

MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA CHỦNG VIRUS GÂY BỆNH GIẢ ĐẠI PHÂN LẬP Ở LỢN NUÔI TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Văn Giáp¹, Nguyễn Bá Hiên², Huỳnh Thị Mỹ Lệ¹, Đặng Hữu Anh¹,
Lê Văn Trường¹, Vũ Thị Ngọc¹, Cao Thị Bích Phượng¹, Lê Huỳnh Thanh Phương^{3*}

¹Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Hội Thú y Việt Nam

³Ban Khoa học Công nghệ, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: lhtphuong@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 22.12.2023

Ngày chấp nhận đăng: 12.04.2024

TÓM TẮT

Bệnh giả dại đã được biết đến ở Việt Nam từ lâu và hiện vẫn đang là một trong những bệnh được người chăn nuôi đặc biệt quan tâm. Mặc dù đã xuất hiện thêm biến chủng của virus ở nhiều nước trên thế giới từ năm 2010, nhưng lại có rất ít thông tin về bệnh và virus lưu hành ở nước ta cho đến nay. Nghiên cứu này nhằm góp phần làm rõ một số đặc tính sinh học và sinh học phân tử cơ bản của chủng phân lập PRV.PT.001. Chủng phân lập thích nghi nhanh, gây bệnh tích thể hợp bào điển hình trên môi trường tế bào Vero và đạt hiệu giá tương đối cao sau 7 lần tiếp đời ($10^{6.58}$ TCID₅₀/ml). Chủng phân lập mang đặc điểm chung của virus gây bệnh giả dại: độc với thỏ và lợn con, gây bệnh tích ổn định ở hệ hô hấp và phân bố rộng rãi ở nhiều cơ quan nội tạng. Về đặc điểm di truyền, chủng PRV.PT.001 thuộc genotype 2, mang đặc trưng đột biến thêm - xóa của genotype này ở 3/4 glycoprotein bề mặt được khảo sát (gB, gC, gD); nhưng có đặc trưng đột biến thêm - xóa của genotype 1 ở glycoprotein gE.

Từ khóa: Virus gây bệnh giả dại, lợn, đặc tính sinh học, sinh học phân tử.

Biological and Molecular Biological Characterizations of a Pseudorabies Virus Strain Isolated from Pigs in Vietnam

ABSTRACT

Pseudorabies has been known in Vietnam for a long time and is still one of the most devastating diseases of particular concern of animal breeders. Despite the emerging and prevailing of variants the virus in many countries around the world since 2010, to date, there is scarce information about the disease as well as the virus circulating in Vietnam. This study aimed to clarify some basic biological and molecular characteristics of an isolate, PRV.PT.001 strain. The isolated strain quickly adapted, induced typical syncytium on Vero cells and reached a relatively high titer after 7 passages ($10^{6.58}$ TCID₅₀/ml). The isolate had common characteristics of the virus that causes pseudorabies: it is pathogenic to rabbits and piglets, induces consistent lesions in the respiratory tract, and is widely distributed in many internal organs. Regarding genetic characteristics, strain PRV.PT.001 belongs to genotype 2, carrying typical insertion-deletion mutations in 3/4 of the investigated surface glycoproteins (gB, gC, gD); but has the characteristic insertion-deletion mutation of genotype 1 in gE glycoprotein.

Keywords: Pseudorabies virus, pig, biology, molecular biology.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Suid Herpesvirus 1 (thường được gọi là Pseudorabies virus, PRV) là một loại herpesvirus gây ra bệnh giả dại (PR) hay bệnh Aujeszky's (AD) ở lợn (Pomeranz & cs., 2005).

PRV thuộc giống *Varicelovirus*, dưới họ (subfamily) *Alphaherpesvirinae*, họ *Herpesviridae* (Fauquet & cs., 2005). Về vật chất di truyền, PRV có bộ gen là ADN sợi đôi, với kích thước khoảng 150kb. Dựa vào trình tự gen mã hóa glycoprotein, PRV được chia thành

hai genotype/clade là genotype 1 và genotype 2 (Zhai & cs., 2019; Tan & cs., 2021). Có nhiều loại protein mã hóa bởi PRV đã được xác định. Trong đó, protein liên quan tới độc lực của PRV được chia thành ba nhóm lớn: nhóm 11 glycoprotein bề mặt (gB-gN) đóng vai trò trong việc xâm nhiễm và phát tán giữa các tế bào cũng như tác động tới hệ miễn dịch của vật chủ (Klupp & cs., 2004); nhóm protein có bản chất là các enzyme sao chép ADN virus và nhóm protein tham gia quá trình đóng gói hạt virus hoàn thiện (Mulder & cs., 1997).

Bệnh giả dại ở lợn có triệu chứng lâm sàng rất đa dạng: rối loạn hô hấp, triệu chứng thần kinh, rối loạn sinh sản, với tỷ lệ chết cao, đặc biệt là ở lợn con theo mẹ (Pomeranz & cs., 2005; Bo & Li, 2022). Cho đến nay, bệnh vẫn lưu hành ở nhiều nước chăn nuôi lợn trên thế giới, đặc biệt là vùng chăn nuôi với mật độ cao như châu Mỹ La Tinh và châu Á (Muller & cs., 2011). Ở Việt Nam, bệnh giả dại được thông báo xuất hiện từ những năm 1980 ở một số tỉnh miền Nam (Lê Hồng Phong, 1996). Trước những năm 2000, có hai công trình nghiên cứu về bệnh giả dại, trong đó các tác giả đã làm rõ vai trò của PRV trong Hội chứng rối loạn sinh sản ở lợn ở miền Bắc và miền Nam và đã phân lập, giám định một số đặc tính sinh học của PRV (Vũ Ngọc Chiêu, 1994; Lê Hồng Phong, 1996). Kết quả xét nghiệm mẫu thu thập trong khoảng các năm từ 1999-2003 ở các tỉnh thuộc đồng bằng sông Cửu Long tiếp tục khẳng định sự hiện diện của PRV trên đàn lợn (Kamakawa & cs., 2006). Tuy nhiên, cho đến nay vẫn còn rất ít những công bố khoa học liên quan đến virus gây bệnh giả dại ở Việt Nam. Do đó, khảo sát đặc tính sinh học, sinh học phân tử của virus là cần thiết, không chỉ nhằm cập nhật thông tin về PRV tại Việt Nam giai đoạn hiện nay, mà còn hướng tới ứng dụng trong chẩn đoán và sản xuất vaccin phòng bệnh.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Chủng virus gây bệnh giả dại (PRV.PT.001) được phân lập từ não của lợn con

theo mẹ có biểu hiện bệnh tại Phú Thọ năm 2021. Chủng virus phân lập sử dụng trong nghiên cứu này đã được chẩn đoán bằng phương pháp RT-PCR/ PCR (Xu & cs., 2012) và cho kết quả âm tính với virus gây bệnh tai xanh (PRRS), dịch tả lợn cổ điển (CSF), PCV2.

- Động vật thí nghiệm: (1) Lợn sơ sinh chưa được bú sữa đầu, khỏe mạnh, được nuôi bộ bằng sữa bột cho trẻ sơ sinh và được chăm sóc trong quây úm. (2) Thỏ (2kg) khỏe mạnh. Động vật thí nghiệm được theo dõi trong 3 ngày, khỏe mạnh trước khi gây nhiễm.

- Môi trường dùng xác định hiệu giá virus: DMEM (Gibco, 11965092) có bổ sung 5% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, 16140071), dòng tế bào Vero. Vật tư tiêu hao khác: đĩa nhựa 96 giếng vô trùng, khay nhựa và đầu tip vô trùng.

- Sinh phẩm, hóa chất cho phản ứng PCR: kit tách ADN/ARN (Patho Gene-spin DNA/RNA Extraction Kit, 17154, iNtRON), kit PCR (Maxime PCR PreMix kit, i-StarMAX II, 25281, iNtRON).

- Cặp mồi phát hiện PRV (PRVF-GGGGTTGGACAGGAAGGACACCA, PRVR-AACCAGCTGCACGCGCTCAA) được tham khảo từ nghiên cứu đã công bố (Xu & cs., 2012).

- Trình tự gen mã hóa protein gB, gC, gD và gE của các chủng PRV đã biết genotype được thu thập từ GenBank. Danh mục các chủng (Bảng 1) được chọn theo công bố trước đây (Huang & cs., 2020). Trình tự 4 gen kể trên của chủng PRV.PT.001 được thừa hưởng từ nghiên cứu giải trình tự toàn bộ hệ gen PRV của nhóm tác giả, với mã số GenBank: PP316162-PP316165. Hệ gen của chủng PRV.PT.001 được giải mã bằng phương pháp Shotgun metagenomics sequencing tại công ty TNHH Khoa học KTEST (kết quả không trình bày).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định hiệu giá virus

Hiệu giá virus được xác định bằng phương pháp pha loãng tối hạn, mô tả tóm tắt qua các bước sau. Bước 1: huyền dịch virus được pha loãng bằng môi trường DMEM không chứa FBS

theo cơ số 10 (từ 10^{-1} đến 10^{-8}). Bước 2: chuẩn bị tế bào Vero trên đĩa 96 giếng, có mật độ tế bào phủ đáy đạt 70-80%. Bước 3: mỗi độ pha loãng được gây nhiễm vào 3 giếng, mỗi giếng gây nhiễm bằng 100µl huyền dịch virus pha loãng. Bước 4: các đĩa tế bào sau gây nhiễm được nuôi trong tủ ấm 37°C và duy trì nồng độ 5% CO₂. Bước 5: đọc bệnh tích tế bào (CPE) là các đám tế bào co tròn hoặc thể hợp bào hình thành sau gây nhiễm 96-120 giờ. Bước 6: tính toán kết quả TCID₅₀ theo công thức Spearman - Karber (Lei & cs., 2021): $\text{Log TCID}_{50} = \text{Log}(\text{độ pha loãng lớn nhất cho CPE } 100\%) + 0,5 - \text{tổng số giếng cho CPE/số giếng tế bào được gây nhiễm ở mỗi độ pha loãng}$.

2.2.2. Xác định khả năng gây bệnh của virus

Động vật thí nghiệm (2 lợn) và (2 thỏ) được gây nhiễm với chủng virus PRV.PT.001 với liều 10^5 TCID₅₀/ml lần lượt bằng đường tiêu hóa và đường dưới da. Thỏ và lợn đối chứng còn lại được tiêm DMEM. Động vật nhóm đối chứng và nhóm thí nghiệm được nuôi ở phòng riêng tại khu nuôi động vật của Bộ môn Vi sinh vật - Truyền nhiễm, Khoa Thú y (tháng 6/2022). Sau khi gây nhiễm, theo dõi trong vòng 72 giờ các biểu hiện của động vật: run rẩy, co giật, bơi chèo (đối với lợn); biểu hiện cắn đứt lông - da, ngứa gãi (đối với thỏ). Mổ khám kiểm tra bệnh tích đại thể ở động vật thí nghiệm theo TCVN 8402:2010.

Bảng 1. Thông tin về chủng virus tham chiếu dùng trong nghiên cứu

GenBank	Tên chủng	Genotype*	Trình tự gen (protein được mã hóa)			
			UL27 (gB)	UL44 (gC)	US6 (gD)	US8 (gE)
JF797217	Bartha	1	✓	✓	✓	Không có
KT983810	Hercules	1	✓	✓	✓	✓
KT983811	Kolchis	1	✓	✓	✓	✓
JF797218	Kaplan	1	✓	✓	✓	✓
MK080279	HLJ-2013	1 2	✓	✓	✓	✓
KC981239	BJ/YT	2	✓	✓	✓	Không có
KJ789182	TJ	2	✓	✓	✓	✓
KP098534	HeN1	2	✓	✓	✓	✓
KP257591	JS-2012	2	✓	✓	✓	✓
KM189914	HNB	2	✓	✓	✓	✓
KM189912	HNX	2	✓	✓	✓	✓
KP722022	HN1201	2	✓	✓	✓	✓
KT824771	HLJ8	2	✓	✓	✓	✓
KU057086	HB1201	2	✓	✓	✓	✓
MH582511	GD0304	2	✓	✓	✓	✓
KM189913	Fa	2	✓	✓	✓	✓
KT809429	SC	1 2	✓	✓	✓	✓
KU315430	Ea	2	✓	✓	✓	✓
KU552118	LA	2	✓	✓	✓	✓
LC342744	RC1	2	✓	✓	✓	✓
AP018925	MY-1	1 2	✓	✓	✓	✓

Ghi chú: *: Chủng tái tổ hợp gen tự nhiên thuộc về genotype khác nhau tùy thuộc vào trình tự gen được dùng để phân loại.

2.2.3. Xác định sự phân bố virus ở động vật thí nghiệm

Phương pháp lấy mẫu bệnh phẩm: mẫu bệnh phẩm để nghiên cứu sự phân bố của PRV trong các cơ quan nội tạng của động vật thí nghiệm (gây nhiễm ở mục 2.2.2) được lấy theo quy chuẩn QCVN 01-83:2011/BNNPTNT. Một số lưu ý bao gồm: (1) dùng riêng kéo, kẹp để lấy mỗi loại nội tạng (Bảng 2); (2) lấy 1 gram mỗi cơ quan nội tạng, sau đó đồng nhất bằng cối - chày sứ và hoàn nguyên thành huyền dịch 10% trong nước muối sinh lý; (3) mẫu swab được hòa trong 500µl nước muối sinh lý; máu đọng ở tâm nhĩ được lấy và chất huyết thanh.

Phương pháp thực hiện phản ứng PCR: ADN tổng số dùng cho phản ứng PCR được tách chiết bằng kit (mục 2.1) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu (mục 2.1) được thực hiện với điều kiện sau: chu trình nhiệt: biến tính 94°C/5 phút; 40 chu kỳ gồm biến tính 94°C/15 giây, gắn mồi 55°C/20 giây và kéo dài 72°C/30 giây. Sản phẩm PCR được điện di trong agarose gel 2% có bổ sung thuốc nhuộm ADN. Mẫu cho vạch đặc hiệu được xác định là dương tính với PRV.

2.2.4. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học phân tử của virus

Bốn gen mã hóa glycoprotein bề mặt [UL44 (gB), UL27 (gC), US6 (gD), US8 (gE)] được lựa chọn để tìm hiểu đặc điểm sinh học phân tử của chủng PRV.PT.001. Các gen kể trên thường được sử dụng trong nghiên cứu phân loại virus (Minamiguchi & cs., 2019; Huang & cs., 2020; Tan & cs., 2021).

Phân nhóm di truyền của chủng virus được xác định bằng phương pháp xây dựng cây phát sinh chủng loại. Tóm tắt như sau: (1) căn chỉnh trình tự gen thu được với các trình tự tham chiếu đã biết bằng phần mềm MAFFT (Katoh & Standley, 2013); (2) cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm Fasttree (Price & cs., 2010); (3) hiển thị cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm FigTree v.1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Mức tương đồng trình tự amino acid được tính bởi phần mềm BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999).

Ma trận chứa giá trị tương đồng (sequence identity matrix) được biểu diễn dưới dạng heatmap bằng công cụ online tại địa chỉ <http://heatmapper.ca/expression/>.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc tính nuôi cấy của chủng PRV.PT.001

Khả năng phát triển và gây bệnh tích tế bào của chủng PRV.PT.001 được trình bày ở hình 1 và hình 2.

Kết quả cho thấy chủng virus bắt đầu gây bệnh tích tế bào (CPE) từ đời nuôi cấy thứ 2 (đường nét đứt màu đỏ). Quan sát thấy thay đổi về kiểu CPE: đời 2-4 chủ yếu là hiện tượng từng tế bào co tròn, nổi trên thảm tế bào; từ đời thứ 5 trở đi, CPE chủ yếu là hiện tượng hợp bào với nhiều nhân (khoanh tròn, hình 1). PRV được biết có khả năng phát triển trên nhiều loại tế bào, trong đó có tế bào Vero (Katayama & cs., 1998). Các chủng virus hoang dại có thể gây ra CPE là thể hợp bào trên tế bào thận bò, khỉ, chó, mèo,... nhưng lại hình thành CPE dưới dạng tế bào co tròn trên môi trường tế bào thận lợn (Katayama & cs., 1998). Đối với chủng PRV.PT.001, sau vài đời thích nghi trên tế bào Vero, virus đã gây CPE điển hình là thể hợp bào. Ở một nghiên cứu khác, các chủng phân lập có độc lực cao đều tạo ra thể hợp bào (Bitsch, 1980). Kết hợp đặc điểm kể trên với thông tin chủng virus được phân lập từ não lợn con theo mẹ có triệu chứng thần kinh, có thể dự đoán PRV.PT.001 là chủng độc lực cao. Khả năng phát triển trên tế bào Vero của chủng PRV.PT.001 còn phản ánh thông qua hiệu giá virus ở mỗi lần tiếp đời (Hình 2).

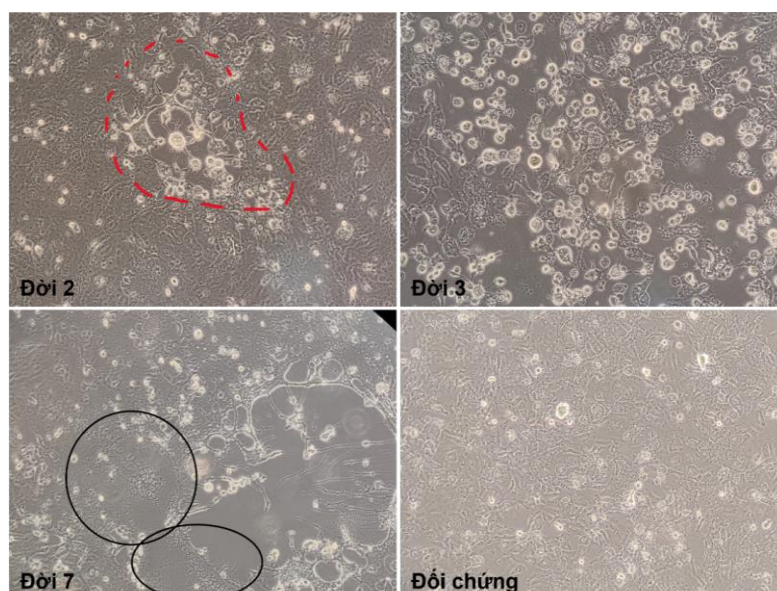
Kết quả khảo sát trong 7 lần tiếp đời, nhận thấy hiệu giá virus tăng sau lần tiếp đời thứ 2 và có xu hướng ổn định (chênh lệch hiệu giá trung bình giữa hai lần tiếp đời gần nhau không quá 1 độ pha loãng). Hiệu giá trung bình ở đời 7 xác định được là $10^{6,58}$ TCID₅₀/ml. Những nghiên cứu trước đây cho thấy đây cũng là khoảng hiệu giá của chủng PRV mới thích nghi trên môi trường tế bào (Wu & cs., 2020). Ở những lần tiếp đời cao (50, 91 hoặc 120 đời) PRV được biết nhân lên tốt hơn và cho hiệu giá từ

10^8 TCID₅₀/ml trở lên tại thời điểm 36 giờ sau gây nhiễm (Ye & cs., 2018). Do vậy, trong trường hợp hội đủ điều kiện để phát triển thành chủng giống vaccin, có thể nâng cao hơn hiệu giá chủng PRV.PT.001 bằng cách tiếp đời.

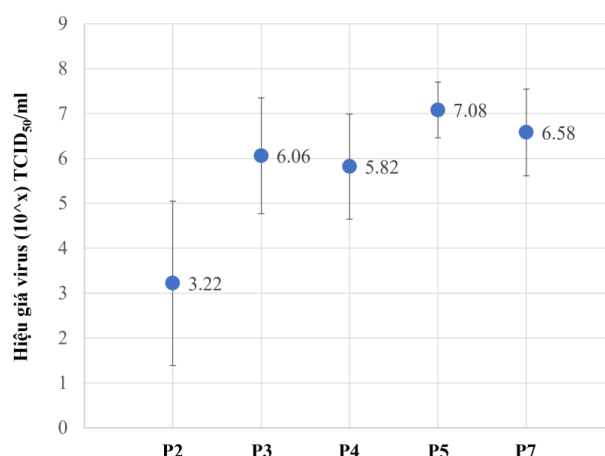
3.2. Khả năng gây bệnh của chủng PRV.PT.001 ở động vật

PRV có khả năng gây bệnh cho nhiều loài động vật (lợn, thỏ, chó, ngựa, chuột,...); với mức độ trầm trọng của bệnh phụ thuộc vào nhiều yếu tố, ví dụ như: độc lực virus, liều nhiễm, lứa tuổi và loài động vật,... (Bo & Li, 2022). Nghiên cứu này đã thăm dò khả năng gây bệnh của

chủng virus ở thỏ và lợn sơ sinh chưa được bú sữa đầu. Nhóm đối chứng (tiêm DMEM) không có biểu hiện lâm sàng, không có bệnh tích (Hình 3E-3L) và xét nghiệm PCR cho kết quả âm tính (cột 3, cột 6 bảng 2). Ở nhóm thỏ, sau gây nhiễm 48 giờ bắt đầu xuất hiện biểu hiện ngứa, cắn trầy da ở chân và vùng lưng (Hình 3A), không thấy có bọt mép. Biểu hiện trên cũng được quan sát thấy trong thí nghiệm với chủng RC/79 (Sabini & cs., 2000). Ở nhóm lợn, triệu chứng run rẩy bắt đầu quan sát thấy ở ngày thứ 2 sau gây nhiễm, biểu hiện co giật không rõ và không quan sát thấy hiện tượng sùi bọt mép. Toàn bộ thỏ và lợn chết trong vòng 72 giờ sau gây nhiễm.



Hình 1. Khả năng gây bệnh tích tế bào của chủng PRV.PT.001 qua các đời



Hình 2. Biến động hiệu giá virus của chủng PRV.PT.001 qua các đời

Về bệnh tích đại thể, trong điều kiện thí nghiệm này, với cả thỏ và lợn, chủng PRV.PT.001 gây bệnh tích tập trung ở phổi với biểu hiện phổi sung huyết nặng, có màu đỏ tím, bề mặt bóng và không bị xẹp (Hình 3C, 3O). Trong khi đó phổi của nhóm đối chứng (Hình 3G, 3K) đều có màu hồng nhạt, xốp và xẹp khi bóc tách khỏi xoang phế mạc. Bệnh tích tập trung ở phổi quan sát được phù hợp với nhận xét rằng trong điều kiện thí nghiệm, PRV luôn gây viêm phổi ở lợn (Baskerville, 1973). Bệnh tích đáng kể khác là ở xương ống cuộn với biểu hiện sung huyết nặng ở thỏ (Hình 3B) và sung huyết nhẹ ở lợn (Hình 3N). Ở não, bệnh tích đại thể nhìn chung không rõ, với biểu hiện sung huyết nhẹ ở lợn (Hình 3P). Hạch amidal, quan sát được đám hoại tử (mũi tên, hình 3M) ở 1/2 lợn gây nhiễm. Các cơ quan khác của cả thỏ và lợn nhìn chung không có biến đổi bệnh lý đại thể (không trình bày).

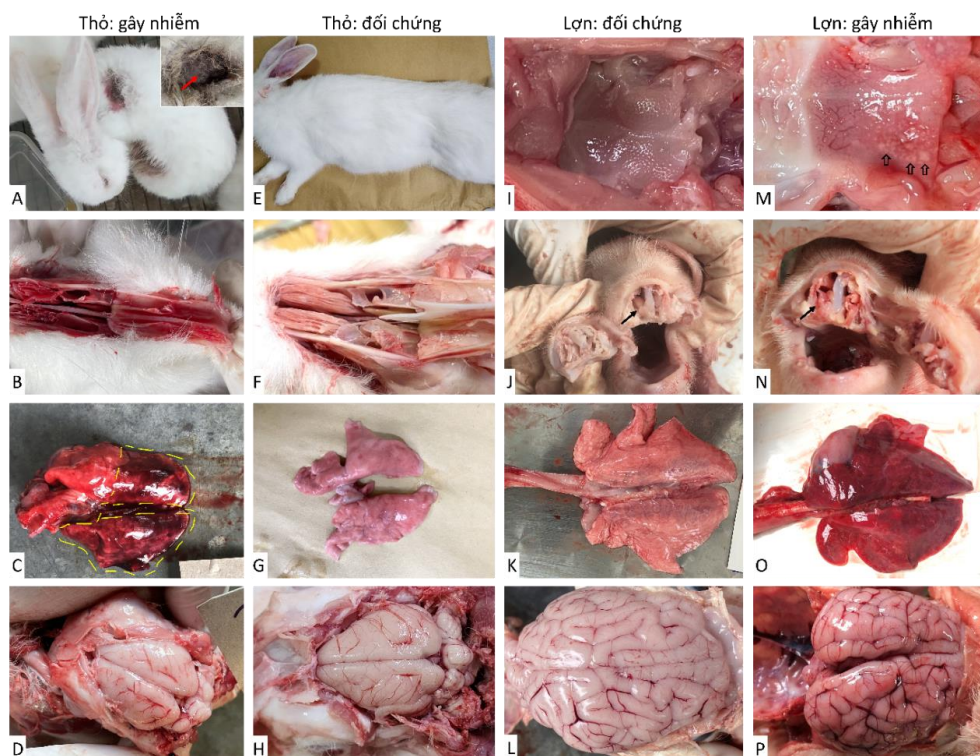
Kết quả sự phân bố virus ở động vật thí nghiệm (Bảng 2) cho thấy: PRV xuất hiện ở hầu hết các cơ quan được kiểm tra. Đối với lợn, virus còn được tìm thấy ở dịch tiết xoang mũi và

xoang miệng. Đặc điểm phân bố ở nhiều cơ quan nội tạng (đặc biệt ở lợn con) là phù hợp với nhận xét trong nghiên cứu đã công bố (Sehl & Teifke, 2020).

Tình trạng bệnh giả dại phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó có độc lực của chủng virus và liều gây nhiễm (Muller & cs., 2001). Đây cũng chính là hạn chế của nghiên cứu này khi chưa có điều kiện làm rõ nhiều khía cạnh về khả năng gây bệnh của chủng PRV.PT.001, ví dụ như: liều gây chết LD₅₀, biểu hiện bệnh ở các liều nhiễm và đường gây nhiễm khác nhau...

3.3. Đặc điểm sinh học phân tử của chủng PRV.PT.001

Bốn gen mã hóa glycoprotein bề mặt [UL44 (gB), UL27 (gC), US6 (gD), US8 (gE)] được lựa chọn để tìm hiểu đặc điểm sinh học phân tử của chủng PRV.PT.001. Các gen kể trên thường được sử dụng trong nghiên cứu phân loại virus (Minamiguchi & cs., 2019; Tan & cs., 2021). Kết quả thu được thứ nhất là về mối liên hệ di truyền giữa chủng PRV.PT.001 với các chủng PRV trên thế giới (Hình 4).



Hình 3. Biến đổi bệnh lý đại thể ở động vật thí nghiệm

Bảng 2. Phân bố của PRV trong các cơ quan của động vật thí nghiệm

Loại mẫu	Thí nghiệm trên thỏ			Thí nghiệm trên lợn		
	Đối chứng	Thỏ 1	Thỏ 2	Đối chứng	Lợn 1	Lợn 2
Huyết thanh	-	+	-	-	+	+
Swab xoang mũi	ND	ND	ND	-	+	+
Swab xoang miệng	ND	ND	ND	-	+	+
Xương ống cuộn	-	+	+	-	+	+
Thanh quản	-	+	+	-	+	-
Khí quản đoạn trên	-	+	+	-	+	+
Khí quản đoạn dưới	-	+	+	-	+	-
Phế quản gốc	-	+	+	-	+	+
Phổi	-	+	+	-	+	+
Tim	-	+	-	-	+	-
Lách	-	+	+	-	+	+
Gan	-	+	+	-	+	-
Thận	-	-	-	-	+	+
Dạ dày	-	+	-	-	+	+
Van hồi manh tràng	-	+	-	-	+	+
Hạch amidan	-	+	+	-	+	+
Hạch dưới hàm	ND	ND	ND	-	+	+
Hạch cuống phổi	ND	ND	ND	-	+	+
Hạch bẹn nông	ND	ND	ND	-	+	+
Hạch màng treo ruột non	ND	ND	ND	-	+	+
Màng payer	-	+	-	-	+	-
Tuyến tụy	ND	ND	ND	-	+	+
Tuyến giáp trạng	ND	ND	ND	-	-	+
Tuyến ức	ND	ND	ND	-	+	+
Đại não	-	-	-	-	-	+
Tiểu não	-	-	-	-	+	+

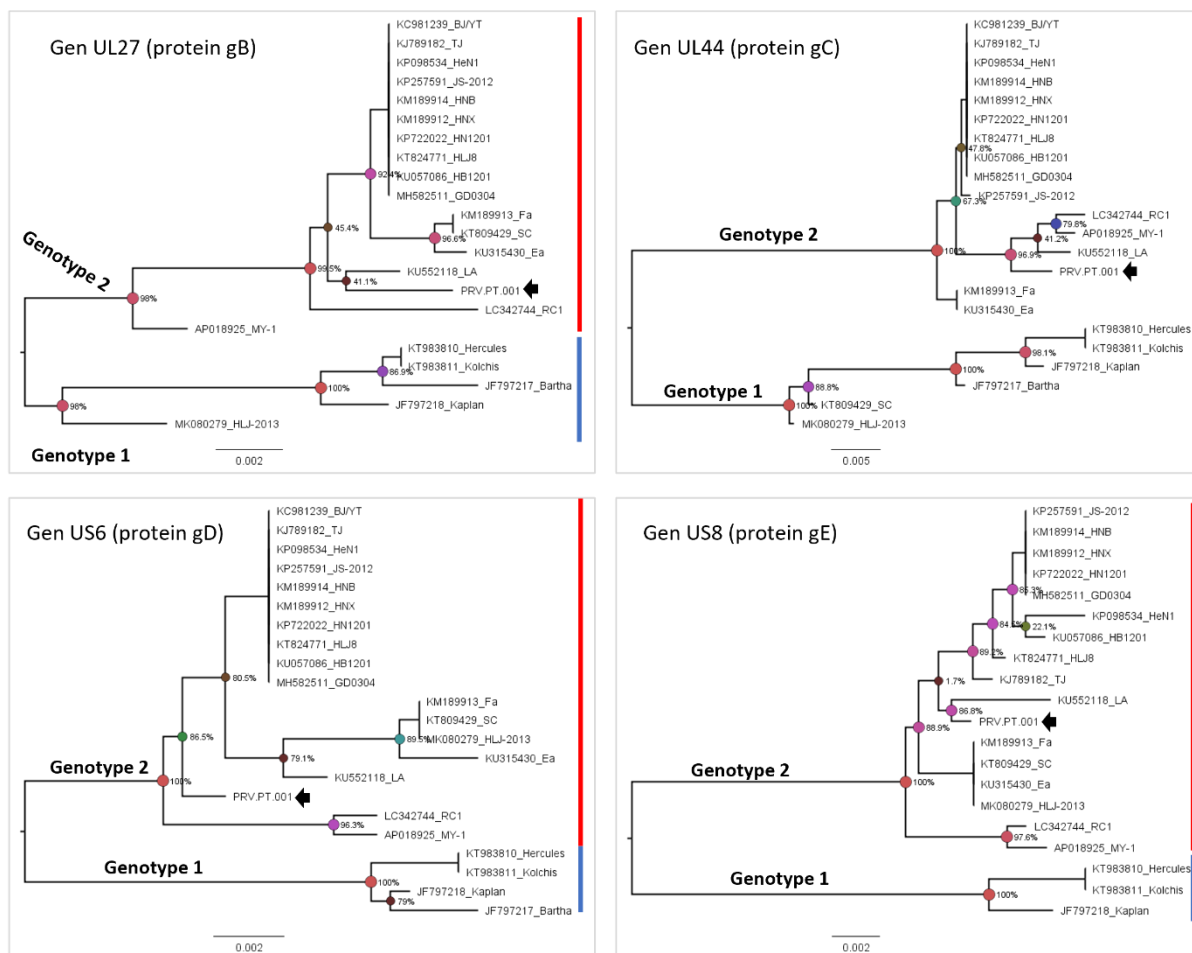
Ghi chú: (ND): Không xét nghiệm, (-): Âm tính, (+): Dương tính.

Hình 4 cho biết PRV bao gồm hai nhánh lớn là genotype 1 và genotype 2. Dựa vào đặc điểm phân nhánh, chủng PRV.PT.001 (mũi tên) đều thuộc genotype 2. Cùng với một số chủng khác (ví dụ như MY-1, HLJ-2013, SC, RC-1), chủng PRV.PT.001 nằm ở các nhánh không cố định của cây phát sinh chủng loại xây dựng từ các gen khác nhau. Kết quả đó được lý giải là do tái tổ hợp gen giữa các genotype hoặc giữa các nhánh trong cùng genotype (Huang & cs., 2020; Bo & cs., 2021). Kết quả phân nhánh dựa vào trình tự gen mã hóa protein gB, gC, gD và gE ở hình 4 cho thấy PRV.PT.001 có khả năng là

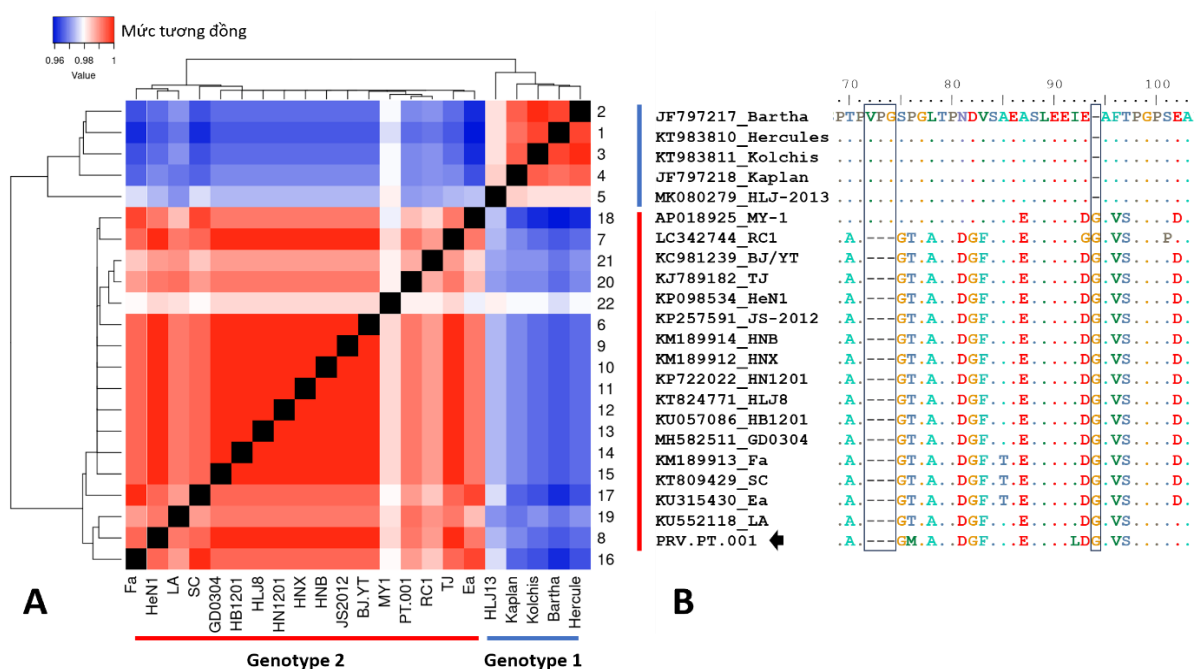
chủng virus tái tổ hợp. Tuy nhiên, cần tiếp tục phân tích chuyên sâu toàn bộ hệ gen của chủng virus này trong các nghiên cứu tiếp theo.

Các kết quả (Hình 5A, 6A, 7A và 8A) cho biết chủng PRV.PT.001 tương đồng trình tự amino acid cao nhất đối với protein gB (96,7-96,9% với genotype 1 và 98,1-99,3% với các chủng cùng genotype 2), tiếp đến là protein gE (94,9% với genotype 1 và 97,4-99,6% với các chủng thuộc cùng genotype 2). Protein gC tương đồng thấp nhất trong 4 protein được phân tích, với 92,1 - 93,0% so với các chủng thuộc genotype 1 và 96,0 - 98,5% so với các chủng thuộc genotype 2.

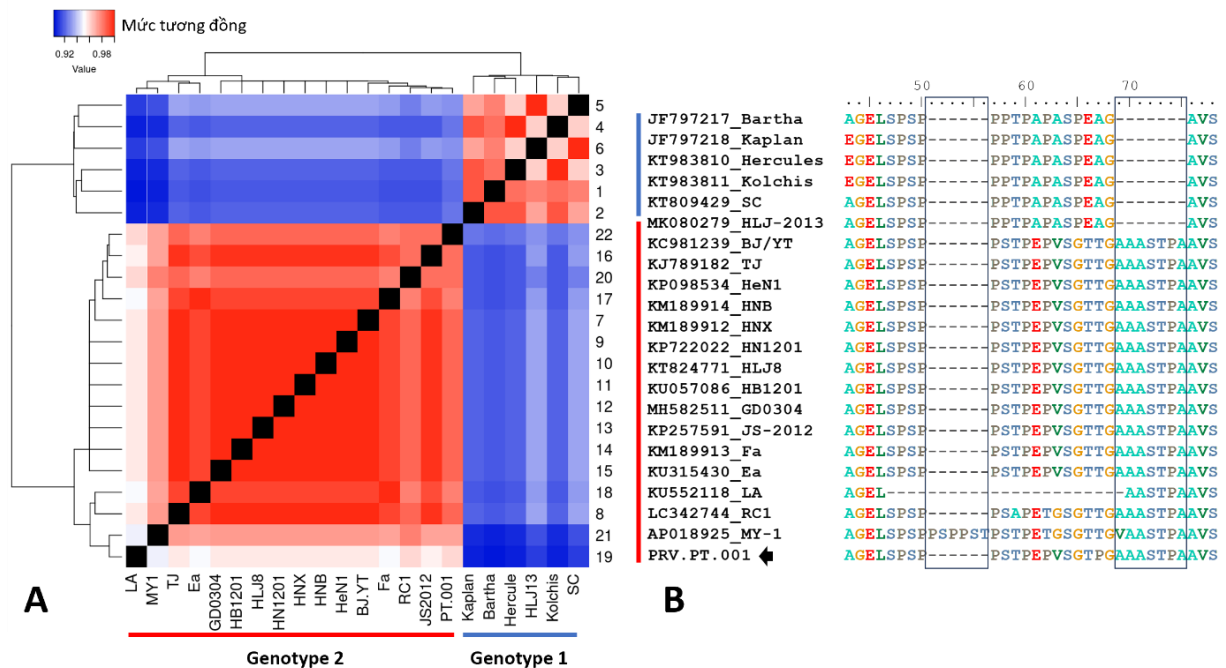
Một số đặc tính sinh học và sinh học phân tử của chủng virus gây bệnh giả dại phân lập ở lợn nuôi tại Việt Nam



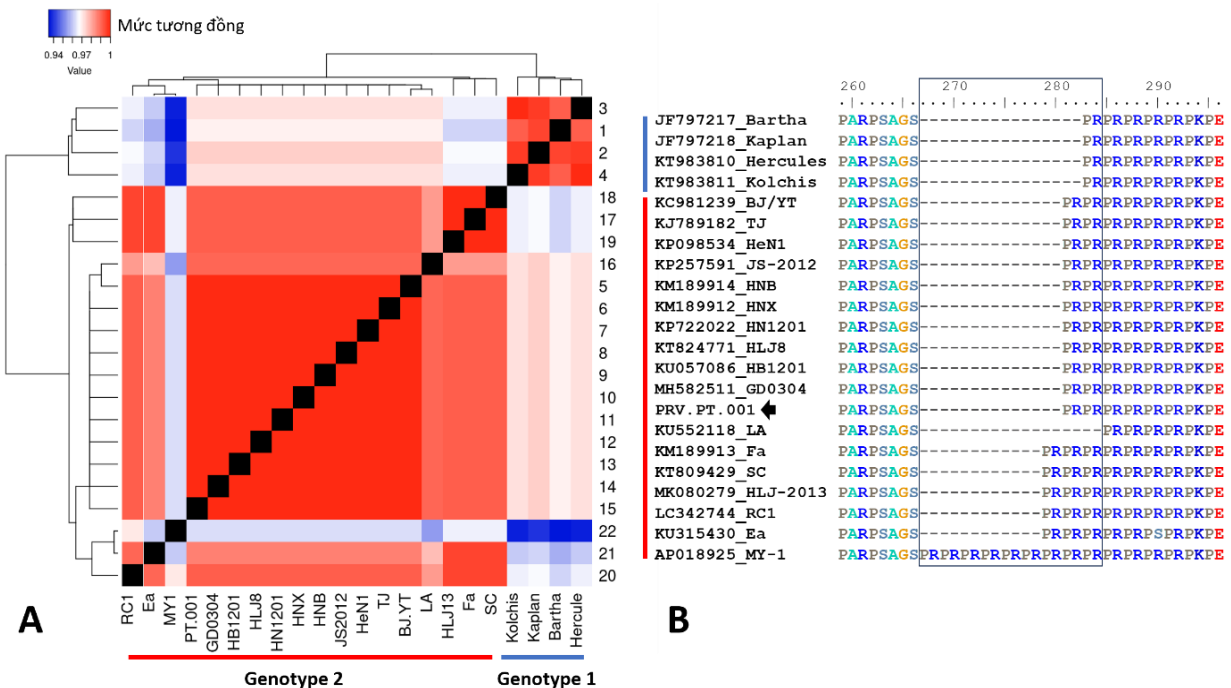
Hình 4. Cây phát sinh chủng loại dựa vào gen mã hóa glycoprotein gB, gC, gD và gE



Hình 5. Tương đồng trình tự amino acid và đặc điểm đột biến thêm - xóa của protein gB



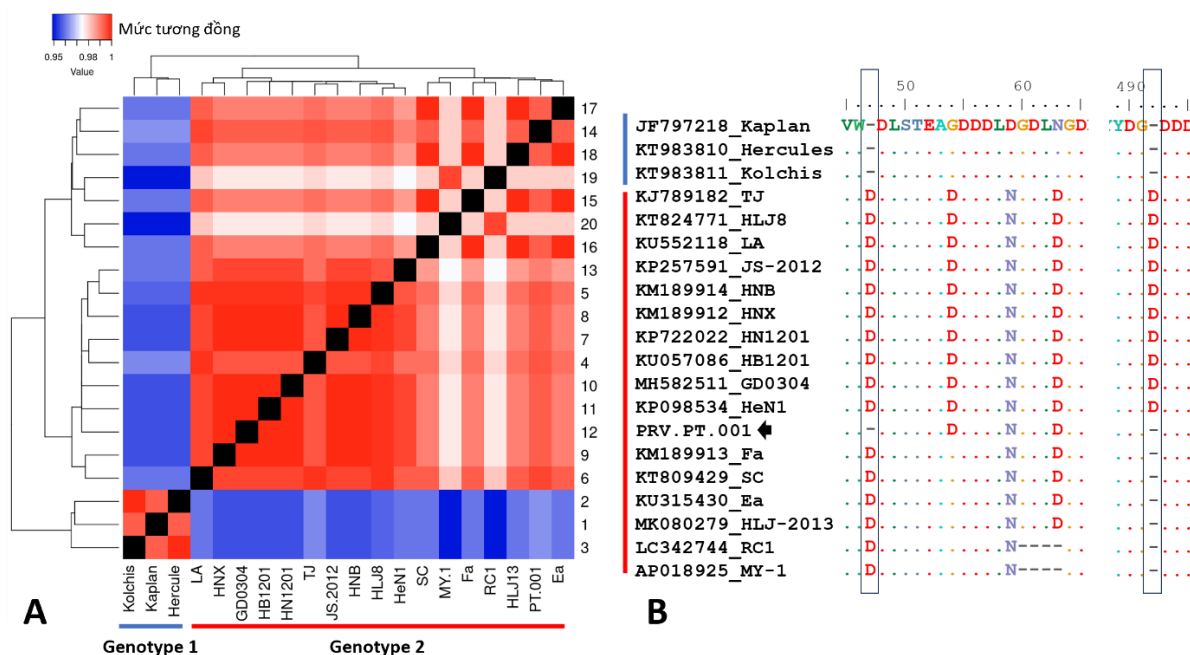
Hình 6. Tương đồng trình tự amino acid và đặc điểm đột biến thêm - xóa của protein gC



Hình 7. Tương đồng trình tự amino acid và đặc điểm đột biến thêm - xóa của protein gD

Về đặc điểm đột biến thêm - xóa, chủng PRV.PT.001 mang đặc điểm của genotype 2 đối với protein gB, gC và gD: xóa 3 amino acid 72-VPG-74, thêm 1 amino acid 94G (Hình 5B); thêm 7 amino acid 69-AAASTPA-75 (Hình 6B);

thêm 2 amino acid 267-PR (so với genotype 1, hình 7B). Với protein gE, chủng PRV.PT.001 có đặc điểm của genotype 1 khi không mang đột biến thêm 1 amino acid ở vị trí 47-D và 492-D như các chủng thuộc genotype 2 (Hình 8B).



Hình 8. Tương đồng trình tự amino acid và đặc điểm đột biến thêm - xóa của protein gE

Tựu chung lại, kết quả phân tích đặc tính sinh học phân tử cho biết chủng PRV.PT.001 thuộc genotype 2, chủ yếu mang đột biến thêm - xóa amino acid đặc trưng của genotype này (Tan & cs., 2021). Trong khi đó, tại Trung Quốc từ năm 2011, sự xuất hiện của PRV biến chủng thuộc genotype 2 (Ye & cs., 2015) được cho là nguyên nhân dẫn tới vấn đề bệnh giả dại phát ra ở cả những đàn đã được tiêm vaccin nhược độc chủng Bartha K61 thuộc genotype 1 (An & cs., 2013). Việc khẳng định sự có mặt của PRV thuộc genotype 2 và hiện tượng giảm hiệu quả của vắc xin phòng bệnh thuộc genotype 1 cho thấy sự cần thiết tiếp tục nghiên cứu về đặc điểm sinh học phân tử của virus cũng như phát triển vaccin phù hợp chủng để phòng bệnh giả dại ở nước ta

4. KẾT LUẬN

Đặc tính sinh học và sinh học phân tử cơ bản của chủng phân lập PRV.PT.001 đã được xác định trong nghiên cứu này: (1) virus gây bệnh tích điển hình là thể hợp bào trên môi trường tế bào Vero, đạt hiệu giá $10^{6.58}$ TCID₅₀/ml, độc với thỏ và lợn với khả năng phân bố ở nhiều nội quan; (2) chủng phân lập mang đặc điểm di truyền của virus thuộc genotype 2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- An T.Q., Peng J.M., Tian Z.J., Zhao H.Y., Li N., Liu Y.M., Chen J.Z., Leng C.L., Sun Y., Chang D. & Tong G.Z. (2013). Pseudorabies virus variant in Bartha-K61-vaccinated pigs, China. *Emerging infectious diseases*. 19(11): 1749-55.
- Baskerville A. (1973). The histopathology of experimental pneumonia in pigs produced by Aujeszky's disease virus, *Research in Veterinary Science*. 14(2): 223-233.
- Bitsch V. (1980). Correlation between the pathogenicity of field strains of Aujeszky's disease virus and their ability to cause cell fusion -- syncytia formation -- in cell cultures, *Acta Vet Scand*. 21(4): 708-10.
- Bo Z. & Li X. (2022). A review of pseudorabies virus variants: genomics, vaccination, transmission, and zoonotic potential. *Viruses*. 14(5): 1003.
- Bo Z., Miao Y., Xi R., Gao X., Miao D., Chen H., Jung Y.-S., Qian Y. & Dai J. (2021). Emergence of a novel pathogenic recombinant virus from Bartha vaccine and variant pseudorabies virus in China, *Transboundary and Emerging Diseases*. 68(3): 1454-1464.
- Fauquet C., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A. (2005). *Virus taxonomy, VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press.
- Hall T.A. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program*

- for Windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symposium Series. 41: 95-98.
- Huang J., Zhu L., Zhao J., Yin X., Feng Y., Wang X., Sun X., Zhou Y. & Xu Z. (2020). Genetic evolution analysis of novel recombinant pseudorabies virus strain in Sichuan, China, *Transbound Emerg Dis.* 67(4): 1428-1432.
- Kamakawa A., Thu H.T.V. & Yamada S. (2006). Epidemiological survey of viral diseases of pigs in the Mekong delta of Vietnam between 1999 and 2003, *Veterinary Microbiology.* 118(1): 47-56.
- Katayama S., Okada N., Ohgitani T., Kokubu T. & Shimizu Y. (1998). Influence of cell surface glycoprotein gC produced by pseudorabies virus on cytopathic effect, *J Vet Med Sci.* 60(8): 905-9.
- Katoh K. & Standley D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 30(4): 772-80.
- Klupp B.G., Hengartner C.J., Mettenleiter T.C. & Enquist L.W. (2004). Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome. *J Virol.* 78(1): 424-40.
- Lê Hồng Phong (1996). Phân lập, giám định virus Aujeszky gây hội chứng “lợn con co giật” trong các trại chăn nuôi ở phía Nam. Luận án Phó tiến sĩ khoa học Nông nghiệp, Hà Nội. tr. 1-132.
- Lei C., Yang J., Hu J. & Sun X. (2021). On the calculation of TCID₅₀ for quantitation of virus infectivity. *Virol Sin.* 36(1): 141-144.
- Minamiguchi K., Kojima S., Sakumoto K. & Kirisawa R. (2019). Isolation and molecular characterization of a variant of Chinese gC-genotype II pseudorabies virus from a hunting dog infected by biting a wild boar in Japan and its pathogenicity in a mouse model. *Virus Genes.* 55(3): 322-331.
- Mulder W.A., Pol J.M., Gruys E., Jacobs L., De Jong M.C., Peeters B.P. & Kimman T.G. (1997). Pseudorabies virus infections in pigs. Role of viral proteins in virulence, pathogenesis and transmission. *Vet Res.* 28(1): 1-17.
- Muller T., Hahn E.C., Tottewitz F., Kramer M., Klupp B.G., Mettenleiter T.C. & Freuling C. (2011). Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective. *Arch Virol.* 156(10): 1691-705.
- Muller T., Teuffert J., Zellmer R. & Conraths F.J. (2001). Experimental infection of European wild boars and domestic pigs with pseudorabies viruses with differing virulence, *Am J Vet Res.* 62(2): 252-8.
- Pomeranz L.E., Reynolds A.E. & Hengartner C.J. (2005). Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine, *Microbiol Mol Biol Rev.* 69(3): 462-500.
- Price M.N., Dehal P.S. & Arkin A.P. (2010). FastTree 2 - approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLOS ONE.* 5(3): e9490.
- Sabini L., Zanon S., Lara L., Torres C., Sutil S., Rovera M. & Ramos B. (2000). Study of pseudorabies virus, RC/79 strain, virulence markers, *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 42: 111-116.
- Sehl J. & Teifke J.P. (2020). Comparative pathology of pseudorabies in different naturally and experimentally infected species - a review. *Pathogens.* 9(8).
- Tan L., Yao J., Yang Y., Luo W., Yuan X., Yang L. & Wang A. (2021). Current status and challenge of pseudorabies virus infection in China. *Virol Sin.* 36(4): 588-607.
- Vũ Ngọc Chiêu (1994). Tình hình bệnh Aujeszky và bước đầu xác định vai trò của nó trong hội chứng rối loạn sinh sản của lợn nái ở vùng phụ cận Hà Nội. Luận án Phó tiến sĩ khoa học Nông nghiệp, Hà Nội. tr. 1-118.
- Wu F., Lv Y., Zhang S., Liu L., Wu Y., Zhao P., Peng Z., Liu S., Zhang Z. & Li W. (2020). Isolation and characterization of a variant pseudorabies virus HNXV and construction of rHNXY-ΔTK/ΔgE. *Animals.* 10.
- Xu X.G., Chen G.D., Huang Y., Ding L., Li Z.C., Chang C.D., Wang C.Y., Tong D.W. & Liu H.J. (2012). Development of multiplex PCR for simultaneous detection of six swine DNA and RNA viruses. *J Virol Methods.* 183(1): 69-74.
- Ye C., Wu J., Tong W., Shan T., Cheng X., Xu J., Liang C., Zheng H., Li G. & Tong G. (2018). Comparative genomic analyses of a virulent pseudorabies virus and a series of its in vitro passaged strains. *Virol J.* 15(1): 195.
- Ye C., Zhang Q.Z., Tian Z.J., Zheng H., Zhao K., Liu F., Guo J.C., Tong W., Jiang C.G., Wang S.J., Shi M., Chang X.B., Jiang Y.F., Peng J.M., Zhou Y.J., Tang Y.D., Sun M.X., Cai X.H., An T.Q. & Tong G.Z. (2015). Genomic characterization of emergent pseudorabies virus in China reveals marked sequence divergence: Evidence for the existence of two major genotypes. *Virology.* 483: 32-43.
- Zhai X., Zhao W., Li K., Zhang C., Wang C., Su S., Zhou J., Lei J., Xing G., Sun H., Shi Z. & Gu J. (2019). Genome characteristics and evolution of pseudorabies virus strains in Eastern China from 2017 to 2019. *Virol Sin.* 34(6): 601-609.