình Dương | 2013 | Sau cai sữa | Không có dữ liệu |
| 35 | PhuYen/2014 | Phú Yên | 2014 | Nọc | Bình thường, trại có heo con đang bị còi |
| 36 | DongNai5/2014 | Đồng Nai | 2014 | Cai sữa | Không có dữ liệu |
| 37 | DongNai6/2014 | Đồng Nai | 2014 | Cai sữa | Không có dữ liệu |
| 38 | BinhDuong9/2014 | Bình Dương | 2014 | Cai sữa | Không có dữ liệu |
| 39 | BinhDuong10/2014 | Bình Dương | 2014 | 10 tuần | Không có dữ liệu |
| 40 | TayNinh/2014 | Tây Ninh | 2014 | 5 tháng | Viêm da |
| 41 | NAVET-BenTre/2014 | Bến Tre | 2014 | Cai sữa | Không có dữ liệu |
| 42 | BinhDuong11/2015 | Bình Dương | 2015 | Thai | Thai sẩy |
| 43 | NAVET-NgheAn1/2015 | Nghệ An | 2015 | Sau cai sữa | Còi cọc |
| 44 | NAVET-NgheAn2/2015 | Nghệ An | 2015 | Sau cai sữa | Còi cọc |
| 45 | BinhDuong12/2016 | Bình Dương | 2016 | 14 tuần | Không có dữ liệu |
| 46 | DongNai7/2016 | Đồng Nai | 2016 | 18 tuần | Viêm da |
| 47 | DongNai8/2016 | Đồng Nai | 2016 | Sau cai sữa | Không có dữ liệu |
| 48 | NAVET-TpHCM8/2016 | Tp. HCM | 2016 | Thai | Thai khó |

Bảng 2. Các phân lập PCV2 tham khảo từ Nguyễn Thị Thu Hồng và ctv (2008)

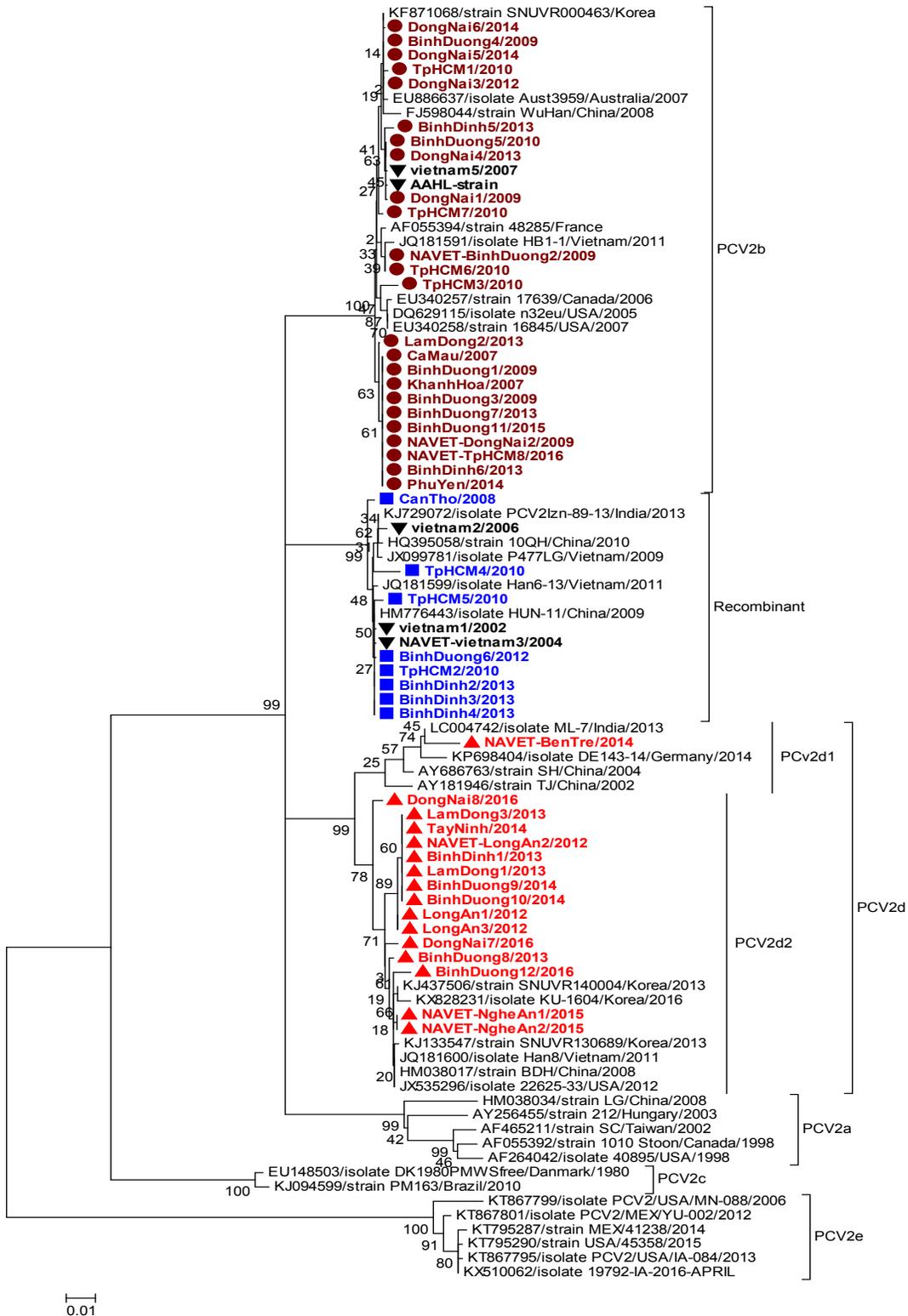
| STT | Ký hiệu mẫu | Nơi lấy mẫu | Năm thu mẫu | Loại heo | Triệu chứng lâm sàng |
|-----|------------------------|-----------------|-------------|------------------|----------------------|
| 1 | vietnam1/2002 | Long An | 2002 | Không có dữ liệu | Không có dữ liệu |
| 2 | NAVET vietnam3/2004 | Bình Dương | 2004 | Không có dữ liệu | Không có dữ liệu |
| 3 | vietnam2/2006 | Vũng Tàu | 2006 | Sau cai sữa | Còi cọc, viêm da |
| 4 | vietnam5/2007 | Tp. Hồ Chí Minh | 2007 | Sau cai sữa | Bình thường |

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân tích cây di truyền dựa trên ORF2 của PCV2

Kết quả phân tích cây di truyền dựa trên ORF2 của 48 phân lập PCV2 thu thập từ năm 2007 đến 2016 từ 13 tỉnh/thành Việt Nam (hình 1) cho thấy, các phân lập PCV2 được xếp vào genotype PCV2b chiếm 50,00% (24/48), genotype 2d chiếm 33,33% (16/48) và nhóm tái tổ hợp (recombinant) chiếm 16,67% (8/48), không có phân lập PCV2 nào được xếp vào genotype PCV2a. Nguyễn Thị Thu Hồng và ctv (2008) đã phân tích trình tự bộ gen của 4 mẫu dương tính với DNA PCV2 thu thập ở miền Nam Việt Nam giữa năm 2002 và 2007 (vietnam1/2002, vietnam2/2006 và NAVET-vietnam3/2004 và vietnam5/2007), kết quả 3 phân lập PCV2 thu thập vào năm 2002, 2004 và 2006 thuộc về cùng một nhánh và có mức độ tương đồng trình tự nucleotide rất cao, từ 99,66% đến 99,83%. Trong khi đó, phân lập PCV2 thu thập năm 2007 (vietnam5/2007) được xếp vào nhánh khác và có mức độ tương đồng so với 3 phân lập trên từ 96,15% đến 96,42%. Điều này cho thấy 3 phân lập vietnam1/2002, vietnam2/2006 và NAVET-vietnam3/2004 có thể chung nguồn gốc và chúng khác biệt so với phân lập vietnam5/2007. Tuy nhiên, nghiên cứu này vẫn chưa xác định genotype của các phân lập PCV2 lưu hành ở Việt Nam, do tại thời điểm nghiên cứu này, PCV2 chưa được phân định đến genotype. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng 4 phân lập (vietnam1/2002, vietnam2/2006, vietnam3/2004 và vietnam5/2007) như là các phân lập tham khảo. Kết quả phân tích trình tự gen ORF2 và cây di truyền giữa 48 phân lập

PCV2 trong nghiên cứu này cùng với 4 phân lập PCV2 tham khảo và 36 chủng PCV2 tham khảo từ GenBank cho thấy 3 phân lập vietnam1/2002, vietnam2/2006 và vietnam3/2004 được xếp vào nhóm tái tổ hợp, riêng phân lập vietnam5/2007 được xếp vào genotype PCV2b. Huỳnh Thị Mỹ Lệ và ctv (2013) phân tích trình tự bộ gen và protein Cap của 30 phân lập PCV2 được thu nhận từ năm 2008 đến 2011. Kết quả có 8 phân lập thuộc genotype PCV2b, các phân lập còn lại thuộc nhóm tái tổ hợp giữa PCV2a và PCV2b. Nhóm tác giả này đã dùng kỹ thuật nested PCR để xác định genotype 148 mẫu bệnh phẩm dương tính với PCV2 thu thập từ năm 2011 đến 2012 từ đàn heo nuôi tại 4 tỉnh/thành: Hà Nội, Hòa Bình, Bắc Giang và Hải Dương. Kết quả cho thấy các PCV2 lưu hành ở đàn heo ở 4 tỉnh/thành trên đều thuộc genotype PCV2b (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và ctv, 2012). Từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy sự lưu hành vượt trội của genotype PCV2b và có thể genotype PCV2b xuất hiện ở Việt Nam vào năm 2007. Nguyễn Ngọc Hải và ctv (2013) phân tích trình tự một phần gen ORF2 của 2 phân lập PCV2 thu nhận tại thành phố Hồ Chí Minh và 11 phân lập PCV2 thu nhận từ tỉnh Đồng Nai trong năm 2010. Kết quả có 5/13 phân lập PCV2 được xếp vào genotype PCV2b, các phân lập PCV2 còn lại đều thuộc genotype PCV2d (8/13). Đây được xem là báo cáo đầu tiên về sự lưu hành của PCV2d ở Việt Nam. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các phân lập PCV2 được xếp vào PCV2d cũng tương đối cao, chiếm tỷ lệ 33,33% (16/48) trong tổng số các mẫu khảo sát, trong đó chủ yếu là PCV2d2 (15/16). Nhìn chung, ở Việt Nam có sự lưu hành của PCV2 genotype 2b, 2d và nhóm tái tổ hợp.



Hình 1. Cây di truyền PCV2 xây dựng dựa trên trình tự nucleotide gen ORF2 của 48 phân lập PCV2 trong nghiên cứu này, 5 phân lập PCV2 tham khảo (▼) và 36 chủng tham khảo đăng ký trên GenBank

3.2. Phân tích đa dạng di truyền của PCV2 dựa vào ORF2

Phân tích sự đa dạng di truyền giữa các phân lập PCV2 lưu hành ở miền Nam Việt Nam trong

khoảng thời gian từ năm 2007 đến 2016 bằng cách xác định khoảng cách di truyền (p-distances) trong cùng genotype và giữa các genotype PCV2 dựa trên ORF2 (bảng 3).

Bảng 3. Trung bình khoảng cách di truyền (p-distances) trong cùng genotype và giữa các genotype lưu hành ở các tỉnh phía Nam Việt Nam từ năm 2007 – 2016

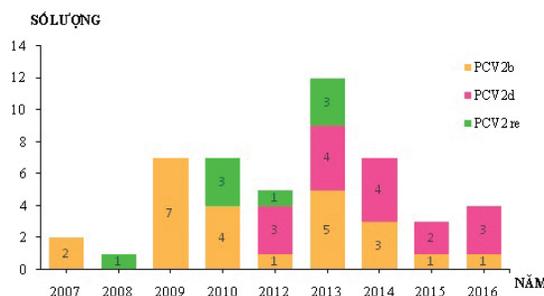
| Trung bình khoảng cách di truyền trong cùng genotype ($\bar{X} \pm SE$) | Genotype | Trung bình khoảng cách di truyền giữa các genotype ($\bar{X} \pm SE$) | | |
|---|-----------------|---|---------------------|-----------------|
| | | PCV2b | PCV2d | Nhóm tái tổ hợp |
| 0,0038 \pm 0,0014 | PCV2b | - | | |
| 0,0078 \pm 0,0018 | PCV2d | 0,0663 \pm 0,0102 | - | |
| 0,0038 \pm 0,0010 | Nhóm tái tổ hợp | 0,0595 \pm 0,0096 | 0,0605 \pm 0,0097 | - |

Khoảng cách di truyền được xem là tiêu chuẩn để xác định genotype của PCV2, dựa trên mức độ biến đổi di truyền của ORF2 thì giá trị ngưỡng $p = 0,035$ (Segalés và ctv, 2008). Qua phân tích cho thấy các phân lập PCV2 được xếp vào genotype PCV2d có tính đa dạng di truyền cao nhất với khoảng cách di truyền $p = 0,0078 \pm 0,0018$, cao gần gấp đôi so với các phân lập PCV2 được xếp vào PCV2b ($p = 0,0038 \pm 0,0014$) và nhóm tái tổ hợp ($p = 0,0038 \pm 0,0010$). Ngoài ra, khoảng cách di truyền giữa các

genotype biến động từ $0,0595 \pm 0,0096$ đến $0,0663 \pm 0,0102$, các giá trị này cao hơn rất nhiều so với giá trị ngưỡng phân định genotype $p = 0,035$. Nhìn chung, khoảng cách di truyền giữa các genotype khá cao, đáp ứng đủ điều kiện phân định thành các genotype riêng biệt.

3.3. Sự lưu hành của các genotype PCV2

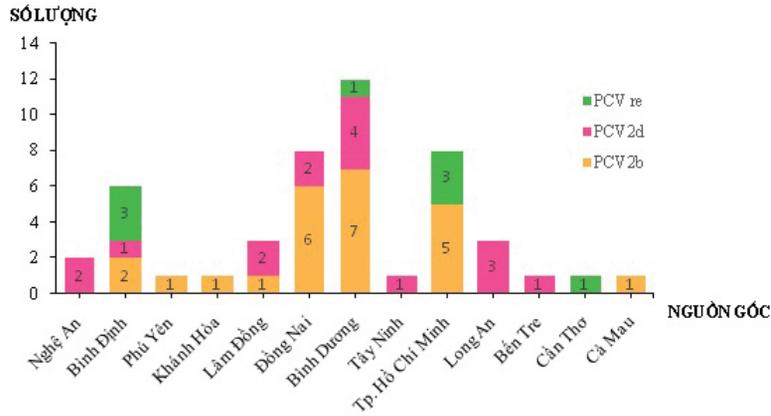
Sự phân bố theo thời gian và nguồn gốc địa lý của 48 phân lập PCV2 trong nghiên cứu này được thể hiện qua biểu đồ 1 và biểu đồ 2.



Biểu đồ 1. Phân bố theo thời gian của các phân lập PCV2 thu thập được ở miền Nam Việt Nam từ năm 2007 đến 2016

Qua đó cho thấy sự lưu hành phổ biến của genotype PCV2b qua các năm khảo sát, đồng thời có sự xuất hiện và ngày càng trở nên phổ biến của genotype PCV2d, đặc biệt là PCV2d2; có sự lưu hành cùng lúc nhiều genotype trên cùng địa phương. Ngoài ra, các

phân lập NAVET-vietnam3/2004, BinhDuong6/2012 và BinhDuong7/2013 được phát hiện trong cùng một trại qua các năm khác nhau, trong đó phân lập NAVET-vietnam3/2004, BinhDuong6/2012 được xếp vào nhóm tái tổ hợp, còn phân lập BinhDuong7/2013 lại



Biểu đồ 2. Phân bố theo địa lý của các phân lập PCV2 thu thập được ở miền Nam Việt Nam từ năm 2007 đến 2016

được xếp vào genotype PCV2b (hình 1). Qua đây cho thấy có sự biến đổi genotype xảy ra theo thời gian ở mức độ trại. Điều này cũng được Kwon và ctv (2017) ghi nhận khi nghiên cứu sự đa dạng di truyền và sự biến đổi genotype PCV2 xảy ra ở Hàn Quốc. Các nghiên cứu dịch tễ học trên toàn thế giới đã chứng minh sự phân bố theo thời gian của các genotype PCV2 và có sự biến đổi toàn cầu từ PCV2a sang PCV2b và sự xuất hiện vượt trội của PCV2b từ sau năm 2003 (Olvera và ctv, 2007). Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây cho thấy PCV2d, đặc biệt là PCV2d2 lưu hành khá phổ biến và thậm chí trở nên vượt trội hơn so với PCV2b (Xiao và ctv, 2016; Kwon và ctv, 2017). Ở Việt Nam, báo cáo đầu tiên về sự hiện diện của PCV2d trong các mẫu thu nhận ở thành phố Hồ Chí Minh và tỉnh Đồng Nai trong năm 2010 (Nguyễn Ngọc Hải và ctv, 2013). Trong nghiên cứu này của chúng tôi, PCV2d được xếp thành 2 subgenotype, đó là PCV2d1 và PCV2d2; trong đó PCV2d2 lưu hành phổ biến hơn PCV2d1.

3.4. Đặc điểm ORF2 của các phân lập PCV2 ở Việt Nam

ORF2 mã hóa protein cấu trúc Cap (capsid) với kích thước khoảng 27,8 kDa. Protein Cap của PCV2 có tính sinh miễn dịch, kích thích sinh miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào (Fort và ctv, 2010). Ngoài ra protein Cap còn có chức năng rất quan trọng trong việc giúp virus bám và xâm nhập vào tế bào ký chủ (Khayat và ctv, 2011). Sự đột biến xảy ra ở protein Cap khi tiếp đời liên tục virus trên môi trường tế bào PK15 đã thúc đẩy khả năng phát triển của PCV2 *in vitro* cũng như làm nhược

độc virus *in vivo* (Fenaux và ctv, 2004). Điều này cho thấy, sự biến đổi xảy ra ở ORF2 sẽ ảnh hưởng đến khả năng gây bệnh của PCV2.

Phân tích kết quả giải trình tự toàn bộ ORF2 của 48 phân lập PCV2 trong nghiên cứu này cho thấy chiều dài toàn bộ ORF2 là 702 nt (24/48) đối với các phân lập PCV2 được xếp vào genotype PCV2b hoặc 705 nt (24/48) đối với các phân lập PCV2 được xếp vào PCV2d hoặc nhóm tái tổ hợp. Chiều dài chuỗi polypeptide của protein capsid suy ra từ trình tự chuỗi nucleotide tương ứng là 233 hoặc 234 aa. Phân tích sự tương đồng về acid amin giữa các genotype của PCV2 cho thấy chiều dài toàn bộ protein capsid của PCV2a và PCV2b là 233 aa, tuy nhiên ở PCV2d, PCV2c và nhóm PCV2 tái tổ hợp thì chiều dài protein capsid là 234 aa, thêm lysine (ký hiệu K) ở vị trí 234 (bảng 4). Xiao và ctv (2015) cho rằng chiều dài acid amin của protein capsid không liên quan đến việc xác định genotype PCV2d vì có một số chủng thuộc PCV2d nhưng có chiều dài protein capsid là 233 aa thay vì 234 aa. Ngoài ra, theo Tribble và ctv (2011), vùng CP (169-180) là vùng bảo tồn nhất của các phân lập PCV2, tuy nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy có sự khác biệt về acid amin ở vị trí 169 giữa genotype PCV2d so với các genotype khác (bảng 4). Đối với genotype PCV2d, ở vị trí 169 là arginine (ký hiệu là R) hoặc glycine (ký hiệu là G), trong khi đó ở các genotype còn lại thì ở vị trí 169 đều là serine (ký hiệu là S). Do đó, cần phải nghiên cứu thêm về sự biến đổi về acid amin ở vùng CP (169-180) này.

Bảng 4. Các acid amin khác nhau giữa các genotype PCV2

| Vị trí | PCV2a | PCV2b | PCV2d | Nhóm tái tổ hợp | PCV2c | PCV2e |
|---------|-------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
| 53 | F | F | I | F | F | F/Y |
| 59 | R/A | R | K/A | K | A | T |
| 68 | A | A | N | A | A | A |
| 89 | I | R | L | L | L | L |
| 90 | S | S | T | T | T | S |
| 134 | T | T | N | T | T | N |
| 169 | S | S | R/G | S | S | R |
| 190 | S | T/A | T | S | T | S |
| 215 | V | V | I | V | V | I/V |
| 234 | - | - | K | K | K | P |
| 235-238 | - | - | - | - | - | LSYM |

Mức độ tương đồng giữa 24 phân lập PCV2 được xếp vào genotype PCV2b khá cao, từ 98,7% đến 100% về nucleotide và từ 97,8% đến 100% về acid amin; tương đồng với chủng AAHL-strain từ 99,0 - 100% và từ 98,7 - 100%, tương ứng về nucleotide và acid amin. Ngoài ra, các phân lập này cũng tương đồng với chủng 48285 (chủng phân lập ở Pháp vào năm 1998) từ 99,1% đến 99,8% về nucleotide và từ 97,8% đến 99,5% về acid amin; tương đồng với chủng WuHan (chủng phân lập ở Trung Quốc năm 2008) từ 98,5% đến 99,4% về nucleotide và từ 98,2 đến 99,5% về acid amin. So sánh tương đồng giữa các phân lập PCV2d2 trong nghiên cứu này với nhau và với một số chủng tham khảo trên thế giới cho thấy chúng tương đồng với nhau rất cao (98,5% – 100% về nucleotide và 98,2% – 100% về acid amin) và chúng tương đồng với chủng BDH (chủng phân lập ở Trung Quốc vào năm 2008), phân lập 22625-33 (phân lập ở Mỹ vào năm 2012) và chủng SNUVR130689 (chủng phân lập ở Hàn Quốc vào năm 2013) từ 99,0% đến 99,8% về nucleotide và từ 99,1% đến 100% về acid amin. Mức độ tương đồng giữa các phân lập PCV2 được xếp vào nhóm tái tổ hợp biến động từ 98,7% đến 100% về nucleotide và về acid amin, các phân lập PCV2 này tương đồng rất cao với phân lập HUN-11 (phân lập ở Trung Quốc năm 2009).

IV. KẾT LUẬN

PCV2 lưu hành ở 13 tỉnh phía Nam Việt Nam trong nghiên cứu thuộc các genotype 2b, 2d và nhóm tái tổ hợp. Trong đó, phổ biến là PCV2b (24/48) và PCV2d (16/48), đặc biệt là sự lưu hành

vượt trội của PCV2d2 (15/16). Có sự lưu hành đồng thời nhiều genotype PCV2 trên cùng địa phương. Sự đa dạng di truyền giữa các phân lập PCV2 được xếp vào các genotype biến động rộng. Các phân lập PCV2 ở Việt Nam tương đồng khá cao với các chủng PCV2 ở Trung Quốc và Hàn Quốc. Đây là cơ sở quan trọng trong việc chọn chủng PCV2 nhằm nghiên cứu, sản xuất và đánh giá hiệu quả của vacxin PCV2 trong việc phòng bệnh do circovirus trên heo nói chung và đặc biệt là PMWS nói riêng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cai L., Ni J., Xia Y., Zi Z., Ning K., Qiu P., Li X., Wang B., Liu Q., Hu D., Yu X., Zhou Z., Zhai X., Han X. and Tian K., 2012. Identification of an emerging recombinant cluster in porcine circovirus type 2. *Virus research* 165 (1): 95–102.
2. Davies B., Wang X., Dvorak C.M., Marthaler D., Murtaugh M.P., 2016. Diagnostic phylogenetics reveals a new Porcine circovirus 2 cluster. *Virus Res.* 217: 32–37.
3. Fenaux M., Opriessnig T., Halbur P.G., Elvinger F. and Meng X.J., 2004b. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication *in vitro* and attenuated the virus *in vivo*. *Journal of Virology* 78 (24): 13440-13446.
4. Fort M., Olvera A., Sibila M., Segalés J., Mateu E., 2007. Detection of neutralizing antibodies in

- postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet. Microbiol.* 125: 244–55.
5. Fort M., Sibila M., Nofrarias M., Pérez-Martín E., Olvera A., Mateu E. and Segalés, J., 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins are involved in the development of cell-mediated immunity upon PCV2 infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 137 (3–4): 226–234.
 6. Hamel A.L., Lin L.L. and Nayar G.P.S., 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology* 72: 5262–5267.
 7. Huỳnh Thị Mỹ Lê, Nguyễn Văn Giáp, Đặng Hữu Anh, Trần Thị Hương Giang, Mai Thị Ngân, Vũ Thị Ngọc, Lâm Văn Trường, Ngô Minh Hà và Bong Kyun Park, 2012. 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. *Tạp chí KHKT Thú y* XIX (5): 18-25.
 8. Huynh T.M.L., Nguyen B.H., Nguyen V.G., Dang H.A, Mai T.N., Tran T.H.G., Ngo M.H., Le V.T., Vu T.N., Ta T.K.C., Kim H.K. and Park B.K., 2013. Phylogenetic and Phylogeographic Analyses of Porcine Circovirus Type 2 Among Pig Farms in Vietnam. *Transboundary and emerging diseases* 61 (6): e25-34.
 9. Khayat R., Brunn N., Speir J.A., Hardham J.M., Ankenbauer R.G., Schneemann A. and Johnson J.E., 2011. The 2,3-angstrom structure of porcine circovirus 2. *Journal of Virology* 85 (15): 7856–7862.
 10. Kwon T., Lee D., Yoo S.J., Je S.H., Shin J.Y., Lyoo Y.S., 2017. Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotype shift to PCV2d in Korean pig population. *Virus Res.* 228: 24–29.
 11. Nguyễn Ngọc Hải, Võ Khánh Hưng và Nguyễn Thị Kim Hằng, 2013. Phân tích di truyền virut gây hội chứng còi cọc trên heo sau cai sữa tại tỉnh Đồng Nai và thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí KHKT Thú y* XX (1): 22-28.
 12. Nguyễn Thị Thu Hồng, Phan Hoàng Dũng, Đặng Hùng, Nguyễn Tiến Hà và Chriss Morrissy, 2006. Bước đầu khảo sát về tình hình nhiễm PCV2 trên đàn heo nuôi ở một số tỉnh thành phía Nam. *Tạp chí KHKT Thú y* XIII (3): 67-69.
 13. Nguyễn Thị Thu Hồng, Lê Thị Thu Phương, Đặng Hùng, Nguyễn Tiến Hà, Nguyễn Ngọc Hải, Chris J. M. và Darren Schafer, 2008. Phân tích di truyền circovirus lợn typ 2 (PCV2) trên lợn tại khu vực Nam bộ. *Tạp chí KHKT Thú y* XV (2): 5-12.
 14. Olvera A., Cortey M. and Segalés J., 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 357: 175-185.
 15. Segalés J., Olvera A., Grau-Roma L., Charreyre C., Nauwynck H., Larsen L., Dupont K., McCullough K., Ellis J., Krakowka S., Mankertz A., Fredholm M., Fossum C., Timmusk S., Stockhofe-Zurwieden N., Beattie V., Armstrong D., Grassland B., Baekbo P. and Allan G., 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Veterinary Record* 162 (26): 867–868.
 16. Segalés J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus research* 164 (1-2): 10–9.
 17. Takahagi Y., Nishiyama Y., Toki S., Yonekita T. and Morimatsu F., Murakami H., 2008. Genotypic change of porcine circovirus type 2 on Japanese pig farms as revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Veterinary Medical Science* 70: 603–606.
 18. Tribble B.R., Kerrigan M., Crossland N., Potter M., Faaberg K., Hesse R. and Rowland, R.R.R., 2011. Antibody recognition of porcine circovirus type 2 capsid protein epitopes after vaccination, infection, and disease. *Clinical and Vaccine Immunology* 18 (5): 749–757.
 19. Xiao C.T., Halbur P.G. and Opriessnig T., 2015. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *Journal of General Virology* 96: 1830-1841.
 20. Xiao C., Harmon K.M., Halbur P.G., Opriessnig T., 2016. PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the U.S. during 2014 – 2016. *Vet. Microbiol.* 197:72–77.
- Ngày nhận 25-8-2017
 Ngày phản biện 26-2-2018
 Ngày đăng 1-5-2018