Vietnam J. Agri. Sci. 2017, Vol. 15, No. 1: 44-57 Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2017, tập 15, số 1: 44-57
www.vnua.edu.vn

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA VIRUS CA RÊ PHÂN LẬP ĐƯỢC TẠI MỘT SỐ TỈNH PHÍA BẮC VIỆT NAM

Trần Văn Nên*, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Văn Thanh, Lương Quốc Hưng

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email: bstytvnen@gmail.com*

Ngày gửi bài: 06.02.2016 Ngày chấp nhận: 13.03.2016

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành để xác định một số đặc điểm sinh học phân tử của virus Ca rê phân lập được tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam. 5 chủng virus Ca rê nghiên cứu được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm của chó mắc bệnh Ca rê thu thập từ 5 địa phương gồm Nam Định, Thái Bình, Hưng Yên, Hà Nội và Bắc Giang trong năm 2015. Tách chiết ARN tổng số, thực hiện phản ứng RT-PCR và PCR-sequence với cặp mồi (CDVff1, CDV-HS2) và (Upp1, Upp2) đặc hiệu khuếch đại gene Haemagglutinin (H) và Phosphoprotein (P) của virus. Sản phẩm phản ứng PCR-sequence được giải trình tự gene dựa trên cơ sở của phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự gene H và P của 5 chủng virus Ca rê nghiên cứu có độ dài lần lượt là 1824 bp và 402 bp. Mức độ tương đồng về nucleotide ở gene H và P giữa 5 chủng virus nghiên cứu đạt tỷ lệ cao lần lượt là 90,05 - 99,61% và 94,81 - 99,75%. Mức độ tương đồng về amino acid mã hóa từ gene H và P giữa 5 chủng virus nghiên cứu đạt tỷ lệ cao lần lượt là 89,38 - 99,5% và 92,47 - 100,0%. Kết quả xây dựng phả hệ chỉ ra 5 chủng virus Ca rê phân lập được nằm trong 3 nhánh phát sinh khác nhau thuộc 3 genotype lần lượt là Asia 1, Asia 2 và Classic. Nghiên cứu đã chỉ ra được các genotype gây bệnh chính đang lưu hành tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam, từ đó giúp ích cho việc phát triển vacxin từ các chủng virus gây bệnh Ca rê trong nước góp phần kiểm soát dịch bệnh.

Từ khóa: Virus Ca rê, sinh học phân tử, Việt Nam.

Molecular Biological Characteristics of Canine Distemper Virus Strain Isolated from Some Provinces in The North of Vietnam

ABSTRACT

The study was conducted to investigate molecular biological characteristics of isolated canine distemper virus (CDV) strains from some provinces in the North of Vietnam. Five virus strains in this study were isolated from clinical samples of dogs infected with CDV in Nam Dinh, Thai Binh, Hung Yen, Hanoi and Bac Giang provinces in 2015. After the viral ARNs were extracted from tissue samples, RT-PCR and PCR-sequence assay were performed using specific primer pairs to amplify haemagglutinin (H) and phosphoprotein (P) genes of CDV. The products of PCR-sequence were directly sequenced using Sanger sequencing method. The sequence of H and P genes was 1824bp and 402bp in length, respectively. The high similarity of nucleotides in H and P genes between 5 virus strains was 90.05 - 99.61% and 94.81 - 99.75%, respectively. The high similarity of amino acids encoded by H and P genes between 5 virus strains was high with 89.38 - 99.5% and 92.47 - 100.0%, respectively. The phylogenetic trees showed that five isolated virus strains belonged to three different genotypes: Asia 1, Asia 2 and Classic. These results indicated that pathogenic genotypes of virus strains were circulating in northern provinces of Vietnam. These results are useful information for producing vaccine from pathogenic virus strains to control CDV in Vietnam.

Keywords: Canine distemper virus, molecular biological characteristics, Vietnam.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Ca rê (bệnh sài sốt) là một trong các bệnh nguy hiểm nhất trên chó con 3 - 6 tháng tuổi, tỷ lệ chết từ 50 - 90%. Chó mắc bệnh bị tổn thương lớn ở hệ tiêu hoá, đặc biệt là dạ dày và ruột, hệ thần kinh trung ương và hệ hô hấp (Woma and Van Vuuren, 2009). Hiện nay, bệnh có ở khắp nơi trên thế giới, không những xảy ra ở chó nuôi mà còn ở nhiều quần thể động vật hoang dã. Những chó mắc bệnh Ca rê nhưng không biểu hiện triệu chứng rõ ràng đã trở thành mối đe dọa nghiêm trọng cho việc bảo tồn nhiều loài thú ăn thịt và thú có túi.

Nguyên nhân gây bệnh Ca rê trên chó là do virus Ca rê (Canine distemper virus - CDV). CDV là một thành viên của giống *Morbillivirus*, thuộc họ *Paramyxoviridae*. Virus Ca rê có cấu tạo gồm một sợi ARN đơn không phân đoạn (khoảng 15.690 nucleotide) và có vỏ bọc từ 150 - 300 nm (Murphy *et al.*, 1999). Trong cấu trúc bộ gen gồm 6 gen mã hóa cho một protein tạo lớp vỏ bọc (M), hai glycoprotein (yếu tố kết dính (H), yếu tố dung hợp (F)), hai protein có liên quan tới khả năng phiên mã (phosphoprotein - P và large protein - L) và nucleocapsid N đóng gói ARN của virus (Sidhu *et al.*, 1993). Phân loại theo địa lý của virus Ca rê dựa trên trình tự của protein H theo Harder và Osterhaus (1997) và Martella *et al.*, (2006) gồm 7 nhóm chính: Arctic - like, America 1/Classic, America 2, Asia 1, Asia 2, Europe, Europe-wildlife.

Ở Việt Nam, bệnh Ca rê được phát hiện từ năm 1920. Chó phát bệnh thường chết với tỷ lệ c 50 - 80%, có thể lên đến 100% nếu không được điều trị kịp thời (Hồ Đình Chúc, 1993). Cho đến nay, bệnh Ca rê xảy ra ở hầu hết các tỉnh và gây thiệt hại lớn cho đàn chó nuôi trong nước do tỷ lệ tử vong của bệnh rất cao (Lê Thị Tài, 2006). Nhưng các nghiên cứu về đặc tính di truyền của virus Ca rê ở trong nước còn rất khiêm tốn, bên cạnh đó hiệu quả bảo hộ của các vacxin phòng bệnh Ca rê đang lưu hành hiện nay chưa có nhiều báo cáo cụ thể. Xuất phát từ thực tiễn đó, nhóm nghiên cứu đã tiến hành nghiên cứu về đặc tính sinh học phân tử của các chủng virus Ca rê phân lập tại một số tỉnh phía Bắc, Việt Nam. Kết quả nghiên cứu có ý nghĩa rất quan trọng trong việc cung cấp thông tin về dịch tễ học phân tử dựa trên dữ liệu di truyền của các chủng virus Ca rê phân lập được, từ đó giúp cho việc sàng lọc và lựa chọn được chủng virus tiềm năng phục vụ sản xuất vacxin phòng bệnh, chế tạo kit chẩn đoán, chế tạo kháng nguyên dùng trong chẩn đoán, góp phần giảm thiểu thiệt hại kinh tế do bệnh Ca rê gây ra cho đàn chó nuôi ở trong nước.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

5 chủng virus Ca rê là CDV-VNUA-768, CDV-HUA-02H, CDV-HUA-03R, CDV-HUA-04H và CDV-HUA-05P được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm của chó mắc bệnh Ca rê (được chẩn đoán dương tính bằng RT-PCR và hóa mô miễn dịch) được thu thập từ 5 địa phương gồm: Nam Định, Thái Bình, Hưng Yên, Hà Nội, Bắc Giang trong năm 2015. Các mẫu virus Ca rê được bảo quản ở điều kiện -80^{0}C tại Phòng thí nghiệm trọng điểm CNSH, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết ARN tổng số

Từ các chủng virus Ca rê được bảo quản trong điều kiện -80^{0}C, tiến hành tách chiết ARN tổng số theo hướng dẫn đi kèm của bộ Kit QIAamp Viral ARN Minikit (Qiagen, Hilden, Đức).

2.2.2. Phương pháp RT-PCR

Mẫu ARN sau khi tách chiết sẽ được tiến hành phản ứng RT-PCR theo bộ Kit Qiagen One-step RT-PCR. Trong đó, các cặp mồi được sử dụng gồm mồi nhân đoạn gene H (CDVff1; CDV-HS2); mồi nhân đoạn gene P (Upp1; Upp2) do công ty Greiner-bio-one (Nhật Bản) cung cấp và chu kì nhiệt phản ứng RT-PCR theo nghiên cứu của Lan *et al.* (2005a).

2.2.3. Giải trình tự gene và xây dựng cây sinh học phân tử

Sản phẩm phản ứng RT-PCR được tinh sạch bằng bột kit QIAquick Extraction (Qiagen, Hilden, Đức), chạy phản ứng PCR sequence, sau

Bảng 1. Các chủng tham chiếu sử dụng để xây dựng cây sinh học phân tử

STT	Gene	Mã hiệu (Accession number)	Tên chủng virus	Quốc gia	Năm phân lập
1	H	Z35493	Convac vaccine	Đan Mạch	1994
2	H	X84999	1493/Han89	Anh	1996
3	H	Z54166	A92-6	Hà Lan	1996
4	H	Z47759	Danish mink	Đan Mạch	1997
5	H	Z47763	black leopard	Đan Mạch	1997
6	H	AB016776	Tanu96	Nhật Bản	1998
7	Full gene	AF014953	Wyeth-Lederke	Hoa Kỳ	1998
8	H	D85755	Yanaka strain	Nhật Bản	1999
9	H	AF172411	liud	Trung Quốc	1999
10	H	AF259552	Snyder Hill	Đức	2000
11	H	AB025271	KDK-1	Nhật Bản	2002
12	Full gene	AF378705	Onderstepoort	Hoa Kỳ	2002
13	H	AB040767	HM-3	Nhật Bản	2002
14	H	D85754	Hamamatsu	Nhật Bản	2003
15	H	AY297454	5VD	Nhật Bản	2003
16	Full gene	AY466011	98-2654	Hoa Kỳ	2004
17	H	DQ228166	207/00	Italy	2006
18	H	DQ226087	179/94	Italy	2006
19	H	AB252718	009L	Nhật Bản	2007
20	H	EU252148	Seoul	Hàn Quốc	2007
21	H	FJ405224	monkey-KM-01	Trung Quốc	2008
22	H	EU743934	HLJ1	Trung Quốc	2008
23	H	EU716074	98Marten	Hàn Quốc	2008
24	H	FJ848530	BJ080514	Trung Quốc	2009
25	H	EF445053	NM	Trung Quốc	2009
26	H	EF445052	HL	Trung Quốc	2009
27	H	FJ461715	4sp	Nam Phi	2010
28	H	FJ461711	7L	Nam Phi	2010
29	H	FJ416339	BV4	Australia	2011
30	Full gene	KJ466106	CDV SY	Trung Quốc	2014
31	P	AB028915	Hamamatsu	Nhật Bản	1999
32	P	AB028914	Yanaka	Nhật Bản	1999
33	P	AB028916	Jujo	Nhật Bản	1999
34	P	AF181446	Rockborn	Nga	1999
35	P	AF259549	German dog	Nga	2000
36	Full gene	AY386315	5804	Hoa Kỳ	2003
37	P	AY286481	Snyder Hill	Hoa Kỳ	2004
38	P	AB212728	007Lm	Nhật Bản	2005
39	P	AB212961	S124C	Nhật Bản	2006
40	P	AB212959	Ac96I	Nhật Bản	2006
41	P	AB212960	P94S	Nhật Bản	2006
42	P	AB252715	011C	Nhật Bản	2007
43	P	AB252714	009L	Nhật Bản	2007
44	P	AB606409	ferret 1017	Nhật Bản	2010
45	Full gene	AB490680	007Lm/B	Nhật Bản	2014

đó giải trình tự trực tiếp sản phẩm phản ứng PCR sequence trên máy giải trình tự gene tự động CEQ-8000 (Mỹ). Dữ liệu trình tự gene thu được từ máy giải trình tự gene được xử lý bằng phần mềm genetyx (version 5.0.4) và MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0). Cây sinh học phân tử được xây dựng bằng phần mềm MEGA, sử dụng phương pháp test Maximum likehood với giá trị bootstrap là 1.000 đơn vị. Các chủng virus tham chiếu sử dụng để xây dựng cây sinh học phân tử được thu thập từ dữ liệu trên ngân hàng gene thế giới.

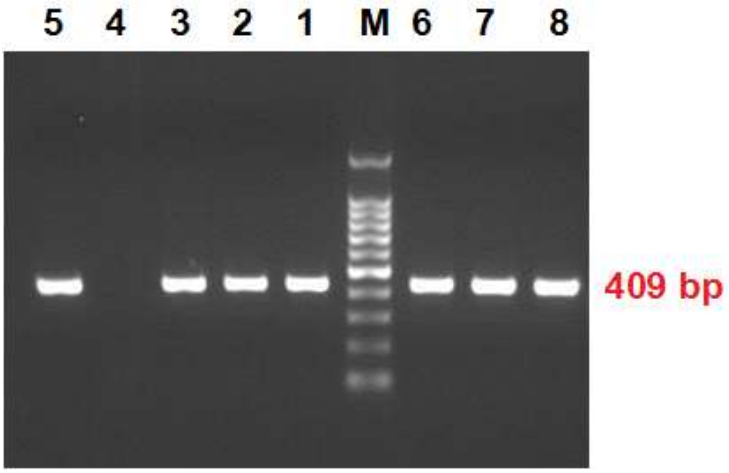
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của các chủng virus nghiên cứu

Sau bước tách chiết ARN tổng số và RT-PCR, sản phẩm của phản ứng RT-PCR được điện di kiểm tra trước khi tiến hành phản ứng PCR sequence. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng RT-PCR với đoạn gene P được trình bày ở hình 1 với một băng sáng duy nhất tương ứng với kích thước là 409 bp. Điều này cho thấy các bước tách chiết ARN tổng số và phản ứng PCR đã được thực hiện thành công, đây là cơ sở cho bước giải trình tự gene.

Từ kết quả giải trình tự gene, qua phân tích và xử lý tín hiệu trình tự gene thu được bằng phần mềm Genetyx (phiên bản 5.0.4) đã thu được trình tự nucleotide của đoạn gene H và gene P của virus với độ dài lần lượt là 1.824 bp và 402 bp. Kết quả so sánh trình tự nucleotide giữa 5 chủng virus nghiên cứu có 231 vị trí sự sai khác tương đối về thành phần nucleotide với nhau và khác so với chủng virus vacxin. Khi so sánh về trình tự nucleotide ở gene H giữa 5 chủng virus nghiên cứu với nhau kết quả thu được chủng CDV-VNUA-768 có số lượng vị trí sai khác so với chủng CDV-HUA-02H, CDV-HUA-03R, CDV-HUA-04H và CDV-HUA-05P lần lượt là: 126, 131, 154, 16 vị trí. Chủng CDV-HUA-02H có số lượng vị trí sai khác so với chủng CDV-HUA-03R, CDV-HUA-04H và CDV-HUA-05P lần lượt là: 7, 153, 124 vị trí. Chủng CDV-HUA-03R có số lượng vị trí sai khác so với chủng CDV-HUA-04H và CDV-HUA-05P lần lượt là 156 và 128 vị trí. Chủng CDV-HUA-04H có 154 vị trí sai khác so với chủng CDV-HUA-05P.

Kết quả so sánh trình tự gene phosphoprotein của các chủng virus nghiên cứu được giải trình tự gene có sự sai khác tương đối về thành phần nucleotide giữa 5 chủng virus nghiên cứu và khác so với chủng virus vacxin. Có 27 vị trí sai khác về nucleotide giữa 5 chủng virus nghiên



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng RT-PCR với đoạn gene P của 5 chủng virus nghiên cứu

Ghi chú: Giếng 1, 2, 3 bên trái Marker tương ứng là mẫu virus CDV-VNUA-768, CDV-HUA-02H, CDV-HUA-03R; Giếng 4: Đối chứng âm là nước khử ion; Giếng 5: Đối chứng dương là ARN của virus vacxin Onderstepoort; Giếng 6, 7, 8 bên phải Marker tương ứng là mẫu virus CDV-HUA-04H và CDV-HUA-05P.

cứu và chủng virus vacxin lần lượt ở các vị trí: 48, 49, 52, 55, 88, 96, 105, 129, 174, 183, 186, 216, 225, 230, 237, 243, 246, 250, 253, 269, 288, 307, 308, 344, 350, 356, 392. Trong đó, khi so sánh giữa các chủng virus nghiên cứu với nhau nhận thấy số lượng vị trí sự sai khác giữa chủng CDV-VNUA-768 với 4 chủng virus CDV-HUA-02H, CDV-HUA-03R, CDV-HUA-04H và CDV-HUA-05P lần lượt là 16, 15, 17, 1 vị trí. Chủng CDV-HUA-02H có số lượng vị trí sai khác so với chủng CDV-HUA-03R, CDV-HUA-04H và CDV-HUA-05P lần lượt là: 1, 19, 15 vị trí. Chủng CDV-HUA-03R có số lượng vị trí sai khác so với chủng CDV-HUA-04H và CDV-HUA-05P lần lượt là 18 và 14 vị trí. Chủng CDV-HUA-04H có 16 vị trí sai khác so với chủng CDV-HUA-05P.

Các vị trí sai khác được phân bố ở nhiều vị trí theo chiều dài của đoạn gene H và P, không tập trung ở một khu vực nhất định, điều này cho thấy có sự sai khác về tính kháng nguyên (trình tự amino acid mã hóa từ trình tự nucleotide) giữa 5 chủng virus nghiên cứu. Khi so sánh về thành phần nucleotide ở đoạn gene H và gene P giữa 5 chủng virus nghiên cứu với sự sai khác về nucleotide không quá 12,66% và 6,72% tổng số nucleotide của đoạn gene H và gene P. Điều này sẽ dẫn đến các chủng virus trong cùng một nhánh phát sinh sẽ có ít sự sai khác về trình tự nucleotide.

Kết quả so sánh mức độ tương đồng về trình tự nucleotide ở gene H và P giữa 5 chủng virus nghiên cứuvà chủng virus vacxin Onderstepoort được trình bày ở bảng 2 và 3.

Kết quả ở bảng 2 và 3 cho thấy 5 chủng virus nghiên cứu có mức độ tương đồng về nucleotide ở gene H và gene P đạt tỷ lệ khá cao lần lượt là 90,05 - 99,61% và 94,81 - 99,75%. Ở gene H thì 2 chủng CDV-VNUA-768 và CDV-HUA-05P có mức độ tương đồng tương đối cao là 99,11%; 2 chủng CDV-HUA-02H và CDV-HUA-03R có mức độ tương đồng tương đối cao là 99,61%; chủng CDV-HUA-04H thì có sự sai khác

Bảng 2. Sự tương đồng về trình tự nucleotide của gene H giữa các chủng virus Ca rê nghiên cứu với mẫu virus vacxin Onderstepoort (%)

	CDV-VNUA-768	CDV-HUA-02H	CDV-HUA-03R	CDV-HUA-04H	CDV-HUA-05P	Onderstepoort
CDV-VNUA-768	100,0					
CDV-HUA-02H	92,19	100,0				
CDV-HUA-03R	91,84	99,61	100,0			
CDV-HUA-04H	90,23	90,26	90,05	100,0		
CDV-HUA-05P	99,11	92,39	92,05	90,30	100,0	
Onderstepoort	90,17	90,20	89,99	99,34	90,24	100,0

Bảng 3. Sự tương đồng về trình tự nucleotide của gene P giữa các chủng virus Ca rê nghiên cứu với mẫu virus vacxin Onderstepoort (%)

	CDV-VNUA-768	CDV-HUA-02H	CDV-HUA-03R	CDV-HUA-04H	CDV-HUA-05P	Onderstepoort
CDV-VNUA-768	100,0					
CDV-HUA-02H	95,73	100,0				
CDV-HUA-03R	96,02	99,75	100,0			
CDV-HUA-04H	95,42	94,81	95,11	100,0		
CDV-HUA-05P	99,75	96,01	96,29	95,70	100,0	
Onderstepoort	95,42	94,81	95,11	99,50	95,70	100,0

khác nhiều so với 4 chủng virus còn lại với mức độ tương đồng dao động từ 90,05% tới 90,3%. Ở gene P thì 2 chủng CDV-VNUA-768 và CDV-HUA-05P có mức độ tương đồng tương đối cao là 99,75%; 2 chủng CDV-HUA-02H và CDV-HUA-03R có mức độ tương đồng tương đối cao là 99,75%; chủng CDV-HUA-04H thì có sự sai khác nhiều so với 4 chủng virus còn lại với mức độ tương đồng dao động từ 94,81% tới 95,42%.

Kết quả nghiên cứu này thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của Lan *et al.* (2006a) và Guo *et al.* (2013) về tỷ lệ tương đồng nucleotide; điều này cho thấy có sự sai khác nhau giữa 5 chủng virus nghiên cứu, các chủng virus này có thể nằm cách xa nhau trong cùng một nhánh phát sinh.

Sự tương đồng về nucleotide ở gene H và gene P giữa 5 chủng virus nghiên cứu với chủng virus vacxin đạt tỷ lệ lần lượt là 89,99 - 99,34% và 94,81 - 99,50%. Kết quả nghiên cứu về mức độ tương đồng trình tự nucleotide giữa 5 chủng virus mới phân lập với chủng virus vacxin cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Lan *et al.* (2006a). Trong đó, chủng CDV-HUA-04H có mức độ tương đồng với chủng virus vacxin cao hơn so với 4 chủng virus còn lại. Điều này cho thấy sự gần gũi trong mối quan hệ di truyền giữa chủng virus CDV-HUA-04H trong nghiên cứu và chủng virus vacxin.

3.2. Kết quả so sánh trình tự amino acid của các chủng virus nghiên cứu

Kết quả so sánh về trình tự amino acid được mã hóa từ gene H và gene P được trình bày ở hình 2, 3.

Khi so sánh về trình tự amino acid mã hóa từ gene H giữa 5 chủng virus nghiên cứu và chủng virus vacxin thấy có 83 vị trí sai khác. Trong đó, khi so sánh giữa 5 chủng virus nghiên cứu với nhau thì chủng CDV-VNUA-768 có sự sai khác với chủng virus CDV-HUA-02H, CDV-HUA-03R, CDV-HUA-04H và CDV-HUA-05P lần lượt là 40, 40, 57, 6 vị trí. Chủng virus CDV-HUA-02H có sự sai khác với chủng virus CDV-HUA-03R, CDV-HUA-04H và CDV-HUA-05P lần lượt là 3, 58, 41 vị trí. Chủng CDV-HUA-03R có sự sai khác với chủng CDV-HUA-04H và CDV-HUA-05P lần lượt là 21 và 42 vị trí. Chủng CDV-HUA-04H có 58 vị trí sai khác với chủng CDV-HUA-05P.

Kết quả ở hình 2 cho thấy 5 chủng virus Ca rê phân lập được có trình tự amino acid mã hóa từ gene H có độ dài là 607 amino acid. Trong khi đó, chủng virus vacxin có trình tự amino acid mã hóa từ gene H có độ dài ngắn hơn là 604 amino acid. 5 chủng virus nghiên cứu và chủng virus vacxin Onderstepoort đều có 12 vùng chứa cysteine nằm rải rác theo chiều dài của trình tự amino acid mã hóa từ gene H ở các vị trí lần lượt là: 139, 154, 188, 283, 296, 377, 382, 390, 490, 566, 575, 602. Khi so sánh kết quả nghiên cứu với kết quả nghiên cứu của Iwatsuki *et al.* (1997); Lan *et al.* (2005b, 2006a, 2006b, 2007, 2009a) thấy không có sự thay đổi về số lượng vị trí chứa cysteine trên các chủng virus Ca rê đã được phân lập trước đây và 5 chủng mới được phân lập trong nghiên cứu này.

Vùng kị nước chính của 3 chủng virus CDV-VNUA-768, CDV-HUA-04H và CDV-HUA-05P dài 22 amino acid nằm ở vị trí từ amino acid 35 tới 56, dài hơn so với các chủng virus Hamamatsu, Yanaka và Ueno (Iwatsuki *et al.,* 1997) và bằng với chủng virus vacxin Onderstepoort. Vùng kị nước chính của 2 chủng virus CDV-HUA-02H và CDV-HUA-03R dài 21 amino acid từ amino acid 35 tới 55, bằng với các chủng Hamamatsu, Yanaka và Ueno (Iwatsuki *et al.,* 1997) và ngắn hơn 1 amino acid so với chủng virus vacxin Onderstepoort. Kết quả so sánh về vùng kị nước của chủng virus vacxin Onderstepoort trong nghiên cứu này có sự sai khác với chủng virus vacxin được sử dụng trong các nghiên cứu trước đây của Lan *et al.* (2006a).

Khi so sánh về các vị trí glycosyl hóa liên kết với Asparagine (N-glycosylation) giữa 5 chủng virus nghiên cứu thu được kết quả lần lượt là 9, 8, 8, 7, 9 vị trí. Chủng virus vacxin Onderstepoory có 6 vị trí glycosyl hóa liên kết với Asparagine. Kết quả về các vị trí glycosyl hóa liên kết với Asparagine (N-glycosylation) đã chỉ ra 5 chủng virus nghiên cứu và chủng virus vacxin Onderstepoort trong nghiên cứu này có sự sai khác với chủng vacxin Onderstepoort (AAG30920) của Iwatsuki *et al.* (1997) và Hirama *et al.* (2004) khi chỉ có 4 vị trí liên kết N-

glycosylation. Bên cạnh đó, trong 5 chủng virus phân lập được cũng có sự tương đồng với một số chủng trên thế giới về số lượng vị trí glycosyl hóa liên kết với Asparagine như: chủng 98-002 thuộc genotype Asia 2 có 8 vị trí (Mochizuki *et al.,* 1999); chủng virus phân lập tại Nhật Bản năm 1997 thuộc genotype Asia 1 cũng có 9 vị trí (Iwatsuki *et al.,* 1997); chủng 007Lm thuộc genotype Asia 2 có 8 vị trí (Lan *et al.,* 2005b); chủng virus P94S, Ac96I và S124C thuộc genotype Asia 1 có 9 vị trí (Lan *et al.,* 2007). Kết quả nghiên cứu này cho thấy có thể có sự sai khác về tính kháng nguyên giữa 5 chủng virus nghiên cứu và sai khác với các chủng virus Ca rê được phân lập và công bố trước đây.

Từ kết quả so sánh về trình tự amino acid mã hóa từ gene H giữa 5 chủng virus nghiên cứu, nhận thấy có các vị trí sai khác tập trung ở một số vùng như: 61-77, 155-162, 313-344, 365-376, 530-531, 583-586 (Hình 3.2). Những vị trí sai khác này có thể liên quan tới sự sai khác về đặc tính sinh học trên môi trường nuôi cấy giữa các chủng virus nghiên cứu. Bên cạnh đó, kết quả về các vùng sai khác về amino acid ở nghiên cứu này có sự sai khác với kết quả nghiên cứu của Vongpunsawad *et al.* (2004).

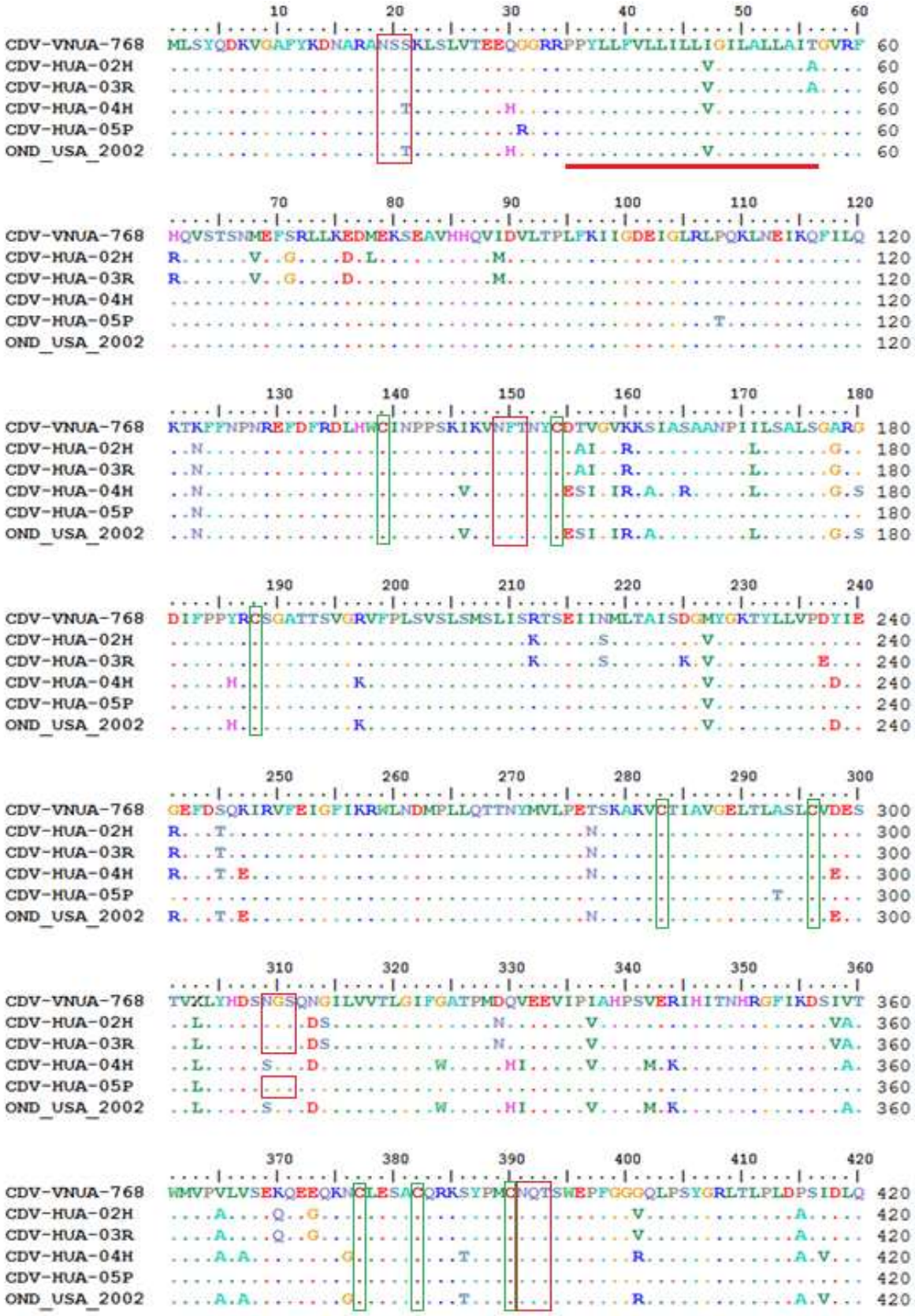
Kết quả ở hình 3 cho thấy 5 chủng virus nghiên cứu và chủng virus vacxin có trình tự amino acid mã hóa từ gene P có độ dài là 134 amino acid. Đồng thời, khi so sánh giữa 5 chủng virus nghiên cứu và chủng virus vacxin nhận thấy có 13 vị trí sai khác lần lượt là: 17, 18, 19, 30, 77, 84, 85, 90, 103, 115, 117, 119, 131. Trong đó, khi so sánh giữa chủng virus CDV-VNUA-768 có sự sai khác với với chủng CDV-HUA-02H, CDV-HUA-03R, CDV-HUA-04H và CDV-HUA-05P lần lượt là 9, 9, 8, 1 vị trí. Chủng CDV-HUA-02H có sự sai khác với chủng virus CDV-HUA-04H và CDV-HUA-05P lần lượt là 10 và 8 vị trí. Chủng CDV-HUA-03R có sự sai khác với chủng CDV-HUA-04H và CDV-HUA-05P lần lượt là 10 và 8 vị trí. Chủng CDV-HUA-04H có 7 vị trí sai khác với chủng CDV-HUA-05P.

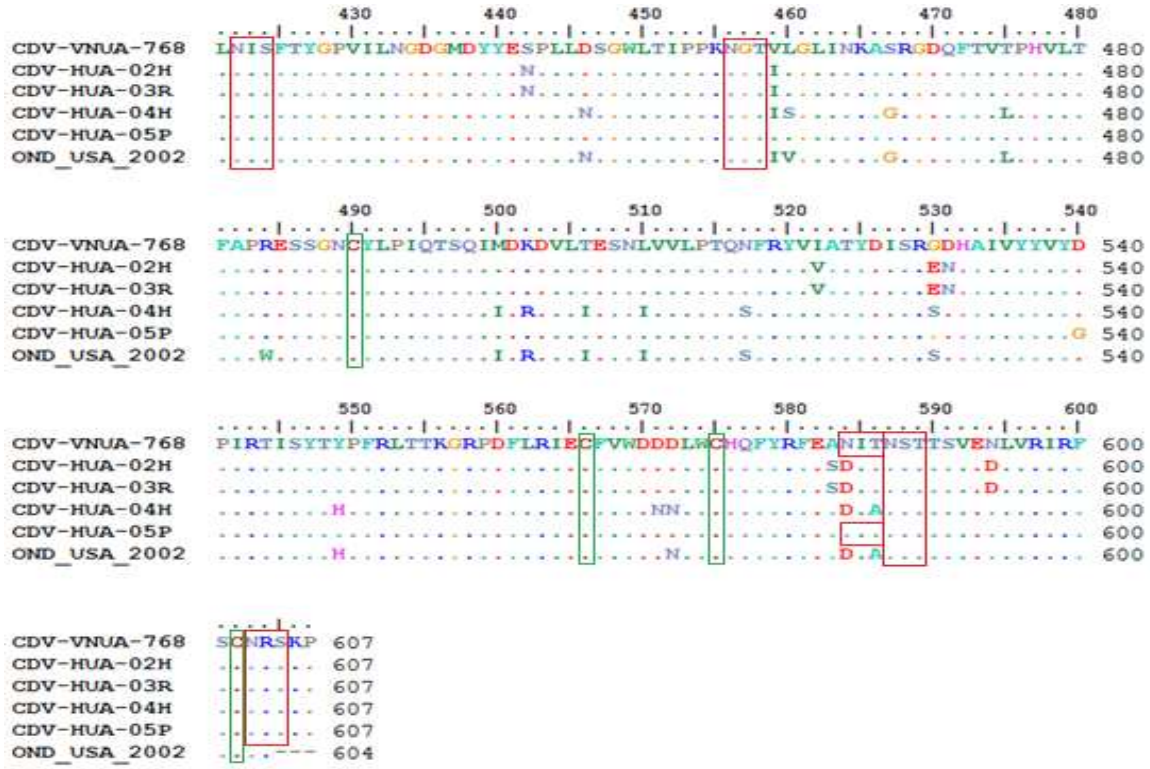
Khi so sánh giữa kết quả các vị trí sai khác về trình tự amino acid mã hóa từ gene H và P với trình tự nucleotide gene H và P giữa 5 chủng virus nghiên cứu, nhận thấy có sự sai khác. Điều này có thể được lý giải là do có nhiều bộ ba nucleotide cùng mã hóa cho một amino acid duy nhất, do đó dẫn đến sự sai khác khi so sánh giữa kết quả so sánh về trình tự nucleotide và amino acid giữa các chủng virus Ca rê nghiên cứu. Kết quả so sánh về sự sai khác về trình tự amino acid mã hóa từ đoạn gene H và P của 5 chủng virus nghiên cứu đã chỉ ra có sự sai khác trong tính kháng nguyên giữa các chủng virus Ca rê phân lập được thể hiện ở sự sai khác về khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch ở chó; ái lực và khả năng gây bệnh tích tế bào giữa 5 chủng virus nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu này có ý nghĩa trong việc xây dựng dữ liệu sinh học phân tử trong hồ sơ chủng giống và giúp lựa chọn và sàng lọc được chủng virus Ca rê có tiềm năng trong nghiên cứu sản xuất vacxin.

Kết quả so sánh mức độ tương đồng về trình tự amino acid mã hóa từ gene H và P giữa 5 chủng virus nghiên cứu và chủng virus vacxin Onderstepoort được trình bày ở bảng 4 và 5.

Kết quả ở bảng 4 và 5 cho thấy 5 chủng virus Ca rê nghiên cứu có mức độ tương đồng về amino acid tương ứng ở gene H và gene P đạt tỷ lệ khá cao lần lượt là 89,38%-99,5% và 92,47%-100,0%. Ở gene H thì 2 chủng CDV-VNUA-768 và CDV-HUA-05P có mức độ tương đồng tương đối cao là 99,0%; 2 chủng CDV-HUA-02H và CDV-HUA-03R có mức độ tương đồng tương đối cao là 99,5%; chủng CDV-HUA-04H có mức độ tương đồng thấp với 4 chủng virus còn lại từ 89,38% tới 90,1%.Ở gene P thì 2 chủng CDV-VNUA-768 và CDV-HUA-05P có mức độ tương đồng tương đối cao là 99,26%; 2 chủng CDV-HUA-02H và CDV-HUA-03R có mức độ tương đồng cao là 100,0%; chủng CDV-HUA-04H có mức độ tương đồng thấp với 4 chủng virus còn lại từ 92,47% tới 94,69%.

Mức độ tương đồng về amino acid tương ứng ở gene H và gene P giữa 5 chủng virus Ca rê nghiên cứu với chủng virus vacxin đạt tỷ lệ dao động lần lượt là 89,39 - 99,17% và 92,47 - 100,0%. Trong đó, chủng CDV-HUA-04H có mức độ tương đồng cao với chủng virus vacxin hơn so với 4 chủng virus còn lại.


CDV-VNUA-768
CDV-HUA-02H
CDV-HUA-03R
CDV-HUA-04H
CDV-HUA-05P
OND_USA_2002



Hình 2. So sánh trình tự amino acid mã hóa từ đoạn gene H của các chủng virus Ca rê nghiên cứu

Ghi chú: Các vị trí amino acid giống nhau được biểu thị bằng dấu (.); các vị trí có sự sai khác được biểu thị bằng amino acid tương ứng ở chủng virus đó. Vùng kị nước của virus Ca rê (vị trí amino acid từ 35 tới 56) biểu thị là đường gạch chân màu đỏ. Cysteine được đánh dấu bằng hình chữ nhật viền xanh lá cây. Các vị trí glycosyl hóa liên kết với Asparagine được đánh dấu bằng hình chữ nhật viền đỏ.

Kết quả nghiên cứu này thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của Lan *et al.* (2006a) khi chỉ ra mức độ tương đồng về gene H giữa 3 chủng P94S, Ac96I và S124C thuộc genotype Asia 1. Kết quả nghiên cứu này cũng thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của Guo *et al.* (2013) chỉ ra mức độ tương đồng về gene H giữa các chủng virus Ca rê thuộc genotype Asia 1.

3.3. Kết quả xây dựng cây sinh học phân tử

Kết quả phân tích nguồn gốc phát sinh của các chủng virus Ca rê nghiên cứu dựa trên sự sai khác nucleotide và amino acid ở đoạn gene P và H được thể hiện lần lượt tại hình 4 và 5.

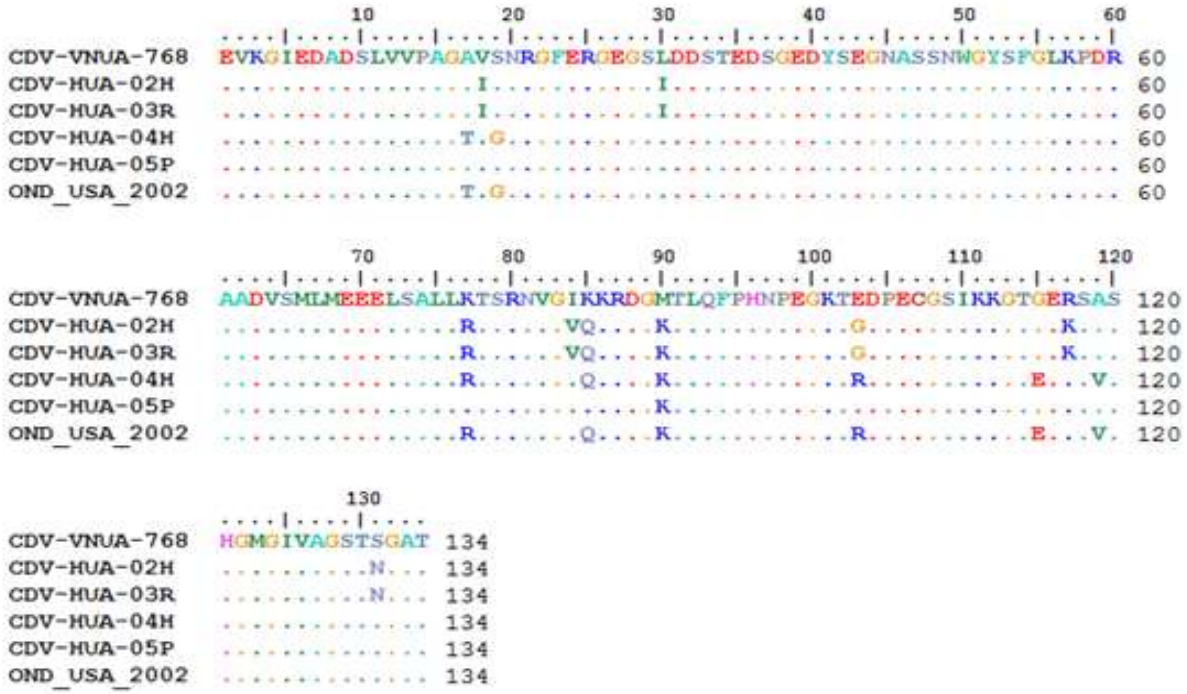
Kết quả phân tích nguồn gốc phát sinh loài theo sự sai khác nucleotide gene P ở hình 4 cho thấy 5 chủng virus Ca rê nghiên cứu nằm trong 3 nhánh phát sinh khác nhau. Trong đó, 2 chủng virus CDV-VNUA-768 và CDV-HUA-05P nằm trong cùng một nhánh phát sinh thuộc genotype Asia 1. Chủng CDV-VNUA-768 nằm trong cùng một nhánh phát sinh với các chủng virus Hamamatsu, S124C, Ac96l và P94S được phân lập tại Nhật Bản năm 1999 và năm 2006; và chủng CDV SY được phân lập tại Trung Quốc năm 2014. Chủng CDV-VNUA-768 và CDV-HUA-05P nằm trong cùng nhánh phát sinh với 2 chủng virus Yanaka và Jujo được phân lập tại Nhật Bản năm 1999.

Chủng virus CDV-HUA-04H nằm trong cùng một nhánh phát sinh thuộc genotype Classic, cùng nhánh phát sinh với chủng ferret 1017 phân lập được tại Nhật Bản (2010), Rockborn và Snyder Hill phân lập được lần lượt tại Nga (1999) và Mỹ (2004).

Hai chủng virus CDV-HUA-02H và CDV-HUA-03R nằm trong cùng một nhánh phát sinh thuộc genotype Asia 2. Chủng CDV-HUA-02H

nằm trong cùng nhánh phát sinh với chủng 009L và 007Lm/B được phân lập tại Nhật Bản năm 2007 và 2014. Chủng CDV-HUA-02H và CDV-HUA-03R nằm trong cùng nhánh phát sinh với các chủng virus 007Lm, 011C phân lập tại Nhật Bản trong năm 2005 và 2007.

Kết quả phân tích nguồn gốc phát sinh loài theo sự sai khác nucleotide gene H ở hình 5 cho thấy 5 chủng virus Ca rê nghiên cứu nằm trong 3 nhánh phát sinh khác nhau. 2 chủng virus CDV-VNUA-768 và CDV-HUA-05P nằm trong cùng một nhánh phát sinh thuộc genotype Asia 1.



Hình 3. So sánh trình tự amino acid mã hóa từ đoạn gene P của các chủng virus Ca rê nghiên cứu

Ghi chú: Các vị trí amino acid giống nhau được biểu thị bằng dấu (.); các vị trí có sự sai khác được biểu thị bằng amino acid tương ứng ở chủng virus đó. Các kí hiệu amino acid là: Alanine: A; Aspartic acid hoặc Asparagine: B; Cysteine: C; Aspartic acid: D; Glutamic acid: E; Phenylalanine: F; Glycine: G; Histidine: H; Isoleucine: I; Lysine: K; Leucine: L; Methionine: M; Asparagine: N; Proline: P; Glutamine: Q; Arginine: R; Serine: S; Threonine: T; Valine: V; Tryptophan: W; Tyrosine: Y; Glutamic acid hoặc glutamine: Z.

Bảng 4. Sự tương đồng về amino acid mã hóa từ gene H giữa các chủng virus Ca rê nghiên cứu với chủng virus vacxin Onderstepoort (%)

	CDV-VNUA-768	CDV-HUA-02H	CDV-HUA-03R	CDV-HUA-04H	CDV-HUA-05P	Onderstepoort
CDV-VNUA-768	100,0					
CDV-HUA-02H	93,27	100,0				
CDV-HUA-03R	93,05	99,50	100,0			
CDV-HUA-04H	90,10	89,63	89,38	100,0		
CDV-HUA-05P	99,00	92,90	92,67	89,71	100,0	
Onderstepoort	90,10	89,64	89,39	99,17	89,71	100,0

Bảng 5. Sự tương đồng về amino acid mã hóa từ gene P giữa các chủng virus Ca rê nghiên cứu với chủng virus vacxin Onderstepoort(%)

	CDV-VNUA-768	CDV-HUA-02H	CDV-HUA-03R	CDV-HUA-04H	CDV-HUA-05P	Onderstepoort
CDV-VNUA-768	100,0					
CDV-HUA-02H	93,24	100,0				
CDV-HUA-03R	93,24	100,0	100,0			
CDV-HUA-04H	93,90	92,47	92,47	100,0		
CDV-HUA-05P	99,26	94,02	94,02	94,69	100,0	
Onderstepoort	93,90	92,47	92,47	100,0	94,69	100,0

Chủng virus CDV-VNUA-768 nằm trong cùng một nhánh phát sinh với 2 chủng virus BJ080514 và CDV SY phân lập tại Trung Quốc lần lượt ở năm 2009 và 2014. Chủng virus CDV-HUA-05P nằm trong cùng một nhánh phát sinh với chủng virus Hamamatsu phân lập tại Nhật Bản năm 2003.

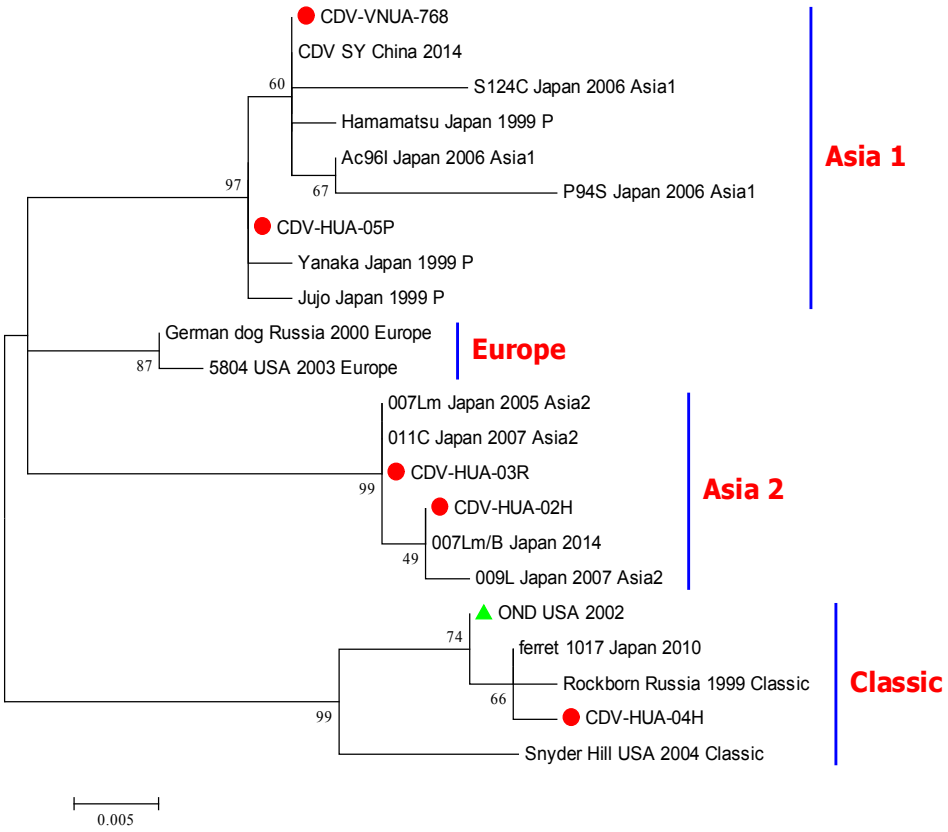
Chủng virus CDV-HUA-04H nằm trong cùng một nhánh phát sinh thuộc genotype America 1/Classic, nằm trong cùng nhánh phát sinh với chủng virus Wyeth-Lederke phân lập được tại Mỹ (1998) và chủng virus vacxin Onderstepoort phân lập được tại Mỹ (2002). 3 chủng virus này nằm cùng trong nhánh phát sinh với các chủng Convac, Snyder Hill và 98-2654 phân lập được lần lượt tại Đan Mạch (1994), Đức (2000) và Mỹ (2004).

Hai chủng virus CDV-HUA-02H và CDV-HUA-03R nằm trong cùng một nhánh phát sinh thuộc genotype Asia 2. Chủng virus CDV-HUA-02H và CDV-HUA-03R nằm trong cùng nhánh phát sinh với các chủng virus 009L, 5VD phân lập được lần lượt tại Nhật Bản (năm 2007 và 2003). Khác nhánh phát sinh với chủng virus HLJ2 thuộc genotype Asia 3 phân lập tại Trung Quốc năm 2008.

Như vậy, dựa trên kết quả phân tích nguồn gốc phát sinh loài theo sự sai khác nucleotide ở đoạn gene H và gene P của 5 chủng virus Ca rê nghiên cứu, nhận thấy 5 chủng virus nghiên cứu nằm trong 3 nhánh phát sinh khác nhau (thuộc 3 genotype lần lượt là Asia1, Asia2 và Classic), khác với nhánh phát sinh của các chủng tham chiếu trên thế giới thuộc các genotype khác như: Europe, Europe Wildlife, America 2, Africa, Arctic like, Asia 3. Kết quả nghiên cứu này sai khác với nghiên cứu của Lan *et al.* (2005b, 2006a, 2006b, 2009b) khi chỉ ra các chủng virus phân lập tại Nhật Bản và châu Á đang lưu hành 2 genotype chính là Asia 1 và Asia 2. Đồng thời, kết quả nghiên cứu này có sự sai khác với kết quả nghiên cứu của Guo *et al.* (2013) đã chỉ ra chủng virus Ca rê gây bệnh trên gấu trúc và chó hoang là thuộc genotype Asia1. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Lan *et al.* (2009a) đã chỉ ra chủng virus phân lập đầu tiên tại Việt Nam là thuộc genotype Classic cùng với chủng virus CDV-HUA-04H mới được phân lập trong nghiên cứu này. Kết quả nghiên cứu này là phù hợp với kết quả nghiên cứu của đề tài KC.04.23/11-15 của Nguyễn Thị Lan *và* cs. (2015) khi chỉ ra được 3 genotype đang gây bệnh chính ở Việt Nam, đồng thời kết quả của đề tài cũng đã chọn ra được 3 chủng virus tạo giống gốc sản xuất vacxin vô hoạt thuộc genotype Asia1 và Classic. Kết quả của nghiên cứu này có ý nghĩa vô cùng quan trọng trong việc lựa chọn chủng virus để chế tạo vacxin trong nước để phòng bệnh.

4. KẾT LUẬN

Kết quả giải trình tự gene Haemagglutinin và Phosphoprotein của 5 chủng virus Ca rê phân lập được tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam có độ dài lần lượt là 1824 bp và 402 bp. Mức độ tương đồng về nucleotide ở gene H và P giữa 5 chủng virus nghiên cứu đạt tỷ lệ cao lần lượt là 90,05 - 99,61% và 94,81 - 99,75%. Mức độ



Hình 4. Cây sinh học phân tử dựa trên trình tự nucleotide gene P của các chủng virus Ca rê nghiên cứu

tương đồng về nucleotide ở gene H và P giữa 5 chủng virus nghiên cứu so với chủng virus vacxin đạt tỷ lệ lần lượt là 89,99%-99,34% và 94,81 - 99,50%. Mức độ tương đồng về amino acid mã hóa từ gene H và gene P giữa 5 chủng virus nghiên cứu đạt tỷ lệ cao lần lượt là 89,38 - 99,5% và 92,47 - 100,0%. Mức độ tương đồng về amino acid tương ứng ở gene H và gene P giữa 5 chủng virus Ca rê nghiên cứu với chủng virus vacxin đạt tỷ lệ dao động lần lượt là 89,39 - 99,17% và 92,47 - 100,0%. Kết quả xây dựng cây phả hệ đã chỉ ra 5 chủng virus Ca rê phân lập được nằm trong 3 nhánh phát sinh khác nhau thuộc 3 genotype lần lượt là Asia 1, Asia 2 và Classic.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Hồ Đình Chúc (1993). Bệnh Ca rê trên đàn chó ở Việt Nam và kinh nghiệm điều trị. Công trình nghiên cứu, Hội thú y Việt Nam.

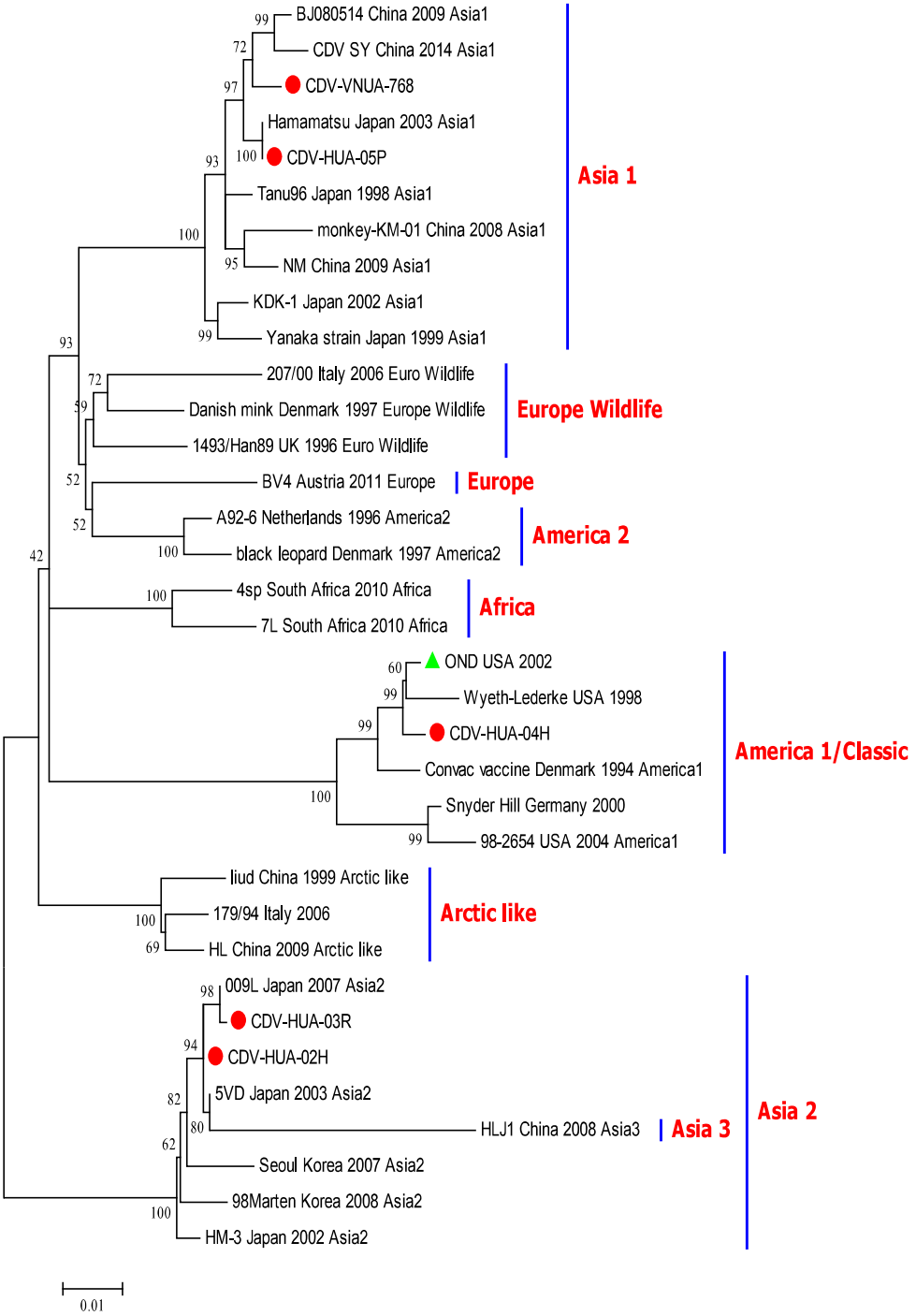
Lê Thị Tài (2006). Một số bệnh mới do virus. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

Nguyễn Thị Lan, Lê Huỳnh Thanh Phương, Nguyễn Hữu Nam, Phạm Hồng Ngân, Chu Đức Thăng, Bùi Trần Anh Đào, Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Thị Yến, Nguyễn Văn Thọ, Nguyễn Văn Thanh (2014 - 2015). Kết quả khoa học công nghệ đề tài nghiên cứu chế tạo vacxin phòng bệnh sài sốt chó (bệnh Ca rê). Mã số: KC.04.23/11-15 thuộc chương trình KHCN cấp nhà nước KC.04/11-15.

Guo L., S.-l. Yang, C.-d. Wang, R. Hou, S.-j. Chen, X.-n. Yang, J. Liu, H.-b. Pan, Z.-x. Hao and M.-l. Zhang (2013). Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from giant panda and raccoon dogs in China. Virology jounal. 10(109): 422X-10.

Harder T. C. and A. D. Osterhaus (1997). Canine distemper virus-a morbillivirus in search of new hosts? Trends in microbiology, 5(3): 120-124.

Hirama K., U. Masashi, R. Miura and K. Chieko (2004). Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (H) gene of canine distemper viruses isolated from



Hình 5. Cây sinh học phân tử dựa trên trình tự nucleotide gene H của các chủng virus Ca rê nghiên cứu

wild masked palm civets (*Paguma larvata*). Journal of veterinary medical science, 66(12): 1575-1578.

Iwatsuki K., N. Miyashita, E. Yoshida, T. Gemma, Y.-S. Shin, T. Mori, N. Hirayama, C. Kai and T. Mikami (1997). Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. Journal of General Virology, 78(2): 373-380.

Lan N., R. Yamaguchi, K. Uchida, S. Sugano and S. Tateyama (2005a). Growth profiles of recent canine distemper isolates on Vero cells expressing

canine signalling lymphocyte activation molecule (SLAM). Journal of comparative pathology. 133(1): 77-81.

Lan, N. T., Yamaguchi, R., Furuya, Y., Inomata, A., Ngamkala, S., Naganobu, K., Kai, K., Mochizuki, M., Kobayashi, Y., Uchida, K and S. Tateyama (2005b). Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain 007Lm, a new isolate in dogs. Veterinary microbiology, 110(3): 197-207.

Lan, N. T., Yamaguchi, R., Inomata, A., Furuya, Y., Uchida, K., Sugano, S. and S. Tateyama (2006a). Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. Veterinary microbiology, 115(1): 32-42.

Lan N., R. Yamaguchi, A. Kawabata, K. Uchida, K. Kai, S. Sugano and S. Tateyama (2006b). Stability of canine distemper virus (CDV) after 20 passages in Vero-DST cells expressing the receptor protein for CDV. Veterinary microbiology, 118(3): 177-188.

Lan N. T., R. Yamaguchi, A. Kawabata, K. Uchida, S. Sugano and S. Tateyama (2007). Comparison of molecular and growth properties for two different canine distemper virus clusters, Asia 1 and 2, in Japan. J Vet Med Sci., 69(7): 739-44.

Lan N. T., R. Yamaguchi, T. T. Kien, T. Hirai, Y. Hidaka and N. H. Nam (2009a). First isolation and characterization of canine distemper virus in Vietnam with the immunohistochemical examination of the dog. Journal of Veterinary Medical Science, 71(2): 155-162.

Lan N. T., R. Yamaguchi, T. Hirai, K. Kai and K. Morishita (2009b). Relationship between growth behavior in vero cells and the molecular characteristics of recent isolated classified in the Asia 1 and 2 groups of canine distemper virus. J Vet Med Sci., 71(4): 457-61.

Martella V., F. Cirone, G. Elia, E. Lorusso, N. Decaro, M. Campolo, C. Desario, M. Lucente, A. Bellacicco and M. Blixenkrone-Møller (2006). Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. Veterinary microbiology, 116(4): 301-309.

Mochizuki M., M. Hashimoto, S. Hagiwara, Y. Yoshida and S. Ishiguro (1999). Genotypes of Canine Distemper Virus Determined by Analysis of the Hemagglutinin Genes of Recent Isolates from Dogs in Japan. Journal of Clinical Microbiology, 37(9): 2936-2942.

Murphy F. A., E. P. J. Gibbs, M. C. Horzinek and M. J. Studdert (1999). Veterinary virology. Academic press.

Sidhu M. S., W. Husar, S. D. Cook, P. C. Dowling and S. A. Udem (1993). Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV genome sequence. Virology, 193(1): 66-72.

Vongpunsawad S., N. Oezgun, W. Braun and R. Cattaneo (2004). Selectively receptor-blind measles viruses: identification of residues necessary for SLAM-or CD46-induced fusion and their localization on a new hemagglutinin structural model. Journal of virology, 78(1): 302-313.

Woma T. Y. and M. Van Vuuren (2009). Isolation of canine distemper viruses from domestic dogs in South Africa using Vero. DogSLAM cells and its application to diagnosis. African Journal of Microbiology Research, 3(3): 111-118.

Sanger, F. and Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. Journal of molecular biology, 94(3): 441-448.