

ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ HỌC PHÂN TỬ CỦA VIRUS DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI LƯU HÀNH TẠI VIỆT NAM NĂM 2020

*Trần Thị Thanh Hà¹, Trương Anh Đức¹,
Lý Đức Việt¹, Hoàng Văn Tuấn¹, Chu Thị Như¹,
Nguyễn Thị Huyền¹, Đặng Thị Kiều Anh¹, Bùi Thị Tố Nga²,
Bùi Trần Anh Đào², Nguyễn Thế Vinh³, Đặng Vũ Hoàng¹*

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, 550 mẫu bệnh phẩm của lợn nghi nhiễm virus DTLCP với các triệu chứng và bệnh tích điển hình được thu thập từ 14 tỉnh thuộc 7 vùng sinh thái nông nghiệp tại Việt Nam được xét nghiệm bằng phương pháp realtime-PCR đã cho kết quả dương tính với virus DTLCP. Kết quả giải trình tự và phân tích trình tự gen cho thấy các chủng virus DTLCP đang lưu hành tại Việt Nam thuộc nhóm kiểu gen II (genotype II) và kiểu nhóm huyết thanh 8 (serotype 8) dựa trên trình tự gen p72 và CD2v, và có quan hệ gần gũi với các chủng virus gây bệnh tại Trung Quốc năm 2018. Phân tích trình tự nucleotide của vùng IGR nằm giữa gen I73R và I329L cho thấy hầu hết các chủng virus DTLCP đang lưu hành tại Việt Nam thuộc biến thể IGR II (IGR II variant). Các kết quả của nghiên cứu này là nguồn thông tin hữu ích trong việc nghiên cứu phát triển vaccin phòng bệnh DTLCP và góp phần vào công tác phòng chống và kiểm soát bệnh DTLCP hiệu quả hơn tại Việt Nam.

Từ khoá: Dịch tả lợn châu Phi, kiểu gen, nhóm kiểu huyết thanh, biến thể.

Molecular epidemiological characteristics of African swine fever virus strains circulating in Viet Nam in 2020

*Tran Thi Thanh Ha, Truong Anh Duc,
Ly Duc Viet, Hoang Van Tuan, Chu Thi Nhu,
Nguyen Thi Huyen, Dang Thi Kieu Anh, Bui Thi To Nga,
Bui Tran Anh Dao, Nguyen The Vinh, Dang Vu Hoang*

SUMMARY

In this study, 550 samples from pigs suspecting with ASFV with the typical symptoms and lesions were collected from 14 provinces in 7 Agro-ecological regions in Viet Nam as the materials for this study. The analysed result by realtime-PCR showed that 550 samples were positive with ASFV. The results of sequencing and phylogenetic analysis showed that the ASFV strains currently circulating in Viet Nam belonged to genotype II, serotype group 8 based on p72 and CD2v gene, respectively, and closely related to the virus strains causing disease in China in 2018. Based on the sequence of the IGR region between I73R and I329L genes, most of ASFV strains currently circulating in Viet Nam belonged to IGR II variant. Our studied results provide useful information for developing vaccines against ASFV so as to prevent and control ASFV in Viet Nam more effectively.

Keywords: ASFV, genotype, serotype, IGR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dịch tả lợn châu Phi (DTLCP) là

bệnh truyền nhiễm nguy hiểm do virus gây ra. Động vật mắc cảm là lợn nhà và lợn rừng. Virus DTLCP không gây bệnh cho các loài động vật khác. Lợn nhiễm bệnh có tỷ lệ chết

¹ Bộ môn Hóa sinh - Miễn dịch, Viện Thú y

² Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³ Bộ môn Virus, Viện Thú y

cao, lên đến 100% [1]. Bệnh DTLCP có khả năng lây lan nhanh và gây thiệt hại lớn cho ngành chăn nuôi lợn. Tuy nhiên, virus DTLCP không lây nhiễm và gây bệnh ở người. Virus DTLCP lần đầu tiên được ghi nhận vào năm 1907. Tuy nhiên, bệnh DTLCP được mô tả lần đầu tiên vào năm 1921 tại Kenya và sau đó bệnh lan rộng ra các nước châu Âu, Nam Mỹ và Caribbean vào giữa thế kỷ trước [1]. Trải qua gần một thế kỷ, bệnh DTLCP xuất hiện trên nhiều quốc gia đã gây ra những thiệt hại kinh tế nặng nề ở mỗi quốc gia có dịch bệnh bùng phát. Năm 2007, bệnh xuất hiện ở Georgia, sau đó lan rộng ra các nước Đông Âu như Nga, Belarus, Ukraine, Estonia, Litva, Latvia, Romania, Moldova, Cộng hòa Séc và Ba Lan [2]. Tại châu Á, bệnh DTLCP lần đầu tiên được phát hiện tại Trung Quốc vào đầu tháng 8/2018 [3] và sau đó là tại Mông cổ vào đầu tháng 1/2019 (OIE/FAO), Campuchia tháng 4/2019, Hàn Quốc tháng 5/2019, Việt Nam tháng 2/2019, Lào tháng 6/2019, Philippines tháng 7/2019, Myanmar tháng 8/2019, Đông Timor tháng 9/2019, và gần đây nhất là Ấn Độ tháng 5/2020 [4]. Tính từ tháng 2 đến tháng 12 năm 2019, bệnh dịch này đã xảy ra tại 8.553 xã thuộc 667 huyện của 63 tỉnh/thành phố với tổng số lợn tiêu hủy gần 6 triệu con; với tổng trọng lượng trên 340.000 tấn, chiếm khoảng 9% tổng trọng lượng lợn của cả nước. Theo Cục Thú y, đến ngày 10/3/2021, cả nước xảy ra 278 ổ dịch tại 31 tỉnh/thành phố, tổng số lợn phải tiêu hủy là 4.758 con. Hiện nay, cả nước có 76 ổ dịch tại 38 huyện của 21 tỉnh/thành phố có dịch chưa qua 21 ngày.

Tác nhân gây bệnh DTLCP là virus DNA mạch kép, có vỏ bọc thuộc họ *Asfviridae*, giống *Asfvirus*. Bộ gen của virus dài khoảng 170-193kbp, có khoảng 151-167 khung đọc mã hóa cho hơn 50 protein khác nhau. Trong đó, protein p72 là một trong số các protein của virus DTLCP có tính kháng nguyên cao. Protein p72 được mã hóa bởi gen B646L và có khối lượng phân tử khoảng 73,5kDa; đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành vỏ

capsid trong quá trình xâm nhiễm của virus [5]. Trình tự gen mã hóa cho protein p72 cũng thường được sử dụng trong các nghiên cứu về dịch tễ học phân tử virus DTLCP [5]. Cho đến nay, có ít nhất 8 kiểu nhóm huyết thanh học (serotype) của virus DTLCP đã được công bố và được ký hiệu từ SG1-SG8 [6]. Hiện nay chưa có vaccin và thuốc điều trị đặc hiệu đối với bệnh, vì vậy một trong các biện pháp hiệu quả nhất để ngăn chặn sự bùng phát của dịch bệnh là phát hiện sớm, chính xác và tiêu hủy toàn bộ đàn lợn bị nhiễm bệnh [7]. Hiện nay tại Việt Nam chưa có một nghiên cứu nào về nhóm kiểu gen, nhóm kiểu huyết thanh của virus DTLCP trên phạm vi của cả nước. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định kiểu gen, kiểu nhóm huyết thanh và các biến thể của virus DTLCP đang lưu hành tại Việt Nam. Đây được xem là những thông tin hữu ích trong việc phát triển vaccin phòng bệnh DTLCP tại Việt Nam, đồng thời góp phần vào công tác phòng chống và kiểm soát bệnh DTLCP hiệu quả hơn.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu bệnh phẩm và chẩn đoán virus DTLCP

Mẫu bệnh phẩm sử dụng trong nghiên cứu này là các mẫu hạch, lách, thận và máu toàn phần của lợn nghi nhiễm virus DTLCP với các triệu chứng điển hình như sốt cao, xuất huyết trên da, mủ chảy ra ở lỗ mũi, có máu chảy ra từ mũi và miệng, liệt chân, xung huyết đỏ ở các chân, chết nhanh... Các mẫu bệnh phẩm được thu thập, bảo quản và xử lý theo tiêu chuẩn và hướng dẫn của TCVN 8400-41:2019 và tiêu chuẩn OIE [8]. Các mẫu bệnh phẩm được thu thập trong năm 2020 tại 14 tỉnh thuộc 7 vùng sinh thái nông nghiệp tại Việt Nam (bảng 1).

Mẫu bệnh phẩm được tách chiết DNA sử dụng bộ kit tách chiết QIAamp DNA Mini (Qiagen) và xác định sự có mặt của virus DTLCP bằng phương pháp realtime-PCR theo khuyến cáo của OIE [8].

2.2. Phương pháp PCR nhân gen và tinh sạch DNA

Cặp mồi đặc hiệu để phân tích nhóm kiểu gen (genotype) đã được công bố trước đây P72-U/P72-D được sử dụng để nhân đoạn gen P72 của virus DTLCP có độ dài 478 bp [9]. Chu trình phản ứng PCR bao gồm giai đoạn 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 52°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây) và cuối cùng 72°C trong 5 phút.

Để xác định kiểu nhóm huyết thanh (serotype) của virus DTLCP đang lưu hành tại Việt Nam, chúng tôi tiến hành thiết kế cặp primer khuếch đại toàn bộ vùng gen mã hoá protein của gen CD2v. Phần mềm Lasergene DNA Star v.8 được sử dụng để tính toán các thông số của mồi và trình tự gen CD2v của các chủng virus DTLCP đang lưu hành đã công bố trên Ngân hàng dữ liệu NCBI được dùng để so sánh tìm ra trình tự đặc trưng:

CD2v-F1: 5'-ATGATAATACTTATTTTTT
TAAT-3'

CD2v-R1: 5'-AAAATTCTATCTACGT
GAATAAG -3'

Cặp mồi CD2v-F1/R1 được sử dụng để nhân đoạn gen CD2v của virus DTLCP có độ dài 1083bp. Chu trình phản ứng PCR bao gồm giai đoạn 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ (95°C trong 60 giây; 58,5°C trong 60 giây; 72°C trong 60 giây) và cuối cùng 72°C trong 5 phút.

Để xác định các biến thể của virus DTLCP đang lưu hành tại Việt Nam, chúng tôi sử dụng cặp primer đặc hiệu ECO1A/B (385bp) theo quy trình của phòng thí nghiệm tham chiếu DTLCP tại châu Âu và đã được mô tả trước đó [10].

ASFV-ECO1A: 5'-CCATTTATC
CCCCGCTT TGG-3'

ASFV-ECO1B: 5'-TCGTCATCC
TGAGACAGCAG-3'

Cặp mồi ECO1A/B được sử dụng để nhân đoạn gen I73R/I329L của virus DTLCP có độ dài 385bp. Chu trình phản ứng PCR bao gồm

giai đoạn 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây) và cuối cùng 72°C trong 5 phút.

Sản phẩm được điện di trên gel agarose 1,5%. Để phân tích trình tự gen p72, CD2v và I73R/I329L của chủng virus thu thập được từ 7 vùng sinh thái nông nghiệp tại Việt Nam, sản phẩm PCR có kích thước 478bp, 1083bp và 385bp tương ứng với từng gen p72, CD2v và I73R/I329L được tinh sạch bằng bộ kit chiết xuất Qiagen gel extraction (Qiagen) và giải trình tự gen bởi công ty 1st BASE DNA Sequencing Division (Malaysia).

2.3. Phân tích trình tự nucleotide và xây dựng phả hệ

Phương pháp phân tích kết quả giải trình tự nucleotide, amino acid chúng tôi dựa vào: (i) Database của chủng virus DTLCP đã công bố trên Ngân hàng dữ liệu gen (NCBI); (ii) Phần mềm BioEdit, FinchTV, và DNASTar phân tích, so sánh sự tương đồng, đột biến của các chủng virus DTLCP phân lập tại Việt Nam và các chủng tham chiếu trên thế giới; và (iii) Phần mềm MEGA7 dùng để phân tích cây phát sinh/phả hệ các chủng virus DTLCP đang lưu hành tại Việt Nam.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả lựa chọn điểm thu thập mẫu bệnh phẩm

Nghiên cứu thu thập mẫu bệnh phẩm được triển khai ở 214 hộ/trại chăn nuôi lợn ở 14 tỉnh đại diện cho 7 vùng sinh thái nông nghiệp trên cả nước. Mỗi vùng sinh thái chúng tôi lựa chọn 2 tỉnh đại diện để tiến hành thu thập mẫu. Các tỉnh được lựa chọn dựa vào đặc điểm:

- Là các tỉnh trọng điểm về chăn nuôi, có nhiều rủi ro lây nhiễm dịch bệnh như giáp ranh với các tỉnh sát biên giới, nằm trên tuyến đường huyết mạch về buôn bán lợn.

Tỉnh Quảng Ninh có cửa khẩu Móng Cái; tỉnh Lào Cai có cửa khẩu quốc tế Lào Cai, giáp ranh với Trung Quốc. Đây là hai tỉnh có kim ngạch giao thương về các mặt hàng nông sản

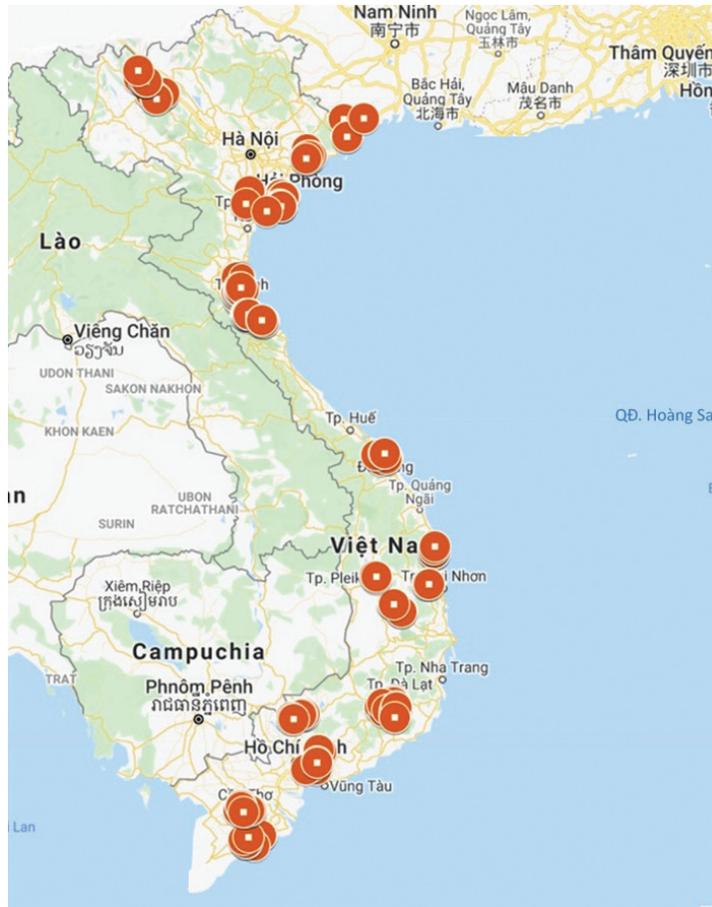
cao với Trung Quốc và cũng là những tỉnh xuất hiện bệnh DTLCP sớm trong cả nước.

Nghệ An và Hà Tĩnh là 2 tỉnh nằm trên tuyến đường 1A, việc vận chuyển động vật và sản phẩm động vật diễn ra thường xuyên và sôi động.

- Những tỉnh thành thuộc các vùng kinh tế trọng điểm hoặc nằm sát các vùng kinh tế trọng điểm và các khu du lịch (Đà Nẵng và Bình Phước).

- Các tỉnh đại diện vùng đồng bằng, có quy mô chăn nuôi lớn, mật độ chăn nuôi cao, có điều kiện thuận lợi về tiêu thụ và buôn bán lợn và sản phẩm từ lợn như Ninh Bình, Nam Định, Sóc Trăng, Cần Thơ, Đồng Nai, Bình Định.

- Gia Lai và Lâm Đồng là hai tỉnh được lựa chọn thu thập mẫu đại diện cho các tỉnh Tây Nguyên.



Hình 1. Vị trí của các hộ/trại chăn nuôi lợn đã thu thập mẫu bệnh phẩm DTLCP

Mẫu được thu thập ở các trang trại có quy mô chăn nuôi khác nhau (hộ gia đình, trang trại quy mô nhỏ, trang trại bán công nghiệp và quy mô công nghiệp), điều kiện chăm sóc khác nhau (mức độ an toàn sinh học cao và thấp), chế độ dinh dưỡng khác nhau (thức ăn công nghiệp, thức ăn thu gom, nuôi thả rông). Vị trí của các hộ/trại chăn nuôi lấy mẫu cho nghiên cứu được định vị bằng hệ thống

GIS và thể hiện ở bản đồ trong hình 1. Các mẫu bệnh phẩm được thu thập từ tháng 1 năm 2020 đến tháng 11 năm 2020 trong khuôn khổ đề tài độc lập cấp Nhà nước “Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học và đề xuất giải pháp phòng, chống bệnh dịch tả lợn châu phi (ASFV) tại Việt Nam” (Mã số đề tài: ĐTĐL.CN-75/1). Mẫu được thu thập với sự đồng ý của cơ quan thú y, chủ trang trại. Quá trình thu

thập mẫu được thực hiện tuân thủ nghiêm ngặt quy trình an toàn sinh học theo TCVN 8400-41:2019 và tiêu chuẩn OIE [8], không làm phát tán mầm bệnh. Do vậy, mẫu thu thập trong nghiên cứu này đảm bảo đại diện được về không gian, thời gian của quá trình hình thành bệnh.

3.2. Kết quả xác định sự có mặt của virus DTLCP trong mẫu bệnh phẩm

Trong nghiên cứu này, các mẫu bệnh phẩm được thu từ lợn nghi bị DTLCP tại 14 tỉnh khác nhau thuộc 7 vùng sinh thái nông nghiệp tại Việt

Nam. Các mẫu bệnh phẩm là máu toàn phần, hạch, thận và lách được lấy từ lợn có biểu hiện lâm sàng nghi ngờ do DTLCP như sốt cao, xuất huyết trên da, mũi chảy ra ở lỗ mũi, có máu chảy ra từ mũi và miệng, liệt chân, xung huyết đỏ ở các chân, lợn chết nhanh với dấu hiệu nghi do DTLCP và kiểm tra sàng lọc tại phòng thí nghiệm bằng phương pháp realtime-PCR theo TCVN 8400-41:2019 và hướng dẫn của OIE [8]. Kết quả chẩn đoán bằng phương pháp realtime-PCR cho thấy cả 550 mẫu bệnh phẩm đều cho kết quả dương tính với virus DTLCP (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả thu thập và chẩn đoán mẫu bệnh phẩm của lợn nghi mắc DTLCP bằng phương pháp realtime-PCR tại 7 vùng sinh thái nông nghiệp tại Việt Nam

TT	Vùng	Số lượng mẫu	Số mẫu dương tính	Số mẫu âm tính
1	Vùng núi phía Bắc (Lào Cai, Quảng Ninh)	70	70	0
2	Vùng đồng bằng và trung du Bắc bộ (Nam Định, Ninh Bình)	110	110	0
3	Vùng Bắc Trung Bộ (Nghệ An, Hà Tĩnh)	70	70	0
4	Vùng Nam Trung Bộ (Đà Nẵng, Bình Định)	60	60	0
5	Vùng Tây Nguyên (Lâm Đồng, Gia Lai)	70	70	0
6	Vùng Đông Nam Bộ (Bình Phước, Đồng Nai)	100	100	0
7	Vùng đồng bằng sông Cửu Long (Cần Thơ, Sóc Trăng)	70	70	0
Tổng		550	550	0

3.3. Kết quả xác định nhóm kiểu gen (genotype) virus DTLCP đang lưu hành tại Việt Nam

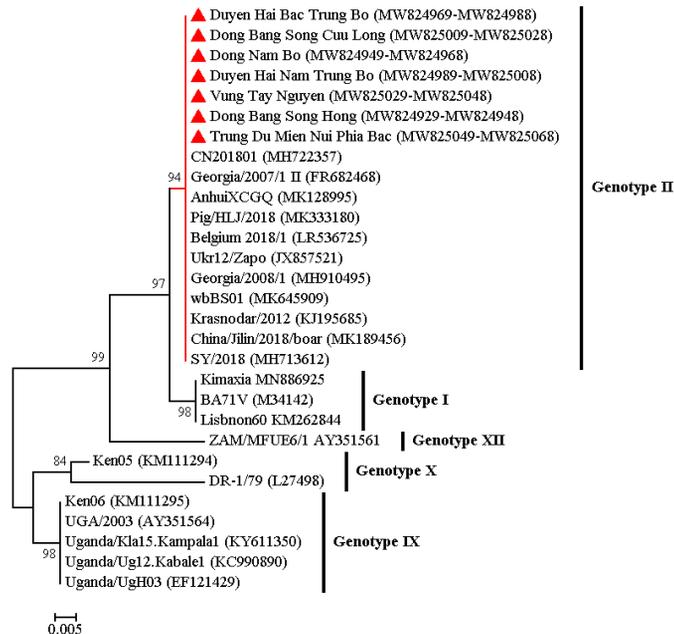
Theo khuyến cáo của OIE, dựa trên trình tự của đoạn gen p72 (B646L), virus DTLCP được chia thành 24 genotype khác nhau [11], trong đó phần lớn các genotype lưu hành ở khu vực châu Phi. Các genotype I và II hiện đang lưu hành mạnh và rộng rãi tại châu Âu và châu Á, trong đó tính tới thời điểm này, tại châu Á chỉ lưu hành genotype II. Chúng tôi tiến hành chọn ngẫu nhiên 10 mẫu/tỉnh trong 14 tỉnh đại diện cho 7 vùng sinh thái nông nghiệp tại Việt Nam

và giải trình tự đoạn gen p72 của virus DTLCP.

Kết quả giải trình tự gen p72 để xác định kiểu gen của 140 mẫu bệnh phẩm đã được đăng tải trên Ngân hàng Gen (GenBank) với mã số từ MW824929 đến MW825068. Từ các trình tự gen thu được, chúng tôi tiến hành xây dựng cây phả hệ xác định kiểu gen của các chủng virus DTLCP sử dụng trong nghiên cứu này. Kết quả thể hiện qua hình 2. Kết quả giải trình tự gen và phân tích về tỷ lệ tương đồng nucleotide của gen p72 đối với các mẫu bệnh phẩm dương tính với virus DTLCP thu thập từ 7 vùng sinh thái nông nghiệp của Việt Nam giống nhau 100% về trình tự

nucleotide của từng vùng và giữa các vùng sinh thái khác nhau. Kết quả phân tích trình tự gen p72 cũng cho thấy các chủng virus DTLCP đang lưu hành tại Việt Nam có sự tương đồng là 100% về nucleotide khi so sánh với các chủng virus

DTLCP đã được công bố tại Trung Quốc năm 2018 và 2019, kể cả chủng virus phân lập trên lợn rừng của Trung Quốc năm 2019 (wbBS01, Mã số NCBI: MK645909) [3] (hình 2).



Hình 2. Cây phả hệ của các chủng virus DTLCP thu thập tại 7 vùng sinh thái của Việt Nam dựa trên trình tự đoạn gen p72 với các chủng virus DTLCP tham chiếu

Ghi chú: Chủng virus trong nghiên cứu này được đánh dấu đồ hình tam giác là chủng đại diện cho mỗi vùng sinh thái

Khi so sánh trình tự nucleotide các chủng virus thu thập tại 7 vùng sinh thái nông nghiệp tại Việt Nam với các chủng virus đang lưu hành tại châu Âu như Bỉ năm 2018, Nga, Georgia năm 2007, 2008 cũng có độ tương đồng 100% [2, 12] (hình 2). Dựa vào trình tự gen p72 (B646L), sự lưu hành của virus DTLCP thuộc genotype II đã được ghi nhận ở nhiều quốc gia thuộc châu Á như Hàn Quốc, Bắc Triều Tiên, Mông Cổ, Campuchia, Lào, Myanmar, Philippine, Đông Timor và Indonesia [2, 4]. Kết quả phân tích trình tự gen p72 của virus DTLCP đang lưu hành tại 7 vùng sinh thái nông nghiệp đã chỉ ra rằng virus DTLCP tại Việt Nam đều thuộc về genotype II, tương đồng 100% về trình tự nucleotide khi so sánh với các chủng virus

DTLCP tham chiếu khác thuộc genotype II có độc lực cao trên lợn như chủng Georgia 2007 (mã số GenBank: FR682468), chủng CN201801 gây bệnh trên đàn lợn tại Trung Quốc (mã số GenBank: MH722357), chủng virus DTLCP wbBS01 phân lập trên lợn rừng ở Trung Quốc (mã số NCBI: MK645909).

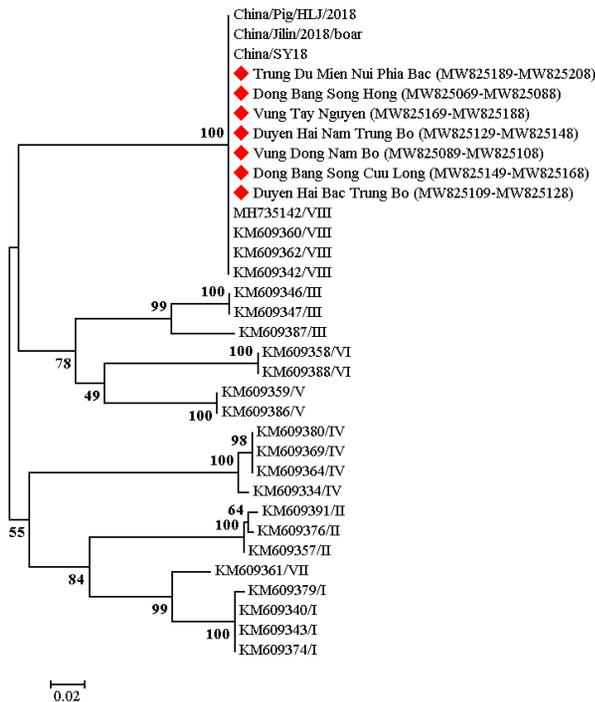
3.4. Kết quả xác định kiểu nhóm huyết thanh (serotype) virus DTLCP đang lưu hành tại Việt Nam

Trong những năm gần đây các nhà khoa học đã chứng minh rằng, phương pháp xác định kiểu nhóm huyết thanh thông qua phương pháp ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HAI) là không thực tế cũng như hiệu quả đối với việc phân nhóm huyết

thanh của virus DTLCP đang lưu hành tại thực địa vì: phương pháp đòi hỏi phải có virus sống và huyết thanh của lợn kháng lại virus DTLCP. Điều này khó có khả năng thực hiện được do khó thu thập được huyết thanh có khả năng đáp ứng miễn dịch với virus DTLCP của lợn sống do kháng thể này xuất hiện muộn, hiệu giá thấp và độc lực của virus DTLCP thường rất mạnh, do đó lợn có khả năng chết trong khoảng từ 5-10 ngày sau gây nhiễm [6].

Để giải quyết vấn đề này và cũng như biết được serotype của virus DTLCP phục vụ công tác điều chế vacxin phòng bệnh, các nhà khoa học đã xác định và chứng minh việc xác định kiểu nhóm huyết thanh dựa vào phương pháp phân tích trình tự nucleotide vùng mã hóa protein của gen CD2v [6]. CD2v của virus DTLCP là đoạn gen tương đồng duy nhất với gen mã hóa CD2 của tế bào miễn dịch T của vật chủ, một

protein tế bào T tham gia vào quá trình đồng điều hòa hoạt hóa của hệ thống tế bào miễn dịch trong cơ thể. CD2v là haemagglutinin của virus DTLCP và trước đây có liên quan đến khả năng miễn dịch bảo vệ cơ thể vật chủ, gọi là quá trình tự bảo vệ [13]. Lợn được miễn dịch với CD2v đã phát triển các kháng thể HAI và M-II, và được bảo vệ một phần khỏi thử thách với chủng virus độc lực tương đồng [13]. Hiện nay virus DTLCP được chia thành 8 nhóm khác nhau, theo những công bố mới nhất thì nhóm huyết thanh 8 (serogroup 8) hiện đang lưu hành tại hầu hết các nước thuộc châu Á như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nam Triều Tiên, Lào, Campuchia [3, 4, 12]. Trong nghiên cứu này các mẫu thu thập được từ 7 vùng sinh thái nông nghiệp được xác định kiểu nhóm huyết thanh dựa trên các mẫu đại diện khoảng 10 mẫu/tỉnh như mô tả ở phần phương pháp.



Hình 3. Cây phả hệ phát sinh vùng mã hóa protein CD2v virus DTLCP đang lưu hành tại 7 vùng sinh thái nông nghiệp Việt Nam

Ghi chú: Chủng virus trong nghiên cứu này được đánh dấu đỏ hình tam giác là chủng đại diện cho mỗi vùng sinh thái

Kết quả giải trình tự gen CD2v của các mẫu bệnh phẩm thu thập được từ 7 vùng sinh thái nông nghiệp được đăng tải trên Ngân hàng Gen (GenBank) với mã số từ MW825069 đến MW825208. Từ các trình tự gen thu được, chúng tôi tiến hành xây dựng cây phả hệ để xác định kiểu nhóm huyết thanh học của các chủng virus DTLCP đang lưu hành tại Việt Nam. Kết quả ở hình 3 cho thấy các chủng virus đang lưu hành tại 7 vùng sinh thái nông nghiệp của Việt Nam là kiểu nhóm huyết thanh 8 (serotype 8) và có quan hệ họ hàng thân thiết hoặc có nguồn gốc từ các chủng virus đang lưu hành tại Trung Quốc.

Kết quả giải trình tự gen và phân tích về tỷ lệ tương đồng nucleotide của đoạn gen mã hóa protein CD2v đối với các mẫu bệnh phẩm thu thập từ các vùng sinh thái nông nghiệp khác nhau tại Việt Nam giống nhau 100% về trình tự nucleotide. Đồng thời, kết quả phân tích trình tự đoạn mã hóa protein gen CD2v cũng cho thấy các chủng virus DTLCP từ 7 vùng sinh thái nông nghiệp tại Việt Nam có độ tương đồng 100% về nucleotide khi so sánh với các chủng virus DTLCP đã được công bố tại Trung Quốc năm 2018 và 2019, kể cả chủng virus phân lập trên lợn rừng của Trung Quốc năm 2019 [3, 12] (hình 3).

Tuy nhiên, nguồn gốc của virus DTLCP đang lưu hành tại Việt Nam vẫn chưa rõ ràng, cần được nghiên cứu xa hơn để có thể đưa ra kết luận chính xác về nguồn gốc.

3.5. Kết quả xác định các biến thể của chủng virus DTLCP từ các mẫu thu thập được từ 7 vùng sinh thái nông nghiệp của Việt Nam

Để xác định biến thể của các chủng virus DTLCP, chúng tôi dựa vào việc phân tích trình tự vùng IGR (intergenic region) nằm giữa gen I73R và I329L của virus DTLCP. Vùng IGR này được sử dụng để chia các chủng virus thành các nhóm khác nhau dựa vào việc lặp lại của 10 nucleotide “GGAATATATA”. Vùng IGR có vai trò quan trọng trong việc phân tích các yếu tố liên quan đến dịch tễ học phân tử của virus

DTLCP, nó sẽ trả lời cho câu hỏi về dịch tễ học, nguồn gốc kiểu genotype của virus DTLCP ở cấp độ khu vực hoặc quốc gia, vùng IGR là một genetic marker (gen đánh dấu dịch tễ) để đánh giá nguồn gốc, mối liên quan và sự bùng phát của các chủng virus DTLCP đang lưu hành tại Việt Nam so với các chủng tham chiếu hoặc các chủng virus đang lưu hành tại các nước có chung đường biên giới [14, 15]. Cho đến nay, có 4 biến thể của virus DTLCP đã được công bố dựa trên trình tự vùng IGR nằm giữa gen I73R và I329L, gồm IGR I, IGR II, IGR III và IGR IV. Khu vực châu Á tồn tại 3 đồng biến thể bao gồm IGR I, IGR II, IGR III; trong đó phổ biến nhất là genotype II và biến thể IGR II tồn tại trên lợn nhà và genotype II, IGR I hoặc IGR III tồn tại trên lợn rừng, đã được công bố tại Hàn Quốc và Trung Quốc năm 2020 [14, 16]. Tại châu Âu, IGR IV lần đầu tiên cũng được phát hiện tại Ba Lan năm 2020 [17].

Chúng tôi đã tiến hành nhân gen và giải trình tự 140 mẫu bệnh phẩm dương tính với virus DTLCP được thu thập tại 7 vùng sinh thái nông nghiệp của Việt Nam để phân tích trình tự nucleotide vùng IGR gen I73R và I329L của virus DTLCP của một vùng sinh thái để xác định độ tương đồng vùng IGR. Kết quả giải trình tự gen TRS của 140 chủng thu thập được từ 7 vùng sinh thái nông nghiệp được đăng tải trên Ngân hàng Gen (GenBank) với mã số từ MW825209 đến MW825348. Tiếp theo, chúng tôi tiến hành phân tích sự tương đồng của vùng IGR nằm giữa gen I73R và I329L của mẫu bệnh phẩm dương tính với virus DTLCP thu thập tại các vùng sinh thái nông nghiệp khác của Việt Nam. Kết quả được trình bày tại hình 4.

Kết quả hình 4 cho thấy, các chủng phân lập ở các vùng sinh thái nông nghiệp khác như đồng bằng sông Cửu Long, Đông Nam Bộ, Nam Trung Bộ, Tây Nguyên và miền núi phía Bắc có độ tương đồng vùng IGR (nằm giữa gen I73R và I329L) 100%; và được xếp phân loại thuộc nhóm biến thể IGR II, có trình tự gồm 10 nucleotide “GGAATATATA” lặp lại 3 lần, và có độ tương đồng 100% với các chủng gây bệnh

trên lợn nhà tại Trung Quốc năm 2018 [3]. Riêng đối với vùng sinh thái nông nghiệp đồng bằng sông Hồng, chúng tôi đã tìm thấy 1 chủng virus DTLCP (Hanoi/07, đã được đăng ký trên Ngân hàng Gen với mã số đăng ký là MW054562) có trình tự gồm 10 nucleotide “GGAATATATA” lặp lại 2 lần ở vùng IGR nằm giữa gen I73R và I329L, và được phân loại thuộc biến thể

IGR I và biến thể này có độ tương đồng 100% với các chủng virus gây bệnh DTLCP trên lợn rừng của Trung Quốc là wbBS01 (MK645909), Jinlin/2018/boar (MK189457) [16] và chủng virus DTLCP phân lập tại Georgia (2007 và 2008) [4] (hình 4). Từ kết quả thu được cho thấy các chủng virus DTLCP đang lưu hành tại Việt Nam năm 2020 thuộc biến thể IGR II.

Bac Trung Bo (MW825249-268)	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAG
DB Song Cuu Long (MW825289-308)	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAG
Dong Nam Bo (MW825229-248)	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAG
Nam Trung Bo (MW825269-228)	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAG
Vung Tay Nguyen (MW825309-328)	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAG
DB Song Hong (MW825209-228)	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAG
Mien Nui Phia Bac (MW825329-348)	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAG
Hanoi/07 MW054562	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATATA ----- GAAATATATAG
wbBS01 MK645909	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATATA ----- GAAATATATAG
Jilin/2018/boar MK189457	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATATA ----- GAAATATATAG
Georgia07 FR682468	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATATA ----- GAAATATATAG
Georgia 2008/1-MH910495	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATATA ----- GAAATATATAG
Arm07_KJ620028	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATATA ----- GAAATATATAG
Abk07_KJ620029	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATATA ----- GAAATATATAG
Che07_KJ620030	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATATA ----- GAAATATATAG
Az08D_KJ620035	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATATA ----- GAAATATATAG
SY18 MH717104	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATATA ----- GAAATATATAG
Pig/HLJ/2018 MK333180	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATATAGGAATATATAGGAATATATAG
AnhuiKCQ0 MK128995	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAG
Ukr12/zapo KJ620037	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAG
Belgium 2018/1 LR536725	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAG
CN201801_MH735144	CAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAG

Hình 4. Kết quả align trình tự vùng IGR nằm giữa I73R và I329L trên gen TRS của chủng virus DTLCP phân lập từ 7 vùng sinh thái nông nghiệp của Việt Nam với các chủng DTLCP đang lưu hành trên thế giới

IV. KẾT LUẬN

Từ những kết quả trên, chúng tôi có thể kết luận rằng các chủng virus DTLCP đang lưu hành tại Việt Nam năm 2020 thuộc nhóm kiểu gen II (genotype II), kiểu huyết thanh 8 (serotype 8), biến thể IGR II (IGR II variant) và có quan hệ gần gũi với các chủng virus gây bệnh tại Trung Quốc năm 2018.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí đề tài “Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học và đề xuất giải pháp phòng, chống bệnh dịch tả lợn châu phi (ASFV) tại Việt Nam”. Mã số đề tài: ĐTDL.CN-75/19.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Galindo I, Alonso C, 2017. African Swine Fever Virus: A Review. *Viruses*, 9(5).
- Pikalo J, Schoder ME, Sehl J, Breithaupt A, Tignon M, Cay AB, Gager AM, Fischer

- M, Beer M, Blome S, 2020. The African swine fever virus isolate Belgium 2018/1 shows high virulence in European wild boar. *Transbound Emerg Dis*.
- Zhou X, Li N, Luo Y, Liu Y, Miao F, Chen T, Zhang S, Cao P, Li X, Tian K *et al.*, 2018. Emergence of African swine fever in China, 2018. *Transbound Emerg Dis*.
- Vergne T, Guinat C, Pfeiffer DU, 2020. Undetected circulation of African swine fever in wild boar, Asia. *Emerg Infect Dis*, 26(10):2480-2482.
- Dixon LK, Abrams CC, Bowick G, Goatley LC, Kay-Jackson PC, Chapman D, Liverani E, Nix R, Silk R, Zhang F, 2004. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Veterinary immunology and immunopathology*, 100(3-4):117-134.
- Malogolovkin A, Burmakina G, Tulman ER,

- Delhon G, Diel DG, Salnikov N, Kutish GF, Kolbasov D, Rock DL, 2015. African swine fever virus CD2v and C-type lectin gene loci mediate serological specificity. *The Journal of general virology*, 96(Pt 4):866-873.
7. Munoz-Moreno R, Galindo I, Cuesta-Geijo MA, Barrado-Gil L, Alonso C, 2015. Host cell targets for African swine fever virus. *Virus Res*, 209:118-127.
 8. OIE, 2012. African swine fever. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012, Chapter 281* 2012.
 9. Bastos AD, Penrith ML, Cruciere C, Edrich JL, Hutchings G, Roger F, Couacy-Hymann E, G RT, 2003. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch Virol*, 148(4):693-706.
 10. Tran HTT, Truong AD, Dang AK, Ly DV, Nguyen CT, Chu NT, Nguyen HT, Dang HV, 2020. Genetic characterization of African swine fever viruses circulating in North Central region of Viet Nam. *Transbound Emerg Dis*.
 11. Quembo CJ, Jori F, Vosloo W, Heath L, 2018. Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype. *Transbound Emerg Dis*, 65(2):420-431.
 12. Kim HJ, Cho KH, Lee SK, Kim DY, Nah JJ, Kim HJ, Kim HJ, Hwang JY, Sohn HJ, Choi JG *et al.*, 2020. Outbreak of African swine fever in South Korea, 2019. *Transbound Emerg Dis*, 67(2):473-475.
 13. Monteagudo PL, Lacasta A, Lopez E, Bosch L, Collado J, Pina-Pedrero S, Correa-Fiz F, Accensi F, Navas MJ, Vidal E *et al.*, 2017. BA71DeltaCD2: a new recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective capabilities. *Journal of virology* 2017, 91(21).
 14. Kim SH, Lee SI, Jeong HG, Yoo J, Jeong H, Choi Y, Son K, Jheong WH, 2020. Rapid emergence of African swine fever virus variants with different numbers of a tandem repeat sequence in South Korea. *Transbound Emerg Dis*.
 15. Goller KV, Malogolovkin AS, Katorkin S, Kolbasov D, Titov I, Hoper D, Beer M, Keil GM, Portugal R, Blome S, 2015. Tandem repeat insertion in African swine fever virus, Russia, 2012. *Emerg Infect Dis*, 21(4):731-732.
 16. Li L, Wang Q, Ge S, Liu Y, Liu C, Liu F, Hu Y, Li J, Bao J, Ren W *et al.*, 2018. Infection of African swine fever in wild boar, China, 2018. *Transbound Emerg Dis*.
 17. Mazur-Panasiuk N, Walczak M, Juszkievicz M, Wozniakowski G, 2020. The spillover of African swine fever in Western Poland revealed its estimated origin on the basis of O174L, K145R, MGF 505-5R and IGR I73R/I329L genomic sequences. *Viruses*, 12(10).
- Ngày nhận 19-5-2021
 Ngày phản biện 29-5-2021
 Ngày đăng 1-9-2021