

ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH NHANH NHÓM HUYẾT THANH HỌC CỦA VIRUS DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM

Trần Anh Tuấn², Trương Anh Đức¹, Nguyễn Thị Huyền¹, Hoàng Văn Tuấn¹, Chu Thị Như¹, Đinh Văn Tài², Phan Văn Thìn², Trần Thị Thanh Hà¹, Đặng Vũ Hoàng¹

TÓM TẮT

Năm 2021, Viện Thú y đã phát triển thành công phương pháp xác định nhanh nhóm huyết thanh học của virus dịch tả lợn châu Phi (DTLCP) dựa trên trình tự gen *EP402R* mã hoá protein CD2v. Kết quả nghiên cứu đã được công bố trên một tạp chí khoa học quốc tế chuyên ngành Thú y. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành ứng dụng phương pháp xác định nhanh dựa trên trình tự 90 nucleotide của gen *EP402R* mã hoá protein CD2v đã được chúng tôi công bố trước đây để xác định kiểu nhóm huyết thanh học của các chủng virus DTLCP phân lập tại 7 vùng sinh thái nông nghiệp tại Việt Nam. Kết quả nghiên cứu cho thấy chúng tôi đã thành công trong việc ứng dụng phương pháp nhận dạng nhanh nhóm huyết thanh học của virus DTLCP dựa trên trình tự gen đoạn 90 nucleotide của gen *EP402R* mã hoá protein CD2v tại 7 vùng sinh thái nông nghiệp của Việt Nam. Phương pháp xác định nhanh dựa trên trình tự 90 nucleotide của gen *EP402R* có sự tương đồng cao khi so sánh với phương pháp trước đó bằng cách phân tích đoạn gen dài 816 nucleotide của gen *EP402R* và các chủng tham chiếu đã được khẳng định kiểu nhóm huyết thanh khi sử dụng phương pháp HAI (haemadsorption inhibition assay).

Từ khoá: DTLCP, kiểu nhóm huyết thanh, PCR, giải trình tự gen, Việt Nam.

Applying rapid identification method for serotyping of African swine fever virus isolated in Viet Nam

Tran Anh Tuan, Trương Anh Duc, Nguyễn Thị Huyền, Hoàng Văn Tuấn, Chu Thị Như, Đinh Văn Tài, Phan Văn Thìn, Trần Thị Thanh Hà, Đặng Vũ Hoàng

SUMMARY

In 2021, NIVR has succeeded in the development of new method for rapid identification of ASFV serotypes based on *EP402R* gene sequence encoding CD2v protein. The studied results have been published in an international veterinary journal. In this study, we applied the rapid identification method based on the sequence 90-nucleotide of *EP402R* gene encoding CD2v protein which was published previously for determining successfully 8 serological groups of ASFV that isolated at 7 agro-ecological zones in Viet Nam. The phylogenetic analysis of the short fragment sequence (90-nucleotides) of the *EP402R* gene showed that there was the high similarity level when comparison with the previous method using a long fragment (816-nucleotides) of this gene and the well-known serotype references based on haemadsorption inhibition (HAI) assay.

Keywords: ASF, serotype, PCR, sequencing, Viet Nam.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh DTLCP là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm do virus chỉ gây bệnh ở lợn nuôi và lợn rừng; không gây bệnh cho các loài động vật khác, lợn bệnh

có khả năng chết lên đến 100% [6]; bệnh lây lan nhanh, gây thiệt hại lớn; không lây nhiễm và gây bệnh ở người; virus có sức đề kháng cao, tồn tại lâu ở ngoài môi trường và trong các sản phẩm của lợn; bệnh lây lan trực tiếp từ lợn bệnh sang lợn chưa mắc bệnh, sản phẩm lợn mang mầm bệnh, hoặc gián tiếp

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

² Chi cục Thú y vùng 3

qua các loài vật chủ trung gian mang mầm bệnh (ve, mòng, côn trùng, gặm nhấm, chim di cư,...) [18], các phương tiện vận chuyển, thức ăn chăn nuôi, dụng cụ chăn nuôi, nước uống và cả yếu tố con người [5, 6, 17, 18]. Hiện nay trên thế giới chưa có vaccin phòng bệnh, cũng như chưa có thuốc điều trị bệnh. Từ tháng 2/2019, bệnh DTLCP đã xuất hiện và lây lan trên phạm vi cả nước, gây thiệt hại rất lớn [13, 15]. Đến tháng 12 năm 2019, bệnh 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; tổng trọng lượng tiêu hủy trên 340.000 tấn, chiếm khoảng 9% tổng trọng lượng lợn của cả nước.

Trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã chứng minh rằng 140 mẫu bệnh phẩm thu thập trong năm 2020 tại 14 tỉnh thành thuộc 7 vùng sinh thái nông nghiệp tại Việt Nam thuộc nhóm genotype II, serotype 8 và vùng IGR nằm giữa gen *I73R* và *I329L* được xếp phân loại là vùng 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 [7]. Toàn bộ trình tự nucleotide của 140 chủng virus DTLCP thu thập từ 14 tỉnh thành thuộc 7 vùng sinh thái nông nghiệp đã được đăng tải trên Ngân hàng dữ liệu GenBank quốc tế với mã đăng ký lần lượt là mã số MW824929 đến MW825068 cho gen *p72*, mã số từ MW825069 đến MW825208 cho gen *CD2v* và mã số MW825209 đến MW825348 cho gen *TRS* [7].

Hiện nay, có ít nhất 8 nhóm kiểu huyết thanh của virus DTLCP được ghi nhận và một số nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng miễn dịch bảo vệ vật chủ chống lại virus DTLCP dường như đặc hiệu với kiểu huyết thanh và kiểu nhóm huyết thanh của virus DTLCP có vai trò quan trọng trong việc nghiên cứu và phát triển vaccin phòng bệnh DTLCP. Hiện nay, có 2 phương pháp xác định kiểu nhóm huyết thanh virus DTLCP bao gồm phương pháp ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HAI) và phương pháp PCR khuếch đại vùng gen 816 nucleotide của gen *EP402R* được mô tả bởi Sanna và cs. [11]. Nhưng phương pháp xác định kiểu nhóm huyết thanh thông qua phương pháp ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HAI) không thực tế cũng như không hiệu quả đối với việc phân nhóm huyết thanh của virus DTLCP đang lưu hành tại thực địa, do vậy phương pháp PCR kết hợp giải trình tự gen được coi là

phương pháp đơn giản và hiệu quả để xác định kiểu nhóm huyết thanh virus DTLCP [8, 9].

Gần đây, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã phát triển phương pháp mới để xác định kiểu nhóm huyết thanh virus DTLCP bằng phương pháp PCR kết hợp giải trình tự gen đoạn 90 nucleotide nằm trên gen *EP402R* mã hóa cho protein CD2v [12]. Kết quả cho thấy có sự tương đồng cao trong phân tích kiểu nhóm huyết thanh học dựa trên đoạn trình tự ngắn 90 nucleotide khi so với công bố trước đây của Sanna và cs. [11]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ ứng dụng phương pháp mới này để xác định kiểu nhóm huyết thanh virus DTLCP sử dụng cặp primer đặc hiệu khuếch đại vùng 90 nucleotide kết hợp giải trình tự gen của 140 mẫu bệnh phẩm dương tính virus DTLCP thu thập từ 14 tỉnh thuộc 7 vùng sinh thái nông nghiệp tại Việt Nam.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu thập mẫu bệnh phẩm

140 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: ĐTDL.CN-75/1). Mẫu được thu thập với sự đồng ý của cơ quan thú y, chủ trang trại. Quá trình thu thập mẫu tuân thủ nghiêm ngặt quy trình an toàn sinh học theo TCVN 8400-41:2019 và tiêu chuẩn OIE [10], không làm phát tán mầm bệnh.

2.2. Phân lập virus

Tế bào đại thực bào của lợn (PAM) được sử dụng để phân lập virus DTLCP được lấy từ lợn sạch âm tính với virus DTLCP, dịch tả lợn cổ điển, PCV2 và PRRS như đã mô tả trước đây [4] và theo khuyến nghị của Tổ chức Thú y Thế giới [10]. Tế bào được thu và hoàn nguyên trong môi trường Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher, Hoa Kỳ) bổ sung streptomycin (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ), ampicillin (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) và huyết thanh bào thai bê 5% (FCS, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) với nồng độ tế bào cuối cùng của 1×10^6 tế bào/mL. Virus DTLCP được phân lập trên đĩa nuôi cấy tế bào 6 giếng/đĩa (Thermo Fisher, Hoa Kỳ), chứa 2 mL huyền dịch tế bào và 50 μ L huyền dịch 10% bệnh phẩm. Đĩa phân lập được nuôi cấy trong 3 ngày ở 37°C, và 5%

CO₂, virus DTLCP thu hoạch bằng cách đóng băng và giải đông tan. Sau đó virus được tiếp đời lần 2, sử dụng 50 µl huyền dịch tế bào-virus phân lập lần 1 nuôi cấy trong 2ml môi trường tế bào PAM (1 x 10⁶ tế bào/mL), sau đó được nuôi cấy và thu hoạch như mô tả cho lần phân lập đầu tiên. Virus DTLCP tiếp đời lần 3, sử dụng 50 µl huyền dịch tế bào-virus phân lập lần 2 nuôi cấy trong 2ml môi trường tế bào PAM (1 x 10⁶ tế bào/mL) ở 37°C và 5% CO₂. Sau 24 giờ nuôi cấy 20µl 1% hồng cầu lợn (RBC) được bổ sung vào giếng tiếp đời virus. Kiểm tra khả năng hấp phụ hồng cầu (HAD) của các tế bào PAM nhiễm virus DTLCP sau 5-6 ngày gây nhiễm theo hướng dẫn của Tổ chức Thú y Thế giới [10].

2.3. Phương pháp realtime-PCR, PCR nhân gen, tinh sạch DNA và giải trình tự gen

Phương pháp realtime-PCR xác định mẫu dương tính virus DTLCP được thực hiện theo hướng dẫn của OIE [10].

Phương pháp PCR nhân gen sử dụng cặp mồi đặc hiệu để phân tích kiểu nhóm huyết thanh virus DTLCP được công bố trước đây bởi Sanna và cs. [11] có trình tự:

CD2v-F: 5'-CCTGCTACTCCCCCAATATCAC-3'

CD2v-R: 5'-ACTACCCAATATCCCGCCAT-3'

Và cặp mồi được phát triển bởi nhóm nghiên cứu dùng trong nghiên cứu này của chúng tôi [12]:

CD2v-F2: 5'-ATTTTTCCTCATAATGATGATTTGAT-3'

CD2v-R2: 5'-GTGATATTTGGGGGAGTAGCAGG-3'

Chu trình nhiệt bao gồm 94°C trong 10 phút; 40 chu kỳ của 94°C trong 15 giây, 60°C trong 30 giây và 72°C trong 30 giây; và sau cùng 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên agarose 2% và hiển thị trên đèn UV.

Sản phẩm được điện di trên gel agarose 1,5%. Để phân tích trình tự gen CD2v của 140 chủng virus DTLCP thu thập được từ 7 vùng sinh thái nông nghiệp tại Việt Nam, sản phẩm PCR có kích thước 816bp và 107bp tương ứng với từng cặp primer 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).

2.4. Phương pháp phân tích trình tự nucleotide và xây dựng cây phả hệ

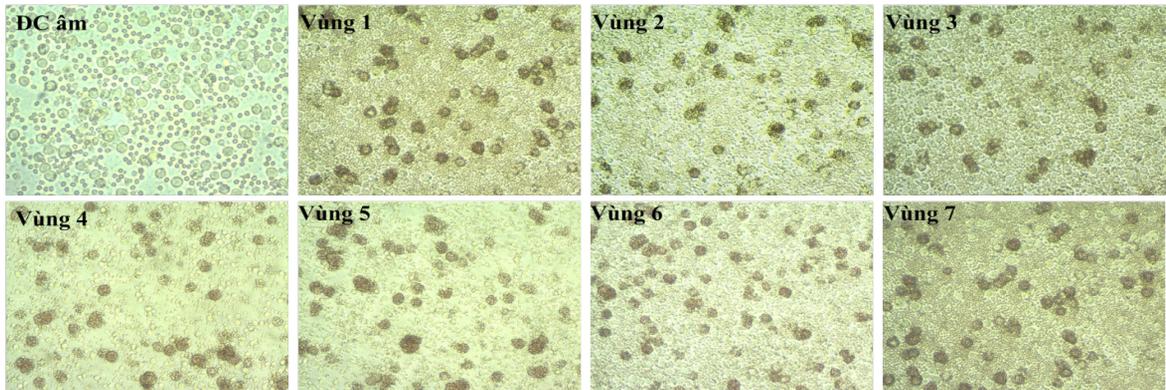
Phương pháp phân tích kết quả giải trình tự nucleotide chúng tôi dựa vào: (i) Database của chủng virus DTLCP đã công bố trên GenBank (NCBI), (ii) Phần mềm BioEdit, FinchTV, và DNASTar phân tích, so sánh sự tương đồng, đột biến của các chủng virus DTLCP phân lập tại Việt Nam và các chủng tham chiếu trên 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 phân lập virus DTLCP và phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD) từ mẫu thực địa

Phương pháp phân lập virus kết hợp HAD theo khuyến cáo của OIE và FAO là phương pháp vàng và cuối cùng được dùng làm tham chiếu để xác nhận kết quả dương tính của các phương pháp khác như Ag-Elisa, PCR truyền thống, realtime-PCR, hoặc miễn dịch huỳnh quang đã dùng trước đó. Trong nghiên cứu này, 140 mẫu bệnh phẩm được xác định là dương tính với virus DTLCP từ 7 vùng sinh thái nông nghiệp tại Việt Nam, thuộc nhóm kiểu gen genotype II và kiểu nhóm huyết thanh serotype 8 được phân lập trên tế bào PAM theo quy trình đã công bố trước đây của nhóm nghiên cứu [12, 14, 15], được thể hiện qua hình 1.

Kết quả tại hình 1 cho thấy, các tế bào PAM nhiễm virus DTLCP trên bề mặt có nhiều tế bào hồng cầu bám vào sau 4-5 ngày gây nhiễm. Đây là bệnh tích điển hình của virus DTLCP khi phân lập trên tế bào PAM kết hợp phản ứng HAD theo hướng dẫn của OIE và FAO. Những giếng có kết quả dương tính, hấp phụ hồng cầu trên bề mặt tế bào PAM, chúng tôi tiến hành tách chiết DNA virus, và thực hiện kiểm tra bằng phản ứng realtime-PCR. Kết quả hình realtime-PCR cho thấy, các mẫu bệnh phẩm từ thực địa tại 7 vùng sinh thái nông nghiệp tại Việt Nam phân lập dương tính với virus DTLCP (kết quả không trình bày trong bài báo này).



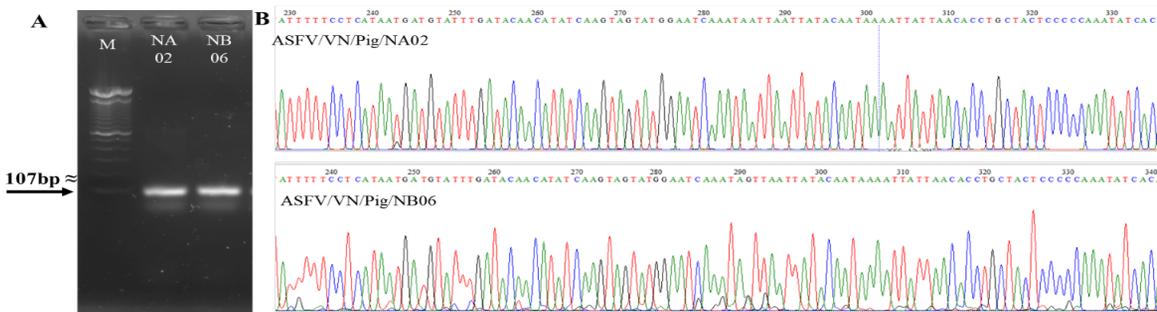
Hình 1. Kết quả phân lập virus DTLCP trên môi trường tế bào PAM kết hợp phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD)

Ghi chú: Vùng 1: Miền núi phía Bắc, vùng 2: Đồng bằng Trung du Bắc bộ, vùng 3: Bắc Trung Bộ, vùng 4: Nam Trung Bộ, vùng 5: Tây Nguyên, vùng 6: Đông Nam Bộ, vùng 7: Đồng bằng sông Cửu Long

3.2. Kết quả nhân gen và giải trình tự đoạn gen 90 nucleotide dùng trong xác định kiểu nhóm huyết thanh từ mẫu thực địa

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng cặp mồi đặc hiệu theo công bố trước đây của nhóm nghiên cứu [12]. Kết quả tối ưu hóa điều kiện phản ứng PCR nhân gen đoạn 107 nucleotide trong đó có chứa đoạn 90 nucleotide cần phân tích để phục vụ giải trình tự gen được thể hiện qua hình 2A. Kết quả hình 2A cho

thấy, vùng khuếch đại 107 nucleotide của gen *CD2v* của virus DTLCP có kích thước khoảng 107 bp theo như thiết kế được nhân lên bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu và các điều kiện như đã được mô tả trong phần phương pháp. Kết quả trên hình 2 cho thấy xuất hiện một băng DNA có kích thước khoảng trên 100bp tương đương với kích thước của đoạn gen cần nhân lên. Như vậy sản phẩm PCR thu được là đặc hiệu và có thể sử dụng cho việc tinh sạch DNA để phục vụ giải trình tự gen.



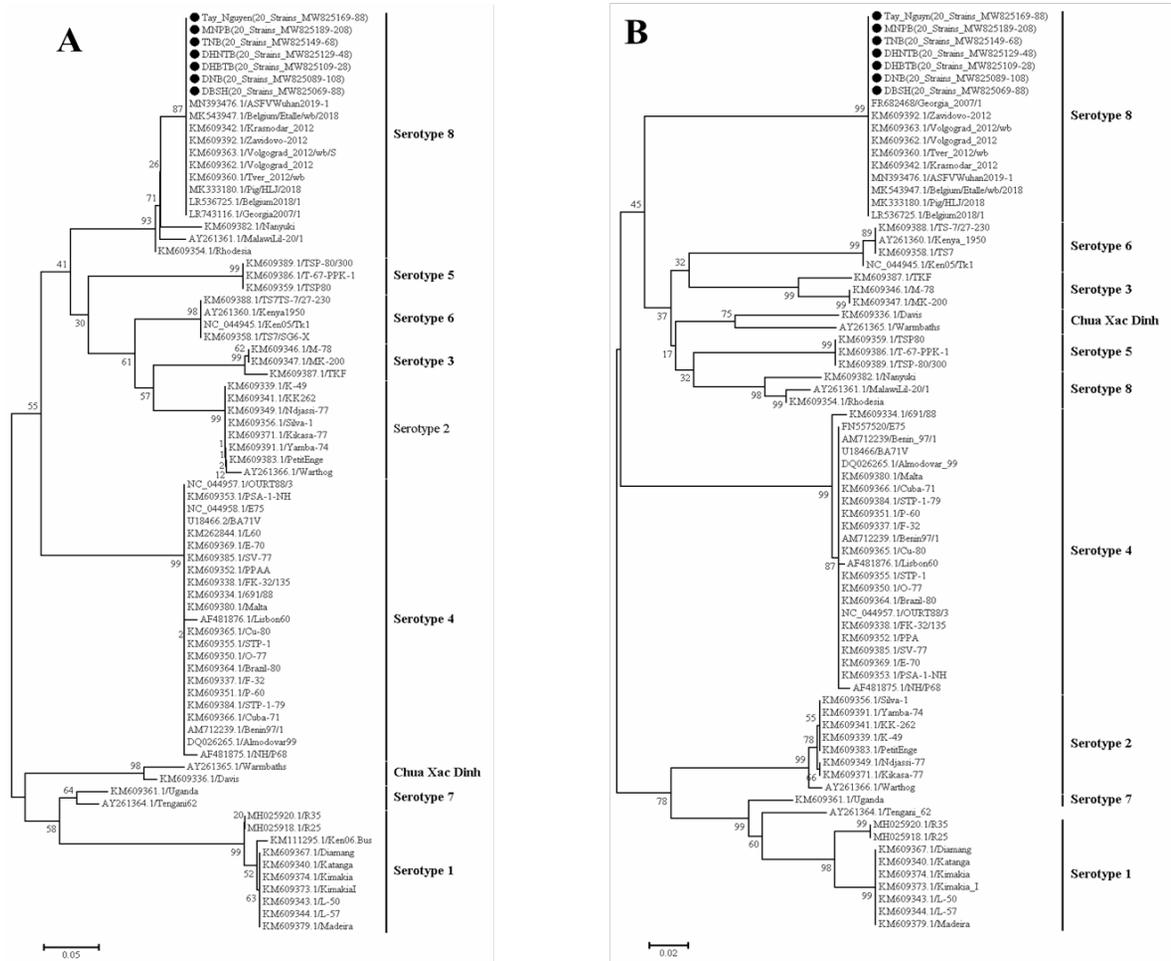
Hình 2. Kết quả chạy PCR và giải trình tự gen đoạn 107 nucleotide từ các chủng virus DTLCP phân lập tại Việt Nam

Chúng tôi tiến hành nhân gen giải trình tự đoạn 107 nucleotide gen *CD2v* của 140 chủng virus DTLCP của 14 tỉnh trên cả nước thuộc 7 vùng sinh thái nông nghiệp, minh họa kết quả giải trình tự gen

được thể hiện qua hình 2B. Kết quả giải trình tự gen đoạn 107 nucleotide cho thấy, trình tự thu được là rõ ràng và không bị nhiễu tín hiệu (hình 2B). Từ kết quả giải trình tự gen này, chúng tôi sẽ tiến hành phân tích

sau gây nhiễm [1-3, 9]. Do vậy, việc phát triển các phương pháp nghiên cứu mới để xác định kiểu gen và kiểu nhóm huyết thanh virus DTLCP là cần thiết và quan trọng, trong đó phương pháp đơn giản dễ áp dụng nhưng hiệu quả cao là ưu tiên hàng đầu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thành công trong việc ứng dụng phương pháp nhận dạng nhanh nhóm huyết thanh học của virus DTLCP dựa trên trình tự gen đoạn 90 nucleotide

của gen *EP402R* mã hoá protein CD2v tại 7 vùng sinh thái nông nghiệp của Việt Nam. Đồng thời, các kết quả cũng cho thấy phương pháp xác định nhanh nhóm huyết thanh học của virus DTLCP được phát hiện bởi nhóm nghiên cứu là phù hợp cho các nghiên cứu các đặc điểm dịch tễ học phân tử của virus DTLCP trong tương lai tại Việt Nam cũng như các quốc gia và vùng lãnh thổ có sự hiện diện của virus DTLCP.



Hình 4. Cây phả hệ đoạn gen 90 nucleotide và 816 nucleotide của 140 chủng virus DTLCP thu thập tại 7 vùng sinh thái nông nghiệp tại Việt Nam

(A) Cây phả hệ phân tích 107 nucleotide đoạn gen CD2v và (B) cây phả hệ phân tích đoạn 816 nucleotide đoạn gen CD2v.

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

1. Borca MV, Carrillo C, Zsak L, Laegreid WW, Kutish GF, Neilan JG, Burrage TG, Rock DL, 1998. Deletion of a CD2-like gen, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. *Journal of virology* 72:2881-2889
2. Burmakina G, Malogolovkin A, Tulman ER, Zsak L, Delhon G, Diel DG, Shobogorov NM, Morgunov YP, Morgunov SY, Kutish GF, Kolbasov D, Rock DL, 2016. African swine fever virus serotype-specific proteins are significant protective antigens for African swine fever. *The Journal of general virology* 97:1670-1675
3. Burmakina G, Malogolovkin A, Tulman ER, Xu W, Delhon G, Kolbasov D, Rock DL, 2019. Identification of T-cell epitopes in African swine fever virus CD2v and C-type lectin proteins. *The Journal of general virology* 100:259-265
4. Carrascosa AL, Bustos MJ, de Leon P, 2011. Methods for growing and titrating African swine fever virus: field and laboratory samples. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 26:Unit 26 14
5. Cubillos C, Gomez-Sebastian S, Moreno N, Nunez MC, Mulumba-Mfumu LK, Quembo CJ, Heath L, Etter EM, Jori F, Escribano JM, Blanco E, 2013. African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples. *Virus Res* 173:159-167
6. Galindo I, Alonso C, 2017. African swine fever virus: A review. *Viruses* 9
7. Ha TTT, TTT, Truong AD, Ly DV, Hoang VT, Chu TN, Nguyen TH, Dang AK, Bui TTN, Bui TAD, Nguyen VT, Hoang. DV, 2021. Đặc điểm dịch tễ học phân tử của virus Dịch tả lợn Châu phi lưu hành tại Việt Nam năm 2020. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y XXVIII*:16-36
8. Malogolovkin A, Burmakina G, Titov I, Sereda A, Gogin A, Baryshnikova E, Kolbasov D, 2015. Comparative analysis of African swine fever virus genotypes and serogroups. *Emerg Infect Dis* 21:312-315
9. 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 gen loci mediate serological specificity. *The Journal of general virology* 96:866-873
10. OIE, 2019. African swine fever (infection with African swine fever virus). *OIE Terrestrial Manual* 2019, Chapter 3.8.1
11. Sanna G, Dei Giudici S, Bacciu D, Angioi PP, Giammarioli M, De Mia GM, Oggiano A, 2017. Improved strategy for molecular characterization of African swine fever viruses from Sardinia, based on analysis of p30, CD2V and I73R/I329L variable regions. *Transbound Emerg Dis* 64:1280-1286
12. Thanh THT, Duc TA, Viet LD, Van HT, Thi NC, Thi CN, Thi NH, Vu DH, 2021. Rapid identification for serotyping of African swine fever virus based on the short fragment of the EP402R gene encoding for CD2-like protein. *Acta Veterinaria* 71:98-106
13. 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*
14. Tran HTT, Truong AD, Dang AK, Ly DV, Nguyen CT, Chu NT, Hoang TV, Nguyen HT, Dang HV, 2021. Circulation of two different variants of intergenic region (IGR) located between the I73R and I329L genes of African swine fever virus strains in Vietnam. *Transbound Emerg Dis*
15. Truong AD, Ly DV, Vu TH, Hoang VT, Nguyen TC, Chu TN, Nguyen HT, Nguyen TV, Pham NT, Tran HTT, Dang HV, 2020. Unexpected cases in field diagnosis of African swine fever virus in Vietnam: The needs consideration when performing molecular diagnostic tests. *Open Veterinary Journal* 10:189-197
16. Van Heerden J, Malan K, Gadaga BM, Spargo RM, 2017. Reemergence of African Swine Fever in Zimbabwe, 2015. *Emerg Infect Dis* 23:860-861
17. Zsak L, Borca MV, Risatti GR, Zsak A, French RA, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Callahan JD, Nelson WM, Rock DL, 2005. Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 43:112-119

Ngày nhận 20-10-2021

Ngày phản biện 12-11-2021

Ngày đăng 1-3-2022