

MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA CHỦNG PEDV (PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS) PHÂN LẬP Ở LỢN NUÔI TẠI HƯNG YÊN

Nguyễn Văn Giáp, Đặng Hữu Anh, Trương Hà Thái, Huỳnh Thị Mỹ Lệ*

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

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

Ngày nhận bài: 19.05.2020

Ngày chấp nhận đăng: 02.06.2020

TÓM TẮT

Kể từ khi được phát hiện vào năm 2009, đến nay, PEDV lưu hành ở cả 3 miền Bắc, Trung và Nam và gây ra những thiệt hại không nhỏ cho ngành chăn nuôi ở Việt Nam. Để góp phần hạn chế thiệt hại do bệnh gây ra, việc chế tạo và sử dụng vaccin phù hợp chủng là cần thiết. Nhằm cung cấp thêm thông tin về đặc tính sinh học của PEDV gây bệnh ở Việt Nam, nghiên cứu này đã phân tích đặc tính sinh học phân tử gen mã hóa tiểu phần S1 của một chủng PEDV phân lập ở Hưng Yên năm 2017. Kết quả nghiên cứu cho biết chủng phân lập PEDV_HY2017 thuộc genogroup G2 của PEDV và có mức tương đồng với các chủng PEDV của Việt Nam là 90-91% (genogroup G1) 95,7-98,2% (genogroup G2). Chủng PEDV_HY2017 mang 2 vùng đột biến thêm - xóa ở đoạn gen mã hóa tiểu phần protein S1 và giống với các chủng PEDV genogroup G2 của Việt Nam.

Từ khóa: Porcine Epidemic Diarrhea Virus, đặc tính sinh học phân tử, Việt Nam.

Molecular Characterizations of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) Isolated in Hung Yen Province

ABSTRACT

Since the first detection in 2009, PEDV has been circulating in the North, Centre and the South of Vietnam. The disease has caused significant damages to the pig production sector. In order to mitigate the economic damage caused by diseases, the manufacture and use of field- matching vaccines are necessary. Aimed at providing more information on the biology of pathogenic PEDV strains in Vietnam, this study analyzed the molecular biology of the gene encoding S1 domain of one PEDV isolate detected in Hung Yen in 2017. The results showed that the field isolate, PEDV_HY2017, is genogroup G2 PEDV. The virus shared nucleotide similarity with PEDV strains of Vietnam in the ranges of 90-91% and 95.7-98.2% in compared to genogroup G1 and genogroup G2, respectively. The PEDV_HY2017 strain carries two regions of insertion-deletion mutations in the gene segment encoding the S1 domain of the Spike protein. This characteristic was similar to the other Vietnamese PEDV genogroup G2 viruses.

Keywords: Porcine Epidemic Diarrhea Virus, molecular characterizations, Vietnam.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dịch tiêu chảy cấp ở lợn (Porcine Epidemic Diarrhea - PED) là một bệnh truyền nhiễm của loài lợn, do một loại virus thuộc họ *Coronaviridae* gây ra. Trên thế giới, dịch PED lần đầu tiên được phát hiện ở Anh vào năm 1971 (Oldham, 1972) và hiện lưu hành ở hầu hết các nước chăn nuôi lợn trên thế giới (Chen & cs., 2012; Song & Park, 2012; Carvajal & cs., 2015; Grasland & cs., 2015;

Theuns & cs., 2015; Boniotti & cs., 2016). Dựa vào trình tự gen, mặc dù chỉ có 1 serotype duy nhất, PEDV được chia làm 2 genogroup: nhóm G1 cổ điển (G1, classical) và nhóm mới nổi G2 (field epidemic/pandemic) (Lee, 2015). Trước năm 2013, vaccin phòng bệnh PED đều được sản xuất từ chủng PEDV thuộc genogroup G1; sự xuất hiện và lưu hành của PEDV thuộc nhóm mới nổi đã làm giảm hiệu lực của vaccin (Song & cs., 2015).

Ở Việt Nam, dịch PED được phát hiện lần đầu tiên vào cuối năm 2008, đầu năm 2009 (Do Tien Duy & cs., 2011; Nguyễn Tất Toàn & Đỗ Tiến Duy, 2012; Nguyễn Tất Toàn & cs., 2012). Đến nay, PED được xác định có mặt ở cả 3 miền Bắc, Trung, Nam (Nguyễn Trung Tiến & cs., 2015; Le & cs., 2016) và thuộc về 2 nhóm di truyền, trong đó nhóm mới nổi thuộc genogroup G2 chiếm ưu thế (Nguyễn Trung Tiến & cs., 2015; Diep & cs., 2018). Về vaccin phòng bệnh, cho đến nay, vaccin lưu hành ở Việt Nam được sản xuất dựa vào các chủng thuộc nhóm cổ điển G1, chưa có vaccin chế tạo từ chủng virus thuộc nhóm mới nổi G2. Do số lượng các nghiên cứu về PEDV ở Việt Nam chưa nhiều, việc phân lập virus, làm rõ đặc tính sinh học phân tử của chủng PEDV thực địa là cần thiết. Bài báo này nhằm cung cấp thông tin kết quả nghiên cứu xác định một số đặc tính sinh học phân tử của chủng PEDV (ký hiệu PEDV_HY2017) phân lập được từ mẫu bệnh phẩm của lợn nuôi tại Hưng Yên năm 2017. Kết quả này góp phần cung cấp, hoàn thiện thông tin về đặc tính sinh học phân tử của chủng PEDV phân lập; qua đó làm cơ sở cho việc phát triển vaccin phòng bệnh PED phù hợp với các chủng gây bệnh tại miền Bắc.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm Bộ môn Vi sinh vật - Truyền nhiễm (VSV-TN), Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, từ tháng 2/2017 đến tháng 6/2018.

2.1. Nguyên liệu

- Chủng virus PEDV_HY2017 phân lập vào năm 2017 từ ruột non của lợn sơ sinh mắc bệnh tiêu chảy cấp ở tỉnh Hưng Yên, được xác định chỉ dương tính với PEDV.

- Dòng tế bào Vero do bộ môn VSV-TN cung cấp.

- Hóa chất tách, tinh sạch ARN tổng số: TRIzol (ThermoFisher Scientific, 15596026), chloroform (Merck, 102445), 2-propanol (Merck, 109634), ethanol (Merck, 108543).

- Bộ kit tổng hợp cDNA (M-MLV Reverse Transcriptase, ThermoFisher Scientific, 28025013), bộ kit PCR (Maxime PCR PreMix, 25165, iNtRON, Hàn Quốc).

- Cặp mồi đặc hiệu (Bảng 1) dùng giải trình tự gen S (Gao & cs., 2013; Tian & cs., 2013).

Bảng 1. Bộ mồi dùng cho giải trình tự gen S

Tên mồi	Trình tự nucleotide (5'-3')	Vị trí bắt đầu*	Kích thước (bp)
W20F	GTTACCTGATGGCATTATGTTT	19.837	2382
W20R	AACGAGATTGGCACTACTAAGAC	22.218	
W21F	TTCAGGTTTCTGGACCATAGC	21.933	1068
W21R	CTCATACTAAAGTTGGTGGGAAT	23.000	
W22F	TAGGGAGTTGCCTGGTTTC	22.812	1039
W22R	CAGTCGGAATAAATGTCATCAATA	23.850	
W23F	GTTTGAACACTGTGGCTCATG	23.708	1637
W23R	TTCGCAACAGATGTAGGTCAG	25.344	
PEDVS1-P1	CCATTAGTGATGTTGTGTTAG	20.535	1031
PEDVS1-P2	GCACAGCAGCTCCATT	21.565	
PEDVS2-P1	CCACATACCAGAAGGTTTATAG	21.372	1146
PEDVS2-P2	CCAGTAATCAACTCACCTT	22.517	
PEDVS3-P1	CCCTGAGTTTGGTAGTG	22.446	1154
PEDVS3-P2	CATCCGTCTGTAGAGCAAG	23.599	
PEDVS4-P1	CTCATCGGTGGTATGGTGCT	23.497	1355
PEDVS4-P2	AGCAGACTTTGAGACATCTTTGAC	24.851	

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp cấy chuyển virus

Chủng giống PEDV được cấy chuyển trên môi trường tế bào Vero chuẩn bị sau 24 giờ, dựa vào phương pháp công bố trước đây (Chung & cs., 2015). Sau khi gây nhiễm huyền dịch virus 1 giờ, tiến hành loại bỏ dịch gây nhiễm và rửa thảm tế bào 2 lần bằng dung dịch PBS 1x. Nuôi thảm tế bào sau gây nhiễm virus bằng môi trường với các thành phần sau: (i) DMEM, (ii) tryptose phosphate broth 0,3%, (iii) yeast extract 0,05% và (iv) 10 µg/ml trypsin. Theo dõi bệnh tích tế bào hàng ngày (vật kính 10x). Thu tế bào sau gây nhiễm 48 giờ. Huyền dịch được đông tan 3 lần (ở -80°C), ly tâm 4.000 vòng/phút/4°C trong 15 phút để loại bỏ cặn tế bào.

2.2.2. Phương pháp tách ARN

ARN tổng số được tách chiết bằng TRIzol, theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các bước thực hiện được tóm tắt dưới đây. (i) Ly giải mẫu: bổ sung 750µl dung dịch TRIzol vào 250µl huyền dịch virus, vortex. Ủ ở nhiệt độ phòng 5 phút. (ii) Tách pha chứa ARN: bổ sung 200µl Chloroform, vortex mạnh trong 15 giây. Ly tâm 12.000 vòng/ phút trong 10 phút ở 4°C. (iii) Tủa

ARN: chuyển 450µl pha trên có chứa ARN vào ống Eppendorf mới, bổ sung 450µl 2-propanol. Tủa ở -20°C/10 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, bỏ dịch trên, thu tủa ARN. (iv) Rửa tủa ARN: thêm 1ml ethanol 75%, đảo nhẹ để trộn đều. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Loại bỏ cồn và hong khô ở nhiệt độ phòng. (v) Hoàn nguyên ARN: hòa tủa ARN trong 30µl nước cất 3 lần đã xử lý loại Rnase và bảo quản ở -70°C cho tới khi sử dụng.

2.2.3. Phương pháp tổng hợp cDNA

Trước khi thực hiện phản ứng PCR, cần chuyển ARN thành ADN (sợi đơn) bằng phản ứng tổng hợp cDNA. Thành phần phản ứng được tóm tắt ở bảng 2.

2.2.4. Phương pháp thực hiện phản ứng PCR

Thành phần của phản ứng PCR gồm: 17µl i-Star Master mix solution + 1µl mỗi xuôi + 1µl mỗi ngược + 1µl cDNA. Chu trình nhiệt tối ưu của các phản ứng PCR trình bày ở bảng 3.

Sản phẩm PCR được phân tích bằng phương pháp điện di trong thạch agarose 2%, có bổ sung RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (1x). Sản phẩm PCR đặc hiệu được tinh sạch và giải trình tự gen 2 chiều bằng cặp môi tương ứng tại Công ty 1st BASE (Malaysia).

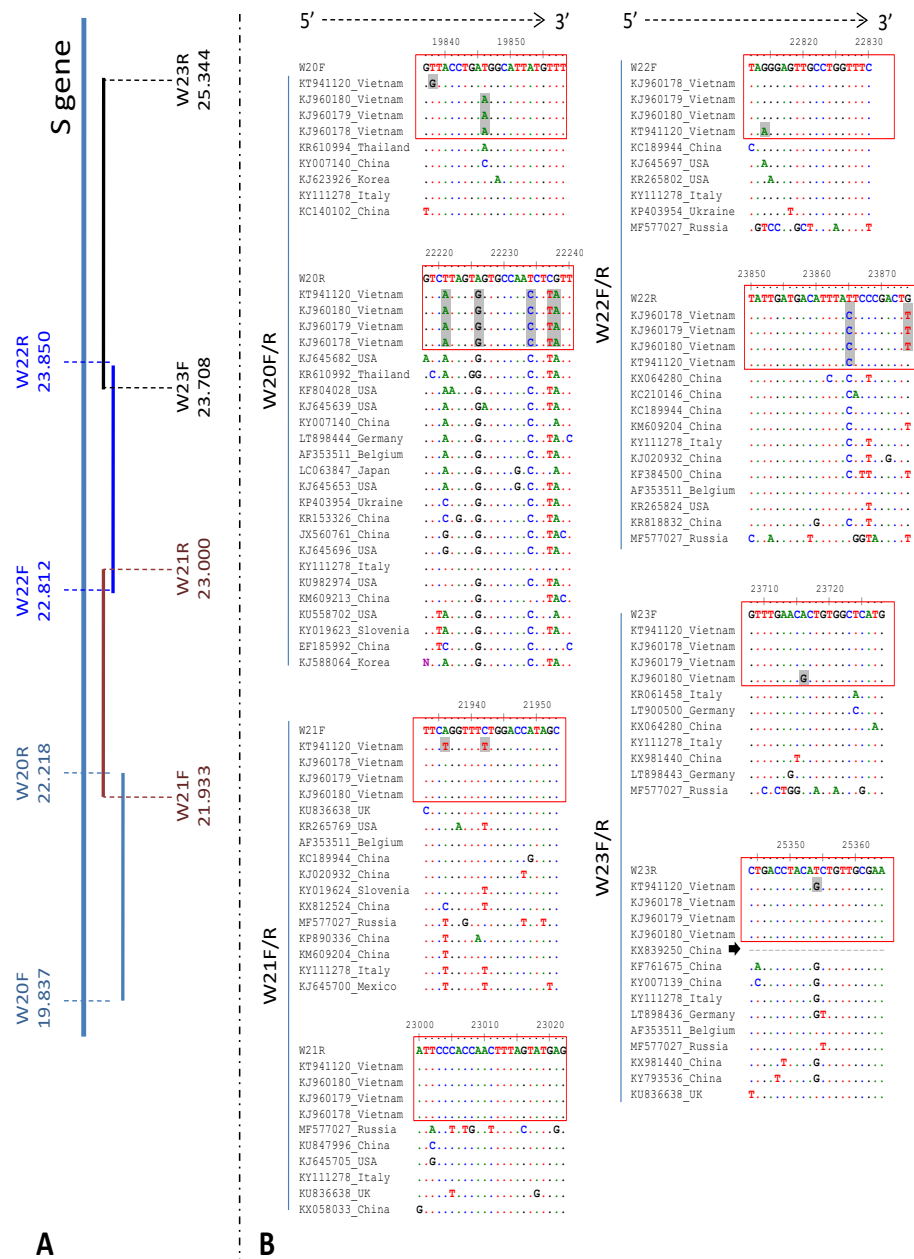
Bảng 2. Thành phần và nhiệt độ phản ứng tổng hợp cDNA

Thành phần	Thể tích (µl)	Nhiệt độ (°C)
ARN tổng số	10	65°C/ 5phút;
Random primer (10 pmole)	2	Giữ ở 4°C
dNTPs (40mM)	1	25°C/ 5 phút;
DTT (0,1M)	2	37°C/ 60 phút;
First strand buffer (5x)	4	72°C/ 10 phút;
M-MLV (200 U/µl)	1	Giữ ở 4°C

Bảng 3. Chu trình nhiệt của phản ứng RT-PCR nhân gen S

Giai đoạn phản ứng	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giây)	Số vòng lặp
Tiền biến tính	94	180	1
Biến tính	94	15	40
Bắt mồi	56	20	
Kéo dài	72	120	
Kéo dài cuối cùng	72	300	1

Một số đặc tính sinh học phân tử của chủng PEDV (Porcine Epidemic Diarrhea Virus) phân lập ở lợn nuôi tại Hưng Yên



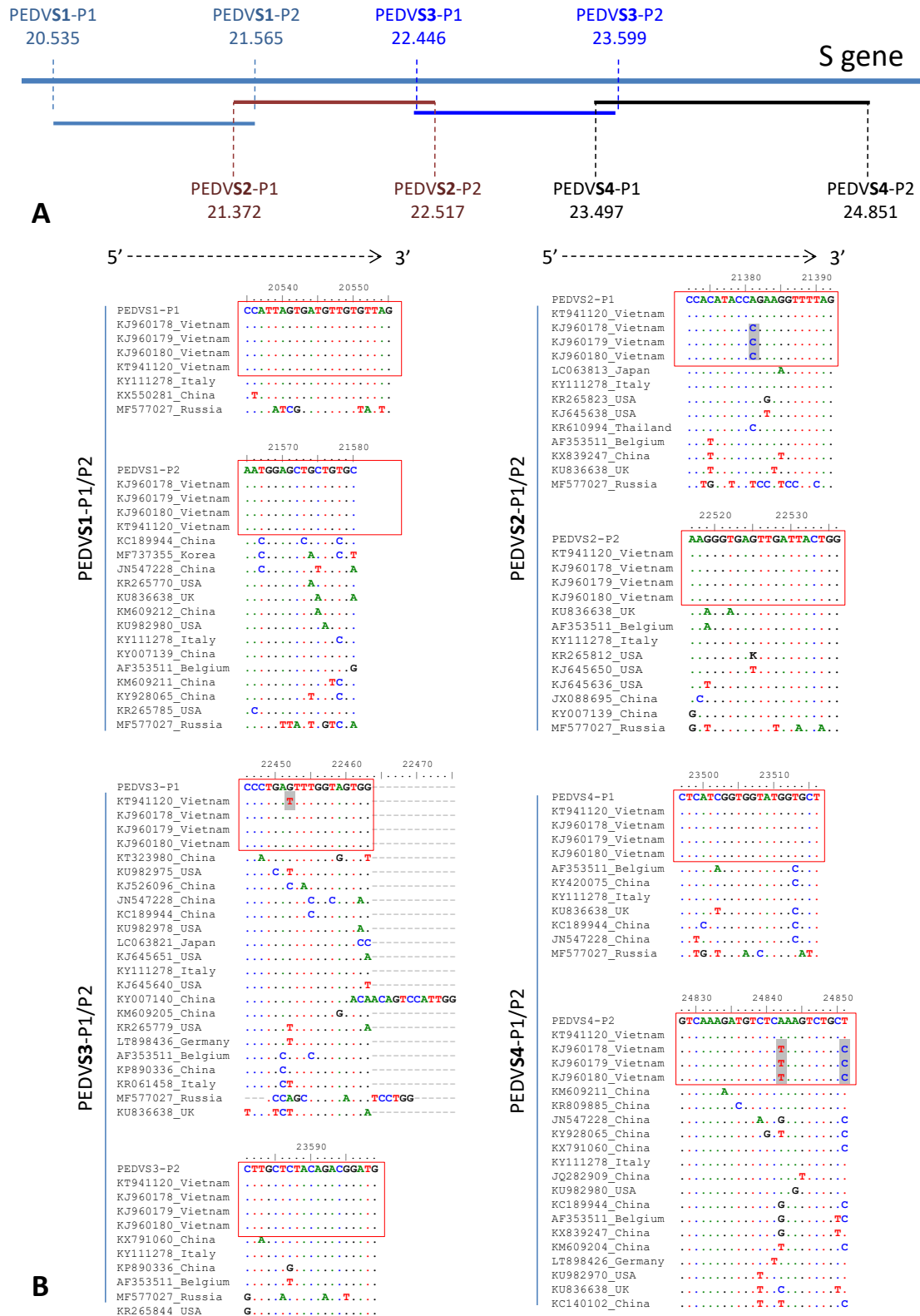
Ghi chú: (A) Vị trí tương đối của 4 cặp mồi giải trình tự toàn bộ gen S; (B) So sánh trình tự mồi và trình tự gen các chủng PEDV của Việt Nam (đóng khung màu đỏ) và trên thế giới.

Hình 1. Kết quả phân tích trình tự bộ mồi số 1 dùng giải trình tự gen S

2.2.5. Phương pháp phân tích trình tự gen

Các bước phân tích trình tự gen và xây dựng cây phả hệ được tóm tắt như sau: (i) Trình tự một phần gen S được bắt cặp so sánh với các trình tự tương ứng của PEDV được công bố trên GenBank; (ii) Sắp xếp, căn chỉnh trình tự nucleotide của các chủng PEDV theo cột trên cơ sở bộ ba mã hóa (codon - based alignment) bằng

phần mềm BioEdit (phiên bản 7.2.6.1); (iii) Xây dựng cây phả hệ bằng thuật toán neighbor-joining được tích hợp trong chương trình MEGA7 (Kumar & cs., 2016). Mức tin cậy của các nhánh phân chia ở mỗi nút (node) được biểu thị bằng giá trị bootstrap (lặp lại 1.000 lần); (iv) Biểu diễn, cây phả hệ bằng phần mềm FigTree.



Ghi chú: (A) Vị trí tương đối của 4 cặp môi giải trình tự toàn bộ gen S; (B) So sánh trình tự môi và trình tự gen các chủng PEDV của Việt Nam (đồng khung màu đỏ) và trên thế giới.

Hình 2. Kết quả phân tích trình tự bộ môi số 2 dùng giải trình tự gen S

Một số đặc tính sinh học phân tử của chủng PEDV (Porcine Epidemic Diarrhea Virus) phân lập ở lợn nuôi tại Hưng Yên

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

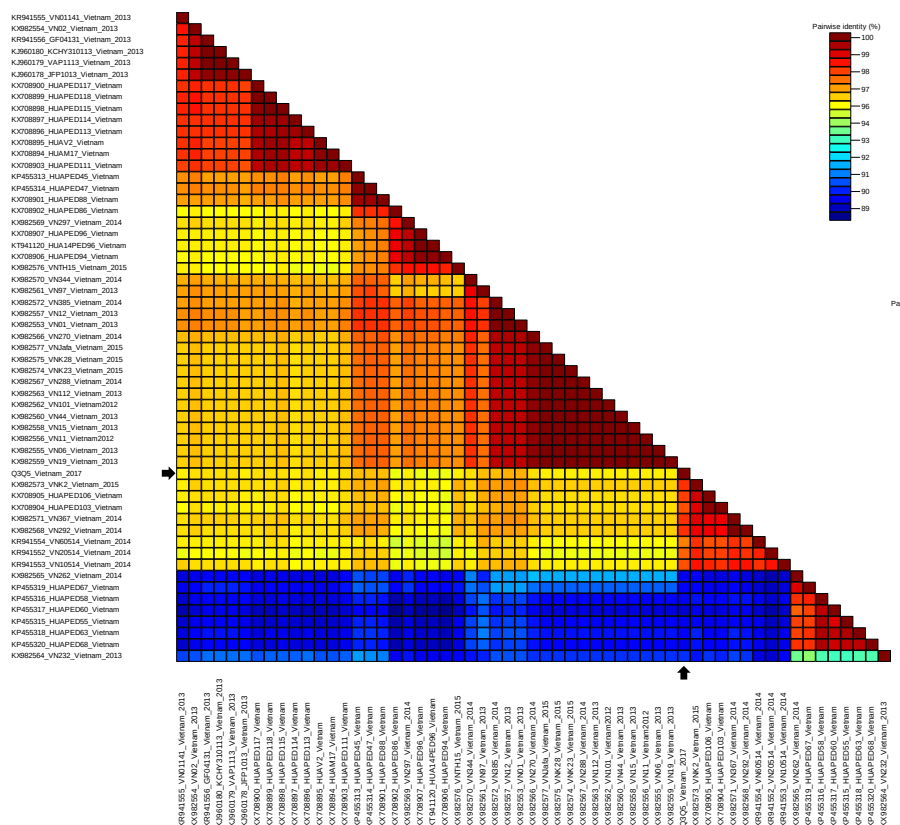
3.1. Kết quả lựa chọn cặp mỗi dòng giải trình tự gen S

Nghiên cứu đã giải mã gen S để làm rõ một số đặc điểm sinh học phân tử của chủng PEDV_{HY2017}. Do hiện tượng thêm - xóa, để làm cơ sở lựa chọn bộ mỗi phù hợp nhất, nghiên cứu này trước tiên so sánh trình tự mỗi với 28 chủng đại diện (gồm 4 chủng của Việt Nam) có trình tự bộ gen hoàn chỉnh ở ngân hàng gen.

Hình 1 và hình 2 là phân tích về sự phù hợp giữa trình tự mỗi và trình tự gen của 28 chủng PEDV đại diện, trong đó có chủng PEDV của Việt Nam. Đối với bộ mỗi số 1 (Hình 1), 7/8 mỗi có trình tự tại vị trí bắt mỗi khác với trình tự nucleotide của 4 chủng PEDV của Việt Nam (đánh dấu màu xám). Đáng chú ý, mỗi W20R có tới 5/23 nucleotide sai khác so với 4 chủng của Việt Nam, đặc biệt là tại đầu 3' của mỗi. Ngoài ra, mỗi W23R có vị trí gắn mỗi nằm trong vùng

đột biến xóa nucleotide của 1 chủng virus (mũi tên, hình 1). Đối với bộ mỗi số 2 (Hình 2), 3/8 mỗi có trình tự tại vị trí bắt mỗi khác với trình tự nucleotide của 4 chủng PEDV của Việt Nam (đánh dấu màu xám). Tuy nhiên, các vị trí sai khác này không nằm trong khoảng 3-5 nucleotide tại đầu 3' của mỗi. Từ 2 so sánh kể trên, bộ mỗi số 2 được chọn.

Do kích thước lớn của gen S (khoảng hơn 4.000bp), nghiên cứu đã tập trung giải mã 2 trong 4 vùng gen mã hóa receptor bám vào thụ thể trên bề mặt tế bào vật chủ (S1⁰ và S1^A) thuộc tiểu phần protein S1 (nucleotide 1-1533, đánh số theo chủng tham chiếu CV777, AF353511). Các vùng receptor này được chứng minh là đích tấn công của kháng thể trung hòa (Li & cs., 2017). Phân tích kết quả giải trình tự gen bằng phần mềm BioEdit đã thu được trình tự một phần gen S gồm 1533 nucleotide (bao gồm vùng S1⁰ và S1^A).



Ghi chú: Vị trí của chủng PEDV_{HY2017} được đánh dấu bởi mũi tên. Tỷ lệ % tương đồng được biểu thị bởi màu sắc (thang màu đính kèm).

Hình 3. Mức tương đồng giữa chủng PEDV_{HY2017} với PEDV ở Việt Nam

3.2. Đặc điểm tương đồng trình tự nucleotide

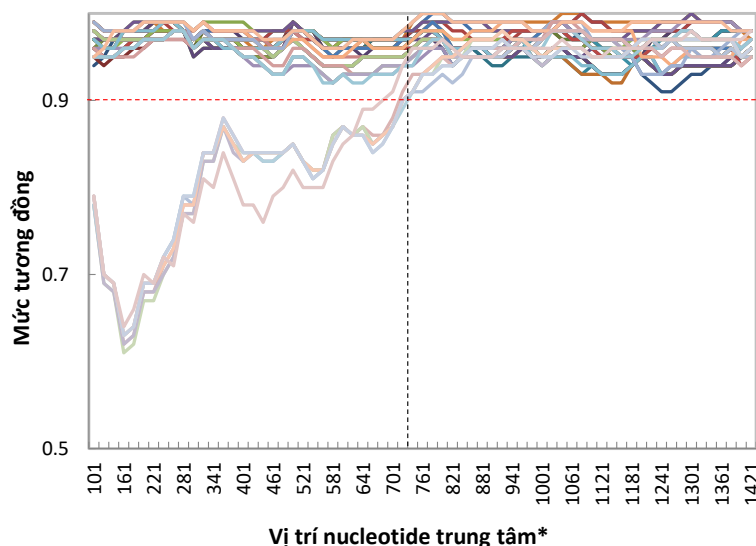
Hình 3 trình bày kết quả phân tích tương đồng của toàn bộ phân đoạn gen S (1533 nucleotide) giữa chủng PEDV_HY2017 với 56 chủng PEDV của Việt Nam. Kết quả cho thấy chủng PEDV_HY2017 có 2 mức tương đồng nucleotide so với 56 chủng PEDV của Việt Nam: tương đồng 90-91% (vùng màu xanh lam) và từ 95,7-98,2% (vùng màu vàng). Tương đồng ở từng vị trí nucleotide giữa chủng PEDV_HY2017 so với các chủng PEDV ở Việt Nam được trình bày ở hình 4.

Trong khoảng nucleotide 1-721 (Hình 4), chủng PEDV_HY2017 (i) Có sự tương đồng thấp ($<0,9$) đối với 8 chủng PEDV ở Việt Nam là: HUAPED55, HUAPED58, HUAPED60, HUAPED63, HUAPED67, HUAPED68, VN232, VN262 và (ii) Có sự tương đồng cao ($>0,9$) đối với 48 chủng còn lại. Kể từ nucleotide 721 đến 1533, chủng PEDV_HY2017 có mức tương đồng cao ($>0,9$) đối với 56 chủng PEDV thu được. Sự dao động về mức tương đồng trên dọc chiều dài gen S của các chủng PEDV lưu hành ở Việt Nam (trình bày ở hình 4) cũng đã được biết đối với một số chủng PEDV lưu hành trên thế giới, trong đó có Trung Quốc (Chen & cs., 2016a). Kết quả so sánh tương đồng trình tự gen (Hình 3 và

4) cho thấy có ít nhất 2 nhóm di truyền của PEDV ở Việt Nam.

3.3. Kết quả xây dựng cây phát sinh chủng loại

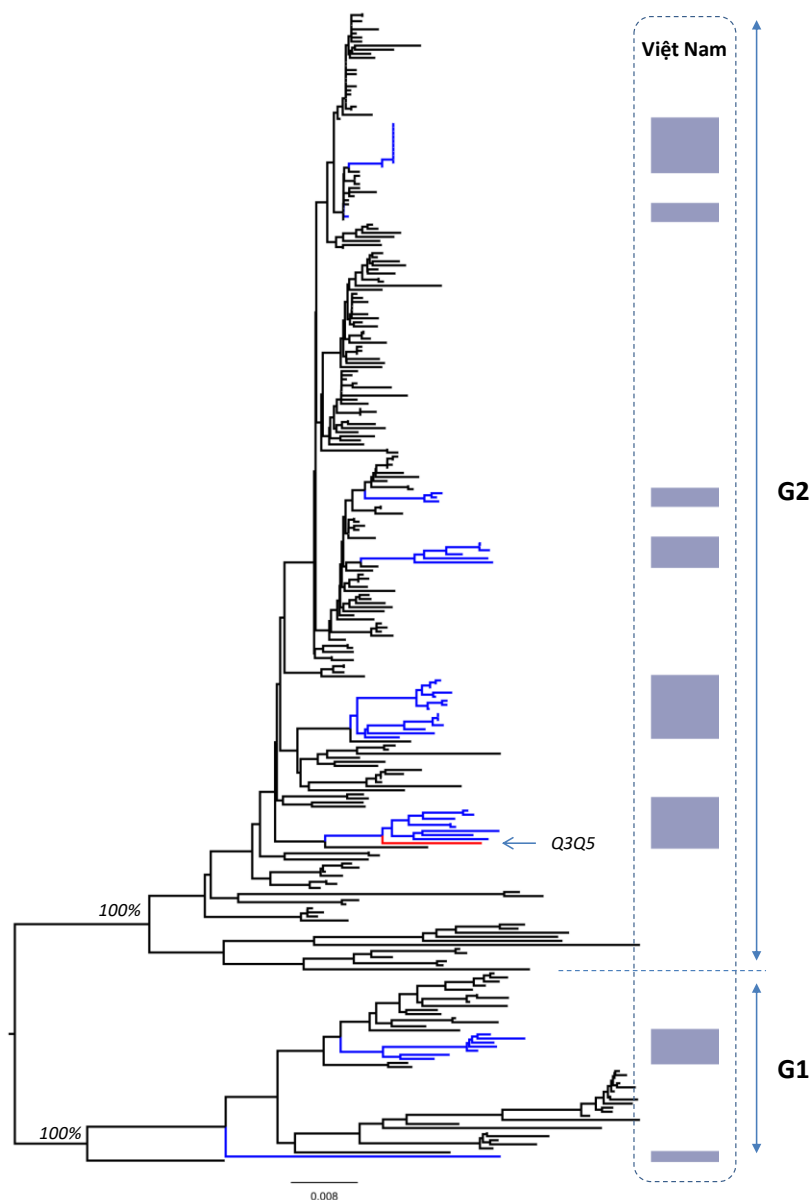
Để làm rõ đặc điểm này, cây phát sinh chủng loại đã được xây dựng dựa vào trình tự đoạn gen S gồm 1533 nucleotide (Hình 5). Cây phát sinh chủng loại dựa vào một phần gen S cho biết các chủng PEDV trên thế giới và ở Việt Nam bao gồm 2 genogroup là G1 và G2. Trong 56 chủng PEDV ở Việt Nam được phân tích, có 8 chủng thuộc về genogroup G1 và 48 chủng (bao gồm chủng phân lập PEDV_HY2017) thuộc về genogroup G2 (Hình 5). Kết quả phân tích kể trên là phù hợp với các công bố trước đây về phân nhóm PEDV gây bệnh ở Việt Nam (Nguyễn Trung Tiến & cs., 2015; Vui & cs., 2015; Diep & cs., 2018). Mặc dù thuộc cùng genogroup G2, nhưng 48 chủng PEDV ở Việt Nam nằm ở các nhánh khác nhau của cây phát sinh chủng loại. Chủng PEDV_HY2017 (thu thập năm 2017, Hình 6) được xác định thuộc cùng phân nhóm với 8 chủng PEDV thu thập từ năm 2014-2015 (HUAPED106, HUAPED103, VNK2, VN367, VN292, VN20514, VN10514, VN60514).



Ghi chú: Trục Ox biểu diễn vị trí nucleotide trung tâm của mỗi nhóm gồm 200 nucleotide; mức tương đồng từ cao-thấp (0-1) được biểu diễn ở trục Oy.

Hình 4. Mức tương đồng theo vị trí nucleotide giữa chủng PEDV_HY2017 với các chủng PEDV của Việt Nam

Một số đặc tính sinh học phân tử của chủng PEDV (Porcine Epidemic Diarrhea Virus) phân lập ở lợn nuôi tại Hưng Yên



Ghi chú: các nhánh dẫn tới chủng PEDV ở Việt Nam được đánh dấu màu xanh, chủng PEDV_HY2017 được đánh dấu màu đỏ. Giá trị bootstrap ở mỗi nút (node) được hiểu thị cho 2 nhánh chính.

Hình 5. Cây phát sinh chủng loại của PEDV dựa vào một phần gen S

3.4. Đặc điểm đột biến thêm - xóa

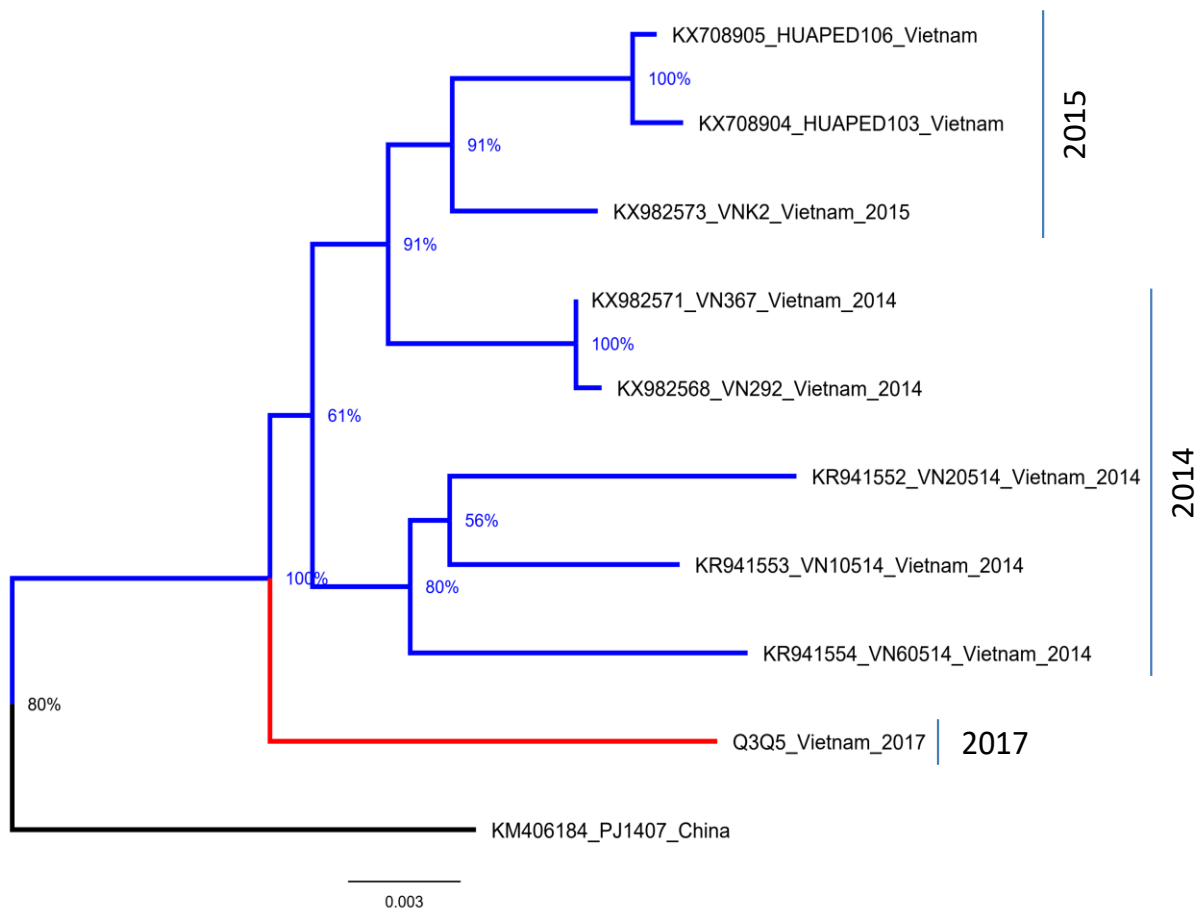
Trên cơ sở sắp xếp trình tự nucleotide theo cột và so sánh, vùng gen S của chủng PEDV_HY2017 có đột biến thêm - xóa đã được xác định (Hình 7). Trong 56 chủng PEDV ở Việt Nam, có 5 vị trí của đoạn gen mã hóa tiểu phần protein S1 mang đột biến thêm - xóa. Các vùng thêm- xóa thường ngắn, chỉ gồm 1-2-4 codon, ngoại trừ chủng KX982576 (nucleotide 1135-

1140) có đột biến thêm 8 codon. So với chủng tham chiếu CV777 (chủng virus thường được dùng sản xuất vaccin phòng bệnh do PEDV), chủng phân lập PEDV_HY2017 có 2 vị trí mang đột biến xóa (nucleotide 172-177 và nucleotide 469- 480). Đột biến thêm- xóa của chủng PEDV_HY2017 phân lập được năm 2017 giống với 5 chủng PEDV ở Việt Nam xuất hiện vào năm 2014- 2015 (VNK2, HUAPED106, HUAPED103, VN367, VN292).

Đột biến thêm - xóa tại các vị trí khác nhau của gen S đã được phát hiện ở nhiều chủng PEDV lưu hành ở nhiều quốc gia, với số lượng nucleotide thêm- xóa rất đa dạng: từ 1 đến 11 nucleotide (Marthaler & cs., 2014; Wang & cs., 2014), hoặc từ 582- 648 nucleotide (Diep & cs., 2017). Hiện nay, vai trò của đột biến thêm - xóa trong cơ chế sinh bệnh của PEDV chưa được làm sáng tỏ. Kết quả phân tích trình tự gen của chủng PEDV nhược độc hóa trên môi trường tế bào (TC-PC177) thấy xuất hiện đột biến xóa 197 aa ở đầu N của protein S. Đột biến này đã được chứng minh không ảnh hưởng tới tính hướng tổ chức nhưng làm giảm độc lực của chủng virus (Hou & cs., 2017). Kết quả so sánh trình tự gen S giữa 56 chủng PEDV của Việt Nam nói chung và chủng phân lập PEDV_HY2017 nói riêng cho thấy vùng mang đột biến thêm - xóa từ vùng số 1 đến vùng số 4 (Hình 7) nằm hoàn toàn trong

vùng đột biến xóa 197 aa, do đó vai trò của các đột biến thêm - xóa ở các chủng PEDV lưu hành ở Việt Nam cần được làm rõ bằng thực nghiệm.

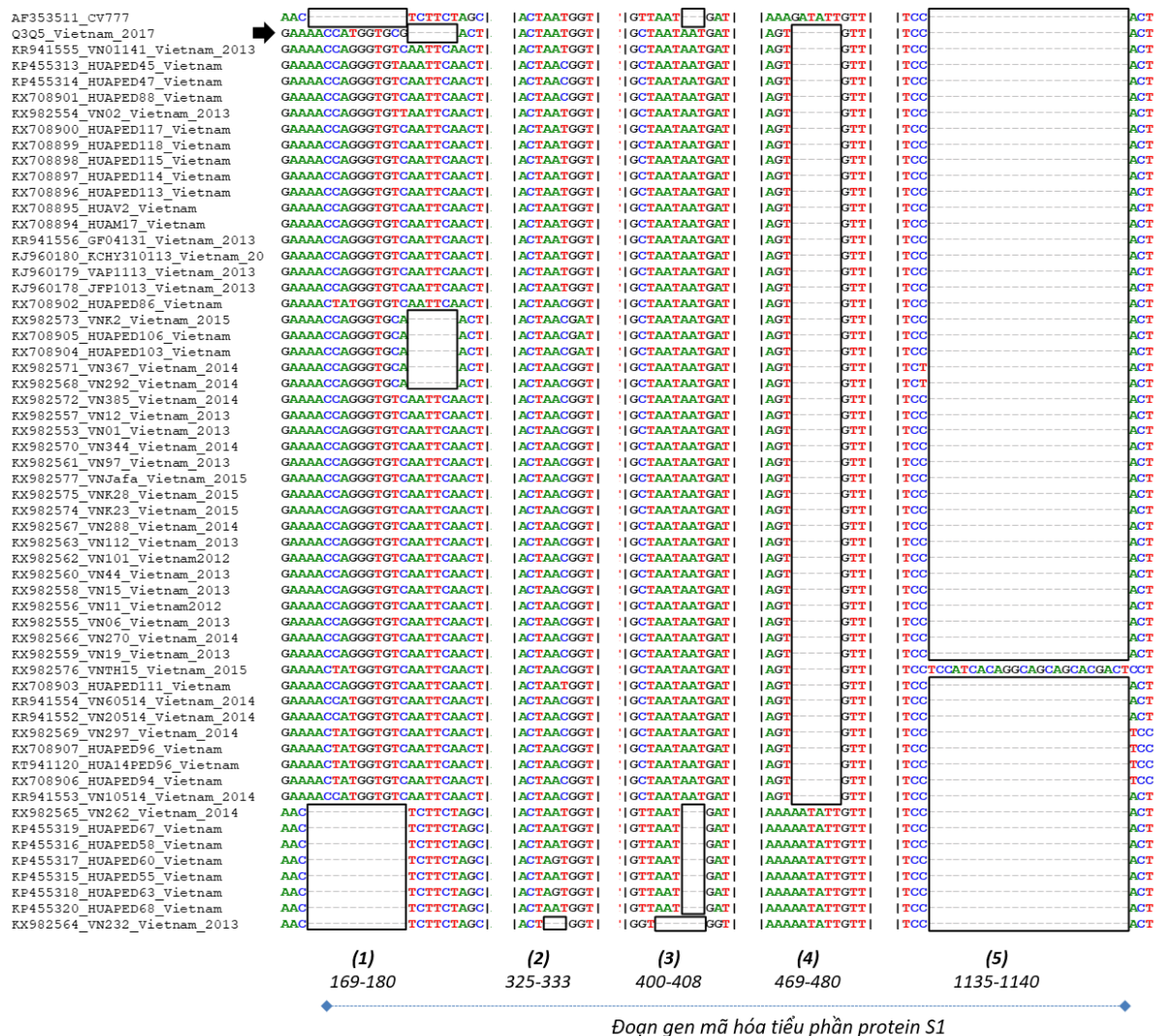
Trên protein S, có 3 vùng quyết định kháng nguyên kích thích sản sinh kháng thể trung hòa: COE từ aa 499-638 (Chang & cs., 2002), S1D từ aa 636-789 (Sun & cs., 2007) và 2C10 từ aa 1368-1374 (Cruz & cs., 2008). Đột biến thêm - xóa của chủng PEDV_HY2017 trong nghiên cứu xảy ra tại codon mã hóa aa ở các vị trí (so với chủng CV777) là: 58-59 (vùng 1), 158-159 (vùng 4) và đều nằm ngoài 3 epitop trung hòa kể trên. Do đó, các đột biến thêm - xóa được dự đoán không ảnh hưởng tới đáp ứng miễn dịch. Thực nghiệm in vitro đã chứng minh khả năng trung hòa chéo giữa chủng PEDV có đột biến thêm - xóa và những chủng không có đột biến này (Chen & cs., 2016b).



Ghi chú: Nhánh dẫn tới chủng PEDV ở Việt Nam được đánh dấu màu xanh, chủng PEDV_HY2017 được đánh dấu màu đỏ. Giá trị bootstrap ở mỗi nút (node) được hiển thị cho các phân nhánh.

Hình 6. Nhánh cây sinh học phân tử của PEDV dẫn tới chủng PEDV_HY2017

Một số đặc tính sinh học phân tử của chủng PEDV (Porcine Epidemic Diarrhea Virus) phân lập ở lợn nuôi tại Hưng Yên



Ghi chú: Vị trí nucleotide được đánh dấu theo chủng tham chiếu CV777 (AF353511).

Hình 7. Đột biến thêm - xóa ở một phần gen S của chủng virus PEDV_HY2017

5. KẾT LUẬN

- Đã xác định được bộ môi trường nuôi cấy của Tian & cs. (2013) là phù hợp để giải mã gen chủng PEDV_HY2017.

- Chủng phân lập PEDV_HY2017 thuộc genogroup G2 và có mức tương đồng về trình tự gen mã hóa tiểu phần protein S1 với các chủng PEDV của Việt Nam là 90%- 91% (genogroup G1) 95,7%- 98,2% (genogroup G2).

- Chủng PEDV_HY2017 mang 2 vùng đột biến thêm- xóa ở đoạn gen mã hóa tiểu phần protein S1 và giống với các chủng PEDV genogroup G2 của Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Boniotti M.B., Papetti A., Lavazza A., Alborali G., Sozzi E., Chiapponi C., Faccini S., Bonilauri P., Cordioli P. & Marthaler D. (2016). Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Discovery of a Recombinant Swine Enteric Coronavirus, Italy. Emerg Infect Dis. 22(1): 83-7.
- Carvajal A., Arguello H., Martinez-Lobo F.J., Costillas S., Miranda R., de Nova P.J.D. & Rubio P. (2015). Porcine epidemic diarrhoea: new insights into an old disease. Porcine Health Manag. 1(1): 12.
- Chang S.H., Bae J.L., Kang T.J., Kim J., Chung G.H., Lim C.W., Laude H., Yang M.S. & Jang Y.S. (2002). Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the

- porcine epidemic diarrhea virus. *Mol Cells*. 14(2): 295-9.
- Chen X., Yang J., Yu F., Ge J., Lin T. & Song T. (2012). Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) samples from field cases in Fujian, China. *Virus Genes*. 45(3): 499-507.
- Chen F., Ku X., Li Z., Memon A.M., Ye S., Zhu Y., Zhou C., Yao L., Meng X. & He Q. (2016a). Genetic characteristics of porcine epidemic diarrhea virus in Chinese mainland, revealing genetic markers of classical and variant virulent parental/attenuated strains. *Gene*. 588(1): 95-102.
- Chen Q., Thomas J.T., Gimenez-Lirola L.G., Hardham J.M., Gao Q., Gerber P.F., Opriessnig T., Zheng Y., Li G., Gauger P.C., Madson D.M., Magstadt D.R. & Zhang J. (2016b). Evaluation of serological cross-reactivity and cross-neutralization between the United States porcine epidemic diarrhea virus prototype and S-INDEL-variant strains. *BMC Vet Res*. 12(1): 70.
- Chung H.C., Nguyen V.G., Moon H.J., Lee J.H., Park S.J., Lee G.E., Kim H.K., Noh Y.S., Lee C.H., Goede D. & Park B.K. (2015). Isolation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus during outbreaks in South Korea, 2013-2014. *Emerg Infect Dis*. 21(12): 2238-40.
- Cruz D.J., Kim C.J. & Shin H.J. (2008). The GPRLQPY motif located at the carboxy-terminal of the spike protein induces antibodies that neutralize Porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res*. 132(1-2): 192-6.
- Diep N.V., Norimine J., Sueyoshi M., Lan N.T. & Yamaguchi R. (2017). Novel Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) Variants with Large Deletions in the Spike (S) Gene Coexist with PEDV Strains Possessing an Intact S Gene in Domestic Pigs in Japan: A New Disease Situation. *PLoS One*. 12(1): e0170126.
- Diep N.V., Sueyoshi M., Izzati U., Fuke N., Teh A.P.P., Lan N.T. & Yamaguchi R. (2018). Appearance of US-like porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) strains before US outbreaks and genetic heterogeneity of PEDVs collected in Northern Vietnam during 2012-2015. *Transbound Emerg Dis*. 65(1): e83-e93.
- Do Tien Duy, Nguyen Tat Toan, Puranaveja S. & Thanawongnuwech R. (2011). Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates from southern Vietnam during 2009-2010 outbreaks. *Thai Journal of Veterinary Medicine*. 41(1): 55-64.
- Gao Y., Kou Q., Ge X., Zhou L., Guo X. & Yang H. (2013). Phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus field strains prevailing recently in China. *Arch Virol*. 158(3): 711-5.
- Grasland B., Bigault L., Bernard C., Quenault H., Toulouse O., Fablet C., Rose N., Touzain F. & Blanchard Y. (2015). Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea s gene indel strain isolated in france in december 2014. *Genome Announc*. 3(3): e00535-15.
- Hou Y., Lin C.M., Yokoyama M., Yount B.L., Marthaler D., Douglas A.L., Ghimire S., Qin Y., Baric R.S., Saif L.J. & Wang Q. (2017). Deletion of a 197-amino-acid region in the N-terminal domain of spike protein attenuates porcine epidemic diarrhea virus in piglets. *J Virol*. 91(14): e00227-17.
- Kumar S., Stecher G. & Tamura K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 33(7): 1870-4.
- Le V.P., Le D.Q., Than D.D., Nguyen T.T., Nguyen B.H., Choi S.E. & An D.J. (2016). Genetic diversity of the spike gene of the porcine epidemic diarrhea virus collected from the central and northern Vietnam during 2013-2016, 19th Federation of Asian Veterinary Associations Congress. pp. 113-117.
- Lee C. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virol J*. 12(1): 193.
- Li C., Li W., Lucio De Esarte E., Guo H., Van Den Elzen P., Aarts E., Van Den Born E., Rottier P.J. M. & Bosch B.J. (2017). Cell attachment domains of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein are key targets of neutralizing antibodies. *J Virol*. 91(12): e00273-17.
- Marthaler D., Bruner L., Collins J. & Rossow K. (2014). Third strain of porcine epidemic diarrhea virus, United States. *Emerg Infect Dis*. 20(12): 2162-3.
- Nguyễn Tất Toàn & Đỗ Tiến Duy (2012). Đặc trưng kiểu gen của virus gây bệnh tiêu chảy cấp (PEDV) trên heo ở một số tỉnh miền Đông Nam Bộ. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*. 19(7): 34-41.
- Nguyễn Tất Toàn, Nguyễn Đình Quát, Trịnh Thị Thanh Huyền, Đỗ Tiến Duy, Trần Thị Dân, Nguyễn Thị Phước Ninh & Nguyễn Thị Thu Năm (2012). Phát hiện virus gây bệnh tiêu chảy cấp (PEDV) trên heo ở các tỉnh miền Đông Nam Bộ. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*. 19(5): 23-28.
- Nguyễn Trung Tiến, Vũ Thị Thu Hằng, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Nguyễn Bá Hiên & Lê Văn Phan (2015). Một số đặc điểm sinh học phân tử của virus gây ra dịch tiêu chảy cấp ở lợn (porcine epidemic diarrhea-PED) tại Quảng Trị, Thái Nguyên và Thái Bình từ năm 2013-2014. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 13(7): 1089-1100.
- Oldham J. (1972). Letter to the editor. *Pig Farming*. p. 10.

- Song D., Moon H. & Kang B. (2015). Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin Exp Vaccine Res.* p. 4.
- Song D. & Park B. (2012). Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes.* p. 44.
- Sun D.B., Feng L., Shi H.Y., Chen J.F., Liu S.W. & Chen H.Y. (2007). Spike protein region (aa 636-789) of porcine epidemic diarrhea virus is essential for induction of neutralizing antibodies. *Acta Virol.* p. 51.
- Theuns S., Conceicao-Neto N., Christiaens I., Zeller M., Desmarets L.M., Roukaerts I.D., Acar D.D., Heylen E., Matthijssens J. & Nauwynck H.J. (2015). Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus from a novel outbreak in Belgium, January 2015. *Genome Announc.* 3(3): e00506-15.
- Tian Y., Yu Z., Cheng K., Liu Y., Huang J., Xin Y., Li Y., Fan S., Wang T., Huang G., Feng N., Yang Z., Yang S., Gao Y. & Xia X. (2013). Molecular characterization and phylogenetic analysis of new variants of the porcine epidemic diarrhea virus in Gansu, China in 2012. *Viruses.* 5(8): 1991-2004.
- Vui D.T., Thanh T.L., Tung N., Srijangwad A., Tripipat T., Chuanasa T. & Nilubol D. (2015). Complete genome characterization of porcine epidemic diarrhea virus in Vietnam. *Arch Virol.* 160(8): 1931-8.
- Wang L., Byrum B. & Zhang Y. (2014). New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States. *Emerg Infect Dis.* 20(5): 917-9.