

ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ HỌC PHÂN TỬ THEO KHÔNG GIAN VÀ THỜI GIAN CỦA PORCINE CIRCOVIRUS GENOTYPE 2D (PCV2D) LƯU HÀNH Ở VIỆT NAM

Phạm Hồng Quân^{1*}, Phạm Công Hoạt², Huỳnh Thị Mỹ Lệ³

¹Phòng Thú y Thủy sản, Cục Thú y; ²Bộ Khoa học và Công nghệ

³Khoa Thú y, Học viện NNVN

Email*: quanphamhong.dt@gmail.com

Ngày gửi bài: 04.05.2017

Ngày chấp nhận: 09.06.2017

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm cập nhật kết quả nghiên cứu về đặc điểm dịch tễ học phân tử theo không gian và thời gian của một genotype mới được công nhận, porcine circovirus genotype 2d (PCV2d) lưu hành ở đàn lợn nuôi tại Việt Nam. Kết quả cho thấy tại Việt Nam có sự lưu hành genotype PCV2b bao gồm nhánh 1A/1B, nhóm tái tổ hợp (CRF) và genotype PCV2d. Ở cả 3 miền Bắc - Trung - Nam, đều thấy sự hiện diện đồng thời nhiều nhóm di truyền của PCV2 ở một tỉnh, trong cùng một khoảng thời gian. Các chủng virus PCV2d lưu hành ở Việt Nam từ 2004- 2017 đều có nguồn gốc đầu tiên từ Trung Quốc, nhưng nằm ở các nhánh khác nhau của cây phát sinh chủng loại.

Từ khóa: PCV2 genotype 2d, dịch tễ học phân tử, không gian, thời gian.

A Molecular Based Study on The Spatio-Temporal Dynamics of Porcine Circovirus Genotype 2d (PCV2d) Circulating in Vietnam

ABSTRACT

This study aimed at providing an up-to-date information on the molecular epidemiology of porcine circovirus type 2 (PCV2) circulating in Vietnam with a focus on the spatio-temporal dynamics of a newly defined PCV2d genotype. The results revealed a presence of multiple genotypes/clusters of PCV2, such as 1A/1B, circulating recombinant form (CRF) of PCV2b, and PCV2d. In northern, central and southern Vietnam, a co-circulation of multiple genetic clusters of PCV2 was observed in each sampling location at the same time period. All field strains of PCV2d circulating in Vietnam from 2004 - 2017 were predicted to have the most common recent ancestor originated from China, however, they located at different branches of the PCV2d- phylogenetic tree.

Keywords: PCV2 genotype 2d, molecular epidemiology, spatio-temporal dynamics.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng còi cọc ở lợn con sau cai sữa (Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) do Porcine circovirus type 2 (PCV2) gây ra được coi là một trong những bệnh phổ biến nhất và gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng nhất cho ngành chăn nuôi lợn trên toàn thế giới (Chae, 2012). Hàng năm thiệt hại kinh tế đối với ngành chăn nuôi lợn ở Anh khoảng 35 triệu bảng Anh và đối với các nước thuộc liên minh châu Âu vào khoảng 562 - 900 triệu euro

(Armstrong and Bishop, 2004). Hội chứng còi cọc ở lợn con sau cai sữa xuất hiện lần đầu tiên ở Việt Nam vào năm 2000 và gây ra những ảnh hưởng đáng kể cho ngành chăn nuôi lợn.

Về phân loại virus, căn cứ vào kết quả giải trình tự gen và phân tích đặc điểm tiến hóa, trước năm 2014 PCV2 được chính thức công nhận gồm có 3 genotype, ký hiệu từ PCV2a, PCV2b và PCV2c (Segales *et al.*, 2008) trong đó PCV2a chiếm ưu thế trước khi các vụ dịch chính xảy ra trên thế giới. Sau đó PCV2b là genotype chiếm ưu thế. Nghiên cứu của Guo *et al.*

Đặc điểm dịch tễ học phân tử theo không gian và thời gian của porcine circovirus genotype 2d (PCV2d) lưu hành ở Việt Nam

(2010a) về sự lưu hành của PCV2 ở Trung Quốc đã phát hiện một nhánh mới (được đặt tên là PCV2d) và được cung cấp bằng chứng khẳng định PCV2d thực sự là một genotype mới (Xiao *et al.*, 2015). Genotype PCV2d hiện được xác định lưu hành rộng rãi ở châu Âu, châu Mỹ và châu Á (Xiao *et al.*, 2015, Ramos *et al.*, 2015). Như vậy, cho tới năm 2015 PCV2 có 4 genotype (PCV2a, PCV2b, PCV2c và PCV2d) và 8 nhánh di truyền (cluster) 2A-2E và 1A-1C (Olvera *et al.*, 2007) được công nhận. Tại Việt Nam, kết quả giải trình tự và phân tích trình tự gen của 10 chủng PCV2 phân lập được tại một số tỉnh miền Bắc trong năm 2013 -2014 cho thấy có sự hiện diện của nhánh 1A/1B thuộc genotype PCV2b, nhóm tái tổ hợp (CRF) và genotype PCV2d mới được công nhận trên thế giới (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cs., 2015). Trong khuôn khổ của bài báo này, chúng tôi cung cấp thông tin các kết quả nghiên cứu mới nhất về đặc điểm dịch tễ học phân tử theo không gian và thời gian của PCV2d lưu hành ở Việt Nam, góp phần làm đầy đủ thêm bức tranh dịch tễ về PCV2 đang lưu hành tại Việt Nam và khu vực, đồng thời là cơ sở khoa học rất quan trọng trong công tác lựa chọn chủng virus phù hợp để sản xuất vaccin phòng bệnh cho đàn lợn trong nước.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

- Mẫu bệnh phẩm: có 3 loại mẫu được dùng trong nghiên cứu này là dịch ngoáy mũi, huyết thanh (thuộc về nhóm mẫu hồi cứu năm 2013, 2015) và mẫu phủ tạng (thu từ lợn bệnh mổ khám tại Khoa Thú y trong năm 2016 và đầu năm 2017). Mẫu được thu thập ở cả lợn ốm và lợn khỏe bình thường. Đối với phủ tạng, trước khi tách ADN, mẫu được đông nhất và hòa thành huyền dịch 10% trong đệm PBS 1x. Mẫu được bảo quản ở -20°C cho tới khi kiểm tra.

- Hóa chất dùng tách và tinh sạch ADN tổng số gồm: (i) dung dịch ly giải mẫu có chứa 27% sucrose, 15 mM trisodium citrate, 0,15 M NaCl, 1 mM ethylene diaminetetraacetic acid, 1% sodium dodecyl sulphate, 200 µg/ml proteinase K; (ii) phenol-chloroform-isoamyl

alcohol (25:24:1); (iii) isopropyl; (iv) cồn 70%; (v) dung dịch đệm TE (pH 8).

- Sinh phẩm, hóa chất dùng cho phản ứng PCR: (i) hot start PCR kit (i-StarMaster, iNtRON Biotechnology, Hàn Quốc); (ii) cặp mồi đặc hiệu VF2/VR2 dùng để phát hiện PCV2 (Yang *et al.*, 2003) và mồi đặc hiệu CV1/CV2 & CV3/CV4 dùng để giải trình tự gen PCV2 (Fenaux *et al.*, 2000).

- Trình tự gen ORF2 của các chủng PCV2 phân lập ở Việt Nam (Bảng 1) và của các chủng phân lập trên thế giới được công bố trên ngân hàng gen (Bảng 2).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách và tinh sạch ADN tổng số

ADN tổng số được tách theo các bước sau: (i) ly giải mẫu (250 µl) trong dung dịch sucrose/protein K (500 µl) ở 56°C/90 phút, (ii) tách pha ADN bằng dung dịch phenol-chloroform- isoamyl (200 µl), (iii) rửa ADN bằng isopropyl ở -20°C/15 phút, (iv) rửa sạch rửa ADN bằng cồn 70%, (v) hong khô và hòa tan rửa ADN trong 30 µl đệm TE (pH 8,0). Giữa các bước từ (ii) đến (iv) là quá trình ly tâm ở điều kiện 12.000 vòng/phút/15 phút ở 4°C.

2.2.2. PCR dùng phát hiện và giải trình tự gen ORF2

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kit PCR thương mại (i-StarMaster, iNtRON Biotechnology, Hàn Quốc) có các thành phần: PCR buffer, dNTPs, MgCl₂, Taq DNA polymerase. Thành phần phản ứng PCR (20 µl) được phối trộn theo hướng dẫn của nhà sản xuất, trong đó: 17 µl i-Star master mix solution + 1 µl mồi xuôi + 1 µl mồi ngược + 1 µl ADN mẫu tách chiết. Các bước thực hiện phản ứng và chu trình nhiệt tối ưu của phản ứng PCR được thực hiện theo công bố trước đây (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cs., 2012; 2015).

2.2.3. Giải trình tự và hoàn thiện trình tự gen

Sản phẩm PCR tinh sạch được giải trình tự theo hai chiều (xuôi và ngược) bằng phương pháp Sanger, được thực hiện tại công ty 1st BASE

Bảng 1. Trình tự gen ORF2 của các chủng PCV2 phân lập tại Việt Nam

Năm ^a	Mã số ^b	Tỉnh ^c	Genotype: Cluster ^d	Năm	Mã số	Tỉnh	Genotype: cluster
2004	JX506730	BD		2011	KM042413	HN	
2004	KM042408	VP		2011	KM042414	Han	
2008	JX099786	TN	2d	2012	KC238430	BG	
2008	KM042409	TH		2012	KC238432	BG	
2008	KM042410	HB		2012	KC238433	Han	
2009	JX099780	YB	2b: CRF	2012	KC238437	HD	
2009	JX099781	GL	2b: CRF	2012	KC238438	HD	
2009	JX099782	HY	2b: CRF	2013	KT336602	PT	2b: CRF
2009	JX099783	BL	2b: CRF	2013	KT336603	Han	2b: CRF
2009	KM042411	BN		2013	YYYY16	BD	
2009	KM042412	Han		2013	YYYY2	VL	
2010	JX099784	HN	2b: CRF	2013	YYYY4	VL	
2010	JX099785	HN	2b: CRF	2014	KT336604	NB	2b:1A/1B
2010	KM042403	HY		2014	KT336599	Han	2d
2011	JQ181586	HD	2b: CRF	2014	KT336600	Han	2d
2011	JQ181587	HB	2b: CRF	2014	KT336601	Han	2d
2011	JQ181588	HB	2b: CRF	2014	KT336605	Han	2d
2011	JQ181592	BG	2b: CRF	2014	KT336606	Han	2d
2011	JQ181596	Han	2b: CRF	2014	KT336607	Han	2d
2011	JQ181598	Han	2b: CRF	2014	KT336608	NB	2d
2011	JQ181602	HN	2b: CRF	2014	KT336598	Han	
2011	JQ181603	TN	2b: CRF	2015	YYYY10	QT	
2011	JQ181604	TN	2b: CRF	2015	YYYY11	QT	
2011	JQ181605	TN	2b: CRF	2015	YYYY23	TG	
2011	JQ181607	TN	2b: CRF	2015	YYYY24	HY	
2011	JQ181595	BG	2b: CRF	2015	YYYY25	HY	
2011	JQ181585	HD	2b:1A/1B	2015	YYYY7	QT	
2011	JQ181590	Han	2b:1A/1B	2016	YYYY26	HB	
2011	JQ181591	HB	2b:1A/1B	2016	YYYY27	Han	
2011	JQ181597	Han	2b:1A/1B	2016	YYYY28	HP	
2011	JQ181601	HB	2b:1A/1B	2016	YYYY3	QT	
2011	KM042405	Han		2017	YYYL1712	HY	

Ghi chú: (a) do sự hạn chế về số lượng mẫu hồi cứu, nghiên cứu này không thu thập được mẫu từ năm 2005 đến năm 2008, (b) 14 trình tự gen in đậm được tạo ra trong nghiên cứu này; (c) Bắc Giang (BG), Bạc Liêu (BL), Bắc Ninh (BN), Bình Dương (BD), Gia Lai (GL), Hà Nam (HN), Hà Nội (Han), Hải Dương (HD), Hải Phòng (HP), Hòa Bình (HB), Ninh Bình (NB), Phú Thọ (PT), Quảng Trị (QT), Thái Nguyên (TN), Thanh Hóa (TH), Tiền Giang (TG), Vĩnh Long (VL), Vĩnh Phúc (VP), Yên Bái (YB); (d) nhóm tái tổ hợp (CRF) đã được xác định trong nghiên cứu trước đây (Huynh et al., 2014).

(Singapore). Trình tự nucleotide tiếp tục được phân tích bằng chương trình tin sinh học BioEdit v7.1.3.0 (Hall, 1999) trên cơ sở đối chiếu so sánh (i)

giữa trình tự nucleotide được giải trình tự theo chiều xuôi và chiều ngược và (ii) với trình tự genome tham chiếu công bố trên ngân hàng gen.

Đặc điểm dịch tễ học phân tử theo không gian và thời gian của porcine circovirus genotype 2d (PCV2d) lưu hành ở Việt Nam

2.2.4. Xác định genotype chủng PCV2 phân lập

Sự phân loại theo genotype/ nhóm di truyền (cluster) của các chủng PCV2 phân lập dựa trên cơ sở xây dựng cây phát sinh chủng loại (phylogenetic tree) với các trình tự đã biết trước genotype/ cluster. Bảng 2 trình bày các trình tự tham chiếu của 4 genotype PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d và 8 nhánh di truyền 2A-2E, 1A-

1C (Olvera *et al.*, 2007, Segalés *et al.*, 2008, Xiao *et al.*, 2015). Chương trình MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) được sử dụng để dựng cây phát sinh chủng loại với các tham số: (i) model Kimura-2 parameter mô phỏng sự thay đổi của nucleotide, (ii) các vị trí có sự khuyết thiếu nucleotide xuất hiện ở ít hơn 5% tổng số trình tự sẽ được giữ lại, (iii) xây dựng cây bằng phương pháp Neighbor-Joining với số bootstrap là 1.000 lần.

Bảng 2. Trình tự gen tham chiếu dùng xây dựng cây phát sinh chủng loại

Mã số	Genotype ^a : Cluster ^b	Mã số	Genotype: Cluster	Mã số	Genotype: Cluster
AY184287	PCV1	AY094619	PCV2a: 2E	AY686762	PCV2b: 1A
AB072302	PCV2a: 2A	AY181948	PCV2a: 2E	AY686764	PCV2b: 1A
AF364094	PCV2a: 2B	AY325495	PCV2a: 2E	AY691679	PCV2b: 1A
AY146991	PCV2a: 2B	DQ104421	PCV2a: 2E	AY732494	PCV2b: 1A
AY146993	PCV2a: 2B	AF201311	PCV2b: 1A	AY916791	PCV2b: 1A
AY180396	PCV2a: 2B	AF201897	PCV2b: 1A	DQ104420	PCV2b: 1A
AY180397	PCV2a: 2B	AY177626	PCV2b: 1A	DQ104422	PCV2b: 1A
AF201308	PCV2a: 2C	AY181945	PCV2b: 1A	DQ141322	PCV2b: 1A
AF201309	PCV2a: 2C	AY288134	PCV2b: 1A	AY556475	PCV2b: 1B
AF201310	PCV2a: 2C	AY321982	PCV2b: 1A	AY678532	PCV2b: 1B
AF109399	PCV2a: 2D	AY321983	PCV2b: 1A	AY682995	PCV2b: 1B
AF201305	PCV2a: 2D	AY321984	PCV2b: 1A	AY181947	PCV2b: 1C
AF201306	PCV2a: 2D	AY321985	PCV2b: 1A	AY291317	PCV2b: 1C
AF264043	PCV2a: 2D	AY321986	PCV2b: 1A	AY510375	PCV2b: 1C
AF381176	PCV2a: 2D	AY321987	PCV2b: 1A	AY556473	PCV2b: 1C
AY288135	PCV2a: 2D	AY321988	PCV2b: 1A	AY556476	PCV2b: 1C
AY322004	PCV2a: 2D	AY321989	PCV2b: 1A	AY682991	PCV2b: 1C
AY424401	PCV2a: 2D	AY321994	PCV2b: 1A	AY682994	PCV2b: 1C
AY424402	PCV2a: 2D	AY321996	PCV2b: 1A	AY682996	PCV2b: 1C
AY424403	PCV2a: 2D	AY321998	PCV2b: 1A	AY686763	PCV2b: 1C
AB072301	PCV2a: 2E	AY321999	PCV2b: 1A	AY686765	PCV2b: 1C
AB072303	PCV2a: 2E	AY322001	PCV2b: 1A	AY943819	PCV2b: 1C
AF264038	PCV2a: 2E	AY322003	PCV2b: 1A	EU148503	PCV2c
AF264039	PCV2a: 2E	AY424404	PCV2b: 1A	EU148504	PCV2c
AF264040	PCV2a: 2E	AY484408	PCV2b: 1A	EU148505	PCV2c
AF264041	PCV2a: 2E	AY484412	PCV2b: 1A	AY484410	PCV2d
AF264042	PCV2a: 2E	AY536756	PCV2b: 1A	AY713470	PCV2d
AF381175	PCV2a: 2E	AY596823	PCV2b: 1A	GU808525	PCV2d
AF381177	PCV2a: 2E	AY604430	PCV2b: 1A	HM038017	PCV2d
AF454546	PCV2a: 2E	AY613854	PCV2b: 1A	HM038030	PCV2d
AF465211	PCV2a: 2E	AY651850	PCV2b: 1A	HM038031	PCV2d
AF520783	PCV2a: 2E	AY682993	PCV2b: 1A	JX512856	PCV2d
AF544024	PCV2a: 2E	AY682997	PCV2b: 1A	KJ187306	PCV2d

Ghi chú: (a) PCV2 được phân chia thành genotype PCV2a, PCV2b, PCV2c (Segalés *et al.*, 2008) và PCV2d (Xiao *et al.*, 2015); (b) trong genotype PCV2a và PCV2b, virus được chia thành 8 nhánh di truyền (cluster) từ 2A-2E và 1A-1C (Olvera *et al.*, 2007).

2.2.5. Đo lường tính đa dạng về trình tự gen

Phương pháp Principal Coordinate Analysis (PCoA) để phân tích sự đa dạng về trình tự nucleotide gen ORF2 của 64 chủng PCV2 phân lập ở Việt Nam từ 2004 đến 2017. Tham số đầu vào cho phân tích PCoA là ma trận về khoảng cách di truyền (distance matrix) được tính từ các trình tự gen đã sắp xếp (alignment) theo mô hình Kimura-2 parameter mô phỏng sự thay đổi của nucleotide. Các bước được thực hiện bằng phần mềm PAST phiên bản 3.15 (Hammer *et al.*, 2001).

2.2.6. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học phân tử theo không gian - thời gian

Đặc điểm dịch tễ học phân tử của các chủng PCV2d phân lập được ở Việt Nam được đi sâu tìm hiểu theo không gian (ở hai cấp độ: giữa các quốc gia và giữa các tỉnh của Việt Nam) và theo thời gian (năm phân lập) nhằm trả lời câu hỏi: nguồn gốc phát sinh từ đâu và lưu hành ở Việt Nam sớm nhất từ khi nào. Cơ sở dữ liệu dùng cho phân tích là 391 trình tự gen ORF2 của các

chủng thuộc genotype PCV2d thu được trong nghiên cứu này hoặc truy cập từ ngân hàng gen. Các bước thực hiện được tóm tắt như sau: (i) sàng lọc và giữ lại các trình tự có đầy đủ thông tin về địa điểm phân lập (quốc gia) và năm phân lập (trình bày ở bảng 3); (ii) dùng phần mềm BEAST (Drummond *et al.*, 2012) để xây dựng lại quá trình phát tán (dispersal pathway) của các chủng PCV2d theo không gian và thời gian (spatio-temporal dynamics), với các tham số của mô hình dựa theo kết quả nghiên cứu trước đây (Lemey *et al.*, 2009); (iii) sử dụng chương trình Spread3 (Bielejec *et al.*, 2016) để tính giá trị Bayes factor (BF), giá trị cho biết mức tin cậy của dự đoán con đường phát tán virus giữa các nước. Giá trị BF trong khoảng $BF > 150$, $3 < BF < 150$ và $1 < BF < 3$ lần lượt ứng với mức dự đoán có độ tin cậy cao, có căn cứ và chưa đủ căn cứ về con đường phát tán (Kass and Raftery, 1995).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân loại genotype PCV2 lưu hành ở Việt Nam

Bảng 3. Tóm tắt thông tin trình tự gen ORF2 dùng để phân tích đặc điểm dịch tễ học theo không gian - thời gian

Năm	Châu Âu							Châu Á					Châu Mỹ		
	Bỉ	Cro	Đức	Italy	Rom	Ser	TQ	AĐ	Indo	HQ	ĐL	TL	VN	Mỹ	Bra
2003							1		1						
2004													1		
2005							2								
2006							4				1				
2007							12	1				2			
2008	1				1		15						3		
2009		1			1		22				1	1	5		
2010				1	2	2	18			2	6		3		1
2011				1	6		32	2		1	1		9		
2012							30	5		3			4		
2013			2	2			24	18	4				3	3	1
2014			3				34	1		1			3	4	1
2015							35						6	29	
2016							2			3			1	5	
2017													1		

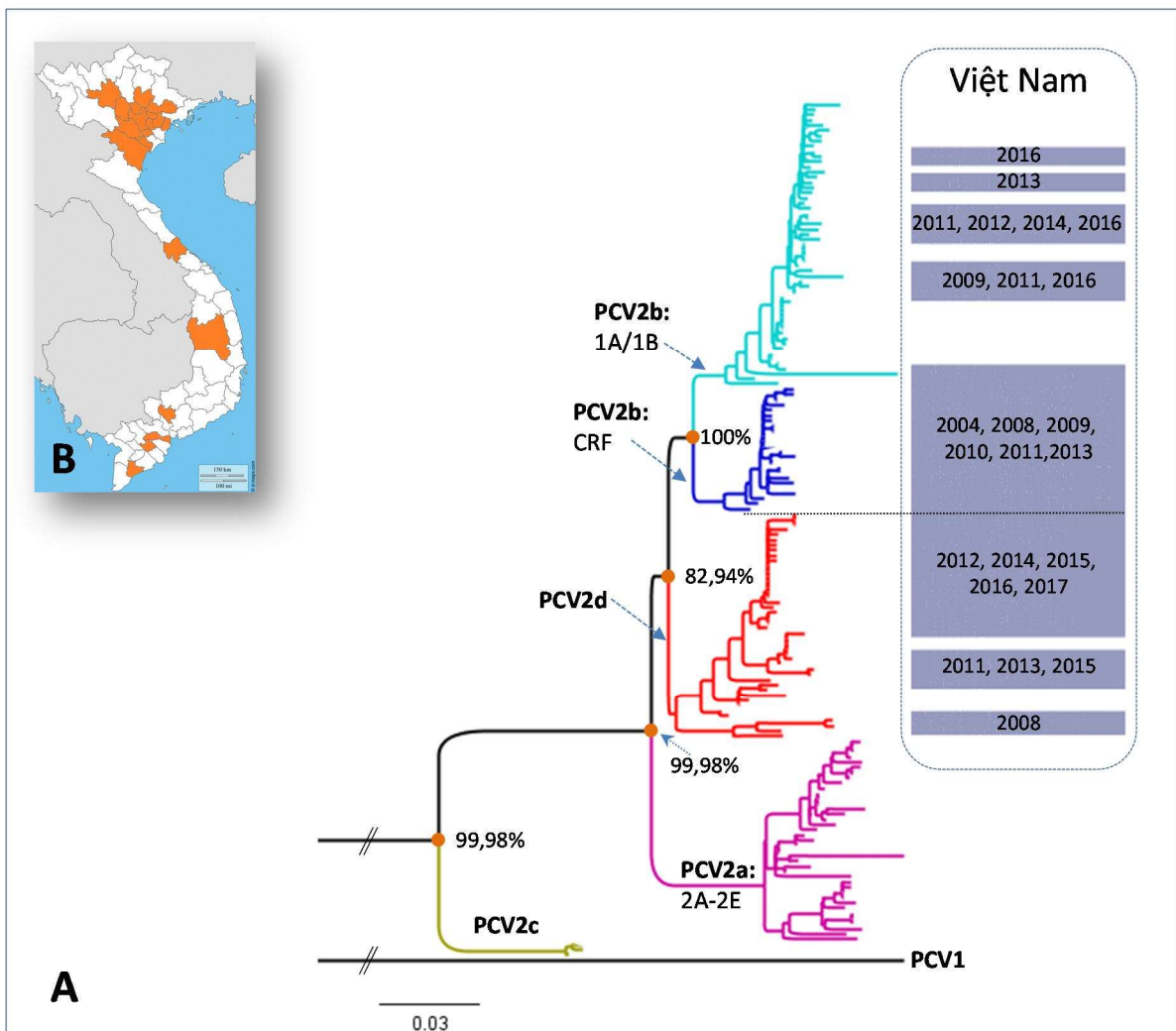
Ghi chú: Croatia (Cro), Romania (Rom), Serbia (Ser), Trung Quốc (TQ), Ấn Độ (AĐ), Indonesia (Indo), Hàn Quốc (HQ), Đài Loan (ĐL), Thái Lan (TL), Việt Nam (VN), Braxin (Bra). Chữ số trong các ô là số lượng trình tự gen ORF2 thu thập được tại mỗi quốc gia/ vùng lãnh thổ, tương ứng ở các năm.

Đặc điểm dịch tễ học phân tử theo không gian và thời gian của porcine circovirus genotype 2d (PCV2d) lưu hành ở Việt Nam

Hình 1 trình bày kết quả phân tích cơ sở dữ liệu gồm 166 trình tự gen ORF2 (102 trình tự tham chiếu, 64 trình tự thu thập ở Việt Nam từ 2004 đến 2017).

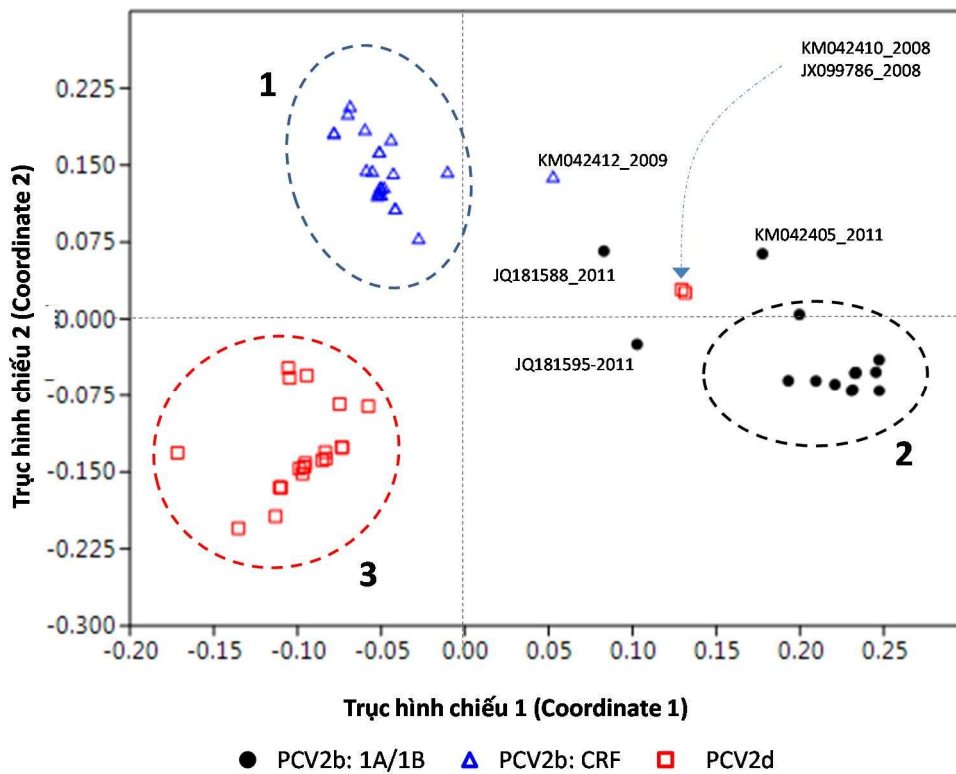
Dựa vào đặc điểm phân nhánh của cây phát sinh chủng loại, có thể nhận thấy PCV2 lưu hành ở Việt Nam từ năm 2004 đến năm 2017 chỉ thuộc genotype PCV2b và PCV2d, không có chủng phân lập nào thuộc genotype PCV2a. Kết quả này phù hợp với kết quả xác định genotype PCV2 ở đàn lợn nuôi tại Việt Nam bằng phương pháp PCR (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cs., 2012) hoặc bằng phương pháp phân tích trình tự gen (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và

cs., 2015). Ở một khía cạnh khác, khi phân tích motif đặc trưng genotype (Cheung *et al.*, 2007), 64 chủng PCV2 phân lập kể trên đều không mang motif 86-T_NKI_SI-91 của PCV2a (không trình bày). Kết quả phân loại trong nghiên cứu này và của một số nghiên cứu khác (Huỳnh *et al.*, 2014, Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cs., 2015) cho thấy có sự thiếu chính xác của cơ sở dữ liệu trình tự gen ORF2 công bố bởi Franzo *et al.*, 2016; theo đó, nhóm tác giả này đã xếp 23 chủng PCV2 của Việt Nam (mã số Genbank từ JQ181586- JQ181607, JX099780- JX099785 và JX506730) thuộc genotype PCV2a.



Hình 1. Cây phát sinh chủng loại của các chủng PCV2 phân lập ở Việt Nam

Ghi chú: (A) Để dễ quan sát, các vị trí có chủng PCV2 phân lập ở Việt Nam được đánh dấu bằng màu xanh, đi kèm năm phân lập. Giá trị bootstrap ở mỗi nút (node) được hiển thị cho cách phân nhánh chính. Trình tự gen ORF2 của PCV1 được dùng làm outgroup. (B) Sơ đồ đính kèm đánh dấu 20 tỉnh (màu vàng cam) có mẫu được phân tích.



Hình 2. Hệ tọa độ hai chiều biểu diễn mối quan hệ gen giữa các chủng PCV2 phân lập ở Việt Nam

Ghi chú: Để dễ quan sát, mỗi chủng PCV2 được ký hiệu tương ứng với genotype trên cơ sở phân loại bằng cây phát sinh chủng loại.

Ở hình 1, tính đa dạng di truyền của các chủng PCV2 lưu hành ở Việt Nam không chỉ phản ánh ở sự lưu hành 2 genotype khác nhau (PCV2b, PCV2d) mà còn ở sự hiện diện đồng thời 2 phân nhóm là 1A/1B và tái tổ hợp (CRF) của genotype PCV2b. Đa dạng di truyền của PCV2 còn được thể hiện trực quan bằng phân tích PCoA (Hình 2).

Trên trục tọa độ hình chiếu 1 (coordinate 1), PCV2b:CRF được đánh giá gần gũi về mặt di truyền với PCV2d và khác biệt rõ với PCV2b: 1A/1B. Trên trục tọa độ hình chiếu 2 (coordinate 2), PCV2d được đánh giá gần gũi về mặt di truyền với PCV2b: 1A/1B và khác biệt rõ với PCV2b: CRF. Phân tích PCoA còn cho thấy các chủng PCV2 lưu hành ở Việt Nam từ 2004 đến 2017, tại 20 tỉnh/ thành phố phân chia thành 3 nhóm tách rời nhau (giới hạn bởi đường nét đứt, Hình 2). Tuy nhiên, các điểm tọa độ biểu thị cho mỗi chủng phân lập ở mỗi nhóm (các điểm giới

hạn trong đường nét đứt) phân bố phân tán. Đặc biệt, có 6 chủng phân lập nằm tách rời khỏi phân nhóm 1, 2 và 3 (Hình 2). Kết quả này phản ánh sự đa dạng di truyền ngay trong một genotype/ cluster của PCV2 tại Việt Nam. Như vậy, bằng hai phương pháp phân tích, nghiên cứu này có cùng nhận định với một số nghiên cứu trước đây (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cs., 2015, Huynh *et al.*, 2014) về sự đa dạng di truyền của PCV2 ở Việt Nam.

PCV2 là một virus đa genotype (Olvera *et al.*, 2007), có mặt ở hầu hết các nước chăn nuôi lợn trên thế giới (Opriessnig *et al.*, 2007). Sự phân bố của các genotype ở mỗi nước là không đồng đều và không mang tính quy luật. Ví dụ, ở khu vực châu Á, các nước như Trung Quốc (Liu *et al.*, 2016, Zhai *et al.*, 2014), Nhật Bản (Takahagi *et al.*, 2008), Hàn Quốc (Nguyen *et al.*, 2012, Seo *et al.*, 2014), Ấn Độ (Anoopraj *et al.*, 2015),... đều có sự lưu hành của genotype 2a

Đặc điểm dịch tễ học phân tử theo không gian và thời gian của porcine circovirus genotype 2d (PCV2d) lưu hành ở Việt Nam

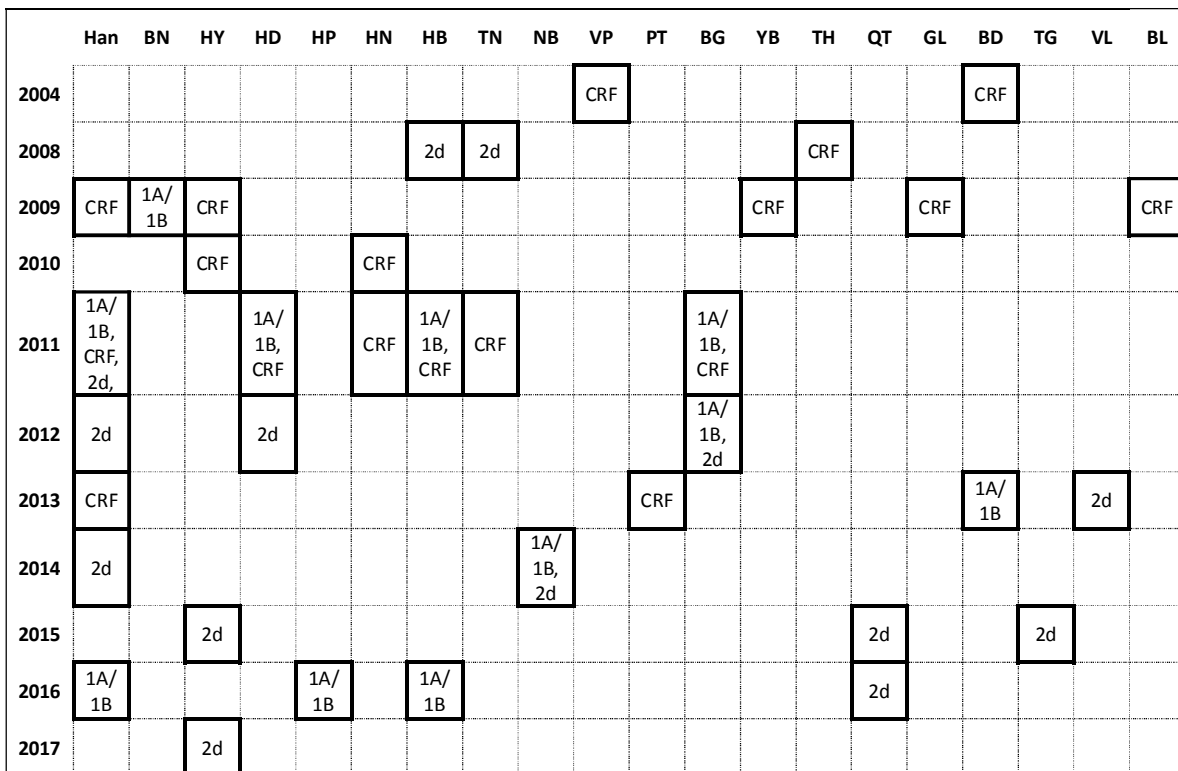
(bên cạnh genotype 2b và 2d). Ngược lại, một số nước như Thái Lan (Jantafong *et al.*, 2011), Malaysia (Jaganathan *et al.*, 2011),... chỉ thấy genotype 2b và 2d. Với các thông tin đặc điểm lưu hành genotype ở Việt Nam được trình bày trong nghiên cứu này và một số nghiên cứu trước đây (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cs., 2015) đã góp phần làm rõ hơn sự phân bố của các genotype PCV2 trong khu vực.

3.2. Đặc điểm dịch tễ học phân tử theo không gian và thời gian

Sự phân bố của các genotype PCV2 ở Việt Nam theo không gian (địa phương phân lập) và thời gian (năm phân lập) được trình bày ở hình 3.

Trong nghiên cứu này, PCV2 đã được xác định lưu hành ở 20 tỉnh thành trong cả nước (Hình 3). Tại một số tỉnh khu vực phía Bắc (Hà Nội, Hưng Yên, Hòa Bình) và phía Nam (Bình

Dương) có sự lưu hành của các nhóm di truyền khác nhau. Ví dụ, từ năm 2009 - 2016 đều phát hiện được PCV2 nhóm 1A/1B, CRF và PCV2d lưu hành ở đàn lợn nuôi tại Hà Nội. Về mặt thời gian, nhóm tái tổ hợp CRF có mặt ở Việt Nam ít nhất từ năm 2004 cho tới 2013, genotype PCV2d xuất hiện ít nhất từ 2008 cho tới nay (năm 2017). Với cơ sở dữ liệu hiện thời, kết quả trình bày ở hình 3 cho ra nhận xét: ở Việt Nam, có sự lưu hành đồng thời nhiều nhóm di truyền của PCV2 ở một địa phương, trong cùng một khoảng thời gian. Đặc điểm kể trên cũng có thể thấy diễn ra ở nhiều nước như Hàn Quốc (Kwon *et al.*, 2017): một số trang trại chỉ có đơn genotype hoặc 2a, 2b, 2d lưu hành; một số trang trại có hỗn hợp 2 hoặc 3 genotype (2a/2b, 2a/2d, 2b/2d và 2a/2b/2d). Ở Colombia, sự phân bố và biến động genotype PCV2 được xác định không có tương quan với thời gian (năm phân lập) (Rincon Monroy *et al.*, 2014).



Hình 3. Phân bố các nhóm di truyền của PCV2 ở Việt Nam theo không gian và thời gian

Ghi chú: Khu vực miền Bắc gồm Hà Nội (Han), Bắc Ninh (BN), Bắc Giang (BG), Hà Nam (HN), Hưng Yên (HY), Hải Dương (HD), Hải Phòng (HP), Hòa Bình (HB), Ninh Bình (NB), Phú Thọ (PT), Thái Nguyên (TN), Vĩnh Phúc (VP), Yên Bái (YB); khu vực miền Trung gồm Thanh Hóa (TH), Quảng Trị (QT), Gia Lai (GL); khu vực miền Nam gồm Bình Dương (BD), Tiền Giang (TG), Vĩnh Long (VL) và Bạc Liêu (BL).

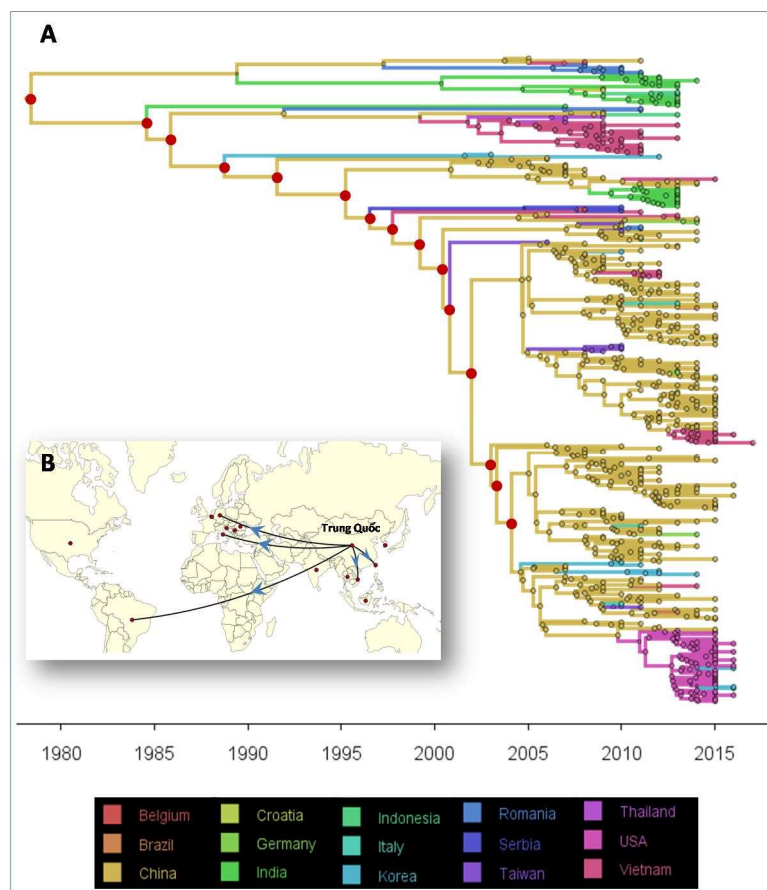
3.3. Đặc điểm dịch tễ học phân tử của genotype PCV2d lưu hành ở Việt Nam

Đến thời điểm hiện tại, có hai sự chuyển dịch genotype của PCV2 (genotypic shift) đã được biết: (i) PCV2a sang PCV2b diễn ra trên phạm vi toàn cầu từ năm 2003 (Cortey *et al.*, 2011, Dupont *et al.*, 2008), (ii) từ 2012 trở lại đây có sự chuyển dịch genotype lưu hành phổ biến sang PCV2d (Xiao *et al.*, 2015). Nghiên cứu này của chúng tôi tập trung phân tích đặc điểm dịch tễ học phân tử của genotype 2d lưu hành ở Việt Nam (Hình 4 và 5).

Ứng dụng phương pháp phân tích đặc điểm dịch tễ học theo không gian và thời gian (Lemey *et al.*, 2009), nghiên cứu này đã dự đoán nhánh chính của cây phát sinh chủng loại (với các nút được đánh màu đỏ, hình 4A)

có nguồn gốc từ Trung Quốc. Trong đó, ở mức tin cậy cao nhất ($BF > 150$) là con đường phát tán từ Trung Quốc tới các nước hoặc vùng lãnh thổ như Braxin, Đức, Italy, Đài Loan và Việt Nam (Hình 4B). Nhận xét này về nguồn gốc của genotype PCV2d ở Trung Quốc cũng phù hợp với một số công bố trước đây (Guo *et al.*, 2010b, Franzo *et al.*, 2015). Đặc điểm dịch tễ học phân tử của genotype PCV2d ở Việt Nam được làm rõ ở hình 5.

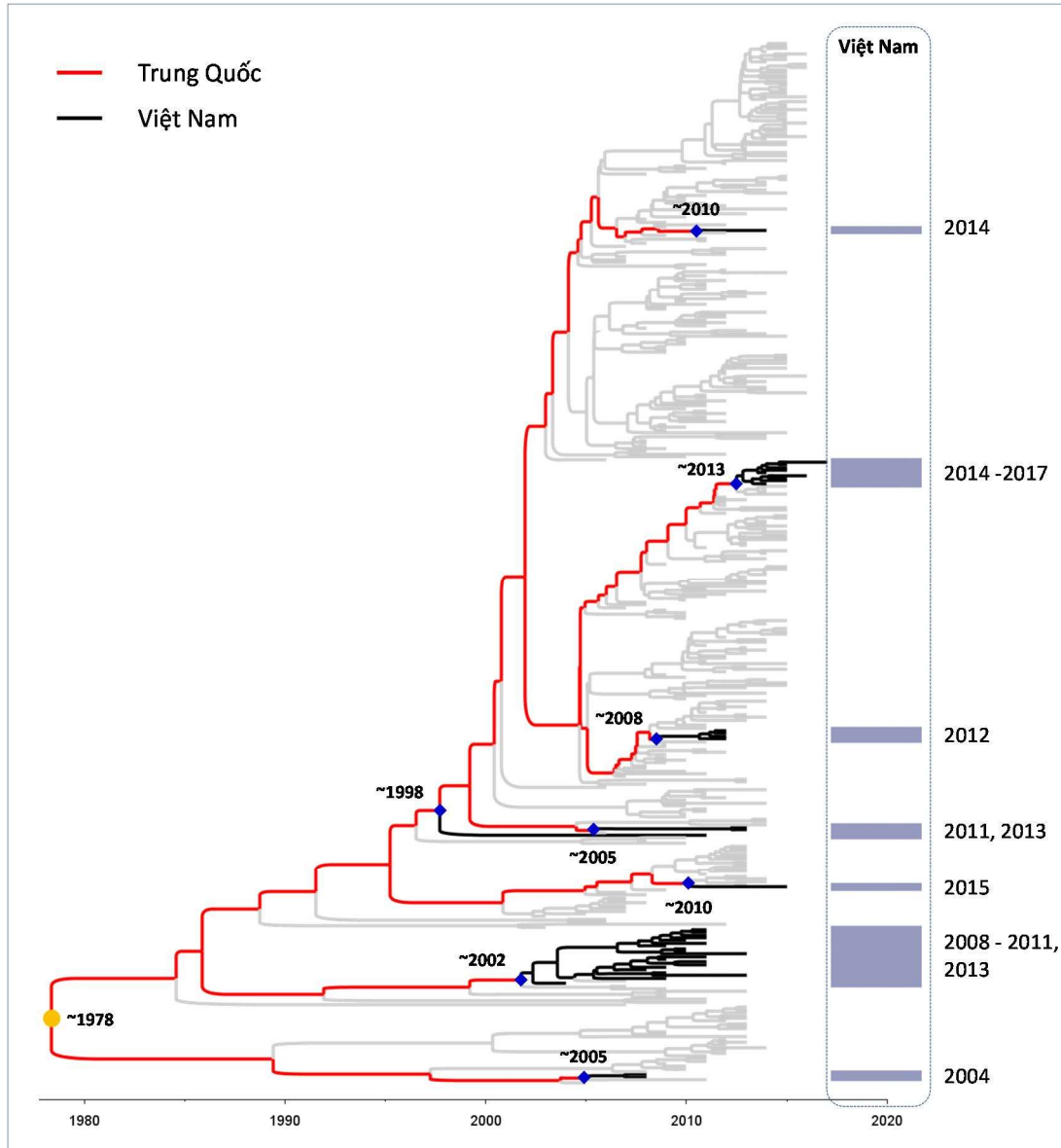
Toàn bộ 54 trình tự PCV2d thu thập ở Việt Nam từ 2004 - 2017 đều được dự đoán có nguồn gốc đầu tiên từ Trung Quốc (mô tả bởi đường chuyển tiếp từ màu đỏ sang màu đen, Hình 5). Tuy vậy, các chủng này nằm ở các nhánh khác nhau của cây phát sinh chủng loại. Thời gian xâm nhập của tổ tiên gần nhất



Hình 4. Kết quả phân tích sự phát tán theo không gian và thời gian của PCV2d

Ghi chú: (A) Cây phát sinh chủng loại với các nhánh được đánh dấu bằng màu tương ứng với quốc gia được dự đoán và chiều dài được căn chỉnh tương ứng với trục thời gian được dự đoán. (B) Những đường phát tán của PCV2d với mức tin cậy cao nhất (Bayes Factor > 150).

Đặc điểm dịch tễ học phân tử theo không gian và thời gian của porcine circovirus genotype 2d (PCV2d) lưu hành ở Việt Nam



Hình 5. Nguồn gốc, sự phát tán theo không gian và thời gian của genotype PCV2d lưu hành ở Việt Nam

Ghi chú: Các nhánh của cây phát sinh chủng loại dự đoán có nguồn gốc từ Trung Quốc được đánh màu đỏ, các nhánh dẫn tới các chủng lưu hành ở Việt Nam đánh màu đen. Hình tứ giác đánh dấu các nút mà tại đó xảy ra quá trình chuyển tiếp giữa các chủng có nguồn gốc từ Trung Quốc sang Việt Nam, đi kèm năm dự đoán xảy ra sự chuyển tiếp. Để dễ quan sát, các nhánh dẫn tới các chủng PCV2 lưu hành ở các nước khác (trừ Việt Nam) đều được làm mờ.

(most recent common ancestor) của các chủng PCV2d phân lập ở Việt Nam được ước lượng xảy ra vào khoảng các năm: 1998, 2002, 2005, 2008, 2010 và 2013. Kết quả phân tích này cho biết có nhiều đợt xâm nhập của genotype PCV2d vào Việt Nam. Đối chiếu với một nghiên cứu tương tự, các chủng PCV2 thuộc nhóm tái tổ hợp (CRF) lưu hành ở Việt Nam cũng được dự đoán

có nguồn gốc từ Trung Quốc (Huynh *et al.*, 2014). Như vậy, nghiên cứu này đã góp phần làm sáng tỏ thêm về nguồn gốc của 1 trong 2 genotype chính lưu hành ở Việt Nam là PCV2d.

Các kết quả trình bày trong nghiên cứu này mang tính chất mở đầu, đề cập đến đặc điểm dịch tễ học phân tử theo không gian và thời gian ở phạm vi quốc tế (giữa các quốc gia hoặc vùng

lãnh thổ). Trong các nghiên cứu tiếp theo, đặc điểm lưu hành của PCV2, đặc biệt là genotype PCV2d sẽ tiếp tục làm rõ ở phạm vi quốc gia (giữa các tỉnh) nhằm trả lời câu hỏi: các chủng virus lây lan như thế nào sau khi xâm nhập vào Việt Nam và các đặc điểm tiến hóa của chúng.

4. KẾT LUẬN

Ở Việt Nam, chỉ có sự lưu hành genotype PCV2b bao gồm nhánh 1A/1B, nhóm tái tổ hợp và genotype PCV2d.

Ở cả 3 miền Bắc - Trung - Nam đều thấy sự hiện diện đồng thời nhiều nhóm di truyền của PCV2 ở một tỉnh, trong cùng một khoảng thời gian.

Các chủng phân lập ở Việt Nam từ 2004 - 2017 thuộc genotype PCV2d đều có nguồn gốc đầu tiên từ Trung Quốc nhưng nằm ở các nhánh khác nhau của cây phát sinh chủng loại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anoopraj, R., T. K. Rajkhowa, S. Cherian, R. S. Arya, N. Tomar, A. Gupta, P. K. Ray, R. Somvanshi and G. Saikumar (2015). Genetic characterisation and phylogenetic analysis of PCV2 isolates from India: indications for emergence of natural inter-genotypic recombinants. *Infect Genet Evol.*, 31: 25-32.
- Armstrong, D. and S. C. Bishop (2004). Does genetics or litters effect influence mortality in PMWS. In: *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress, Hamburg, Germany*, pp. 809.
- Bielejec, F., G. Baele, B. Vrancken, M. A. Suchard, A. Rambaut and P. Lemey (2016). Spread3: Interactive Visualization of Spatiotemporal History and Trait Evolutionary Processes. *Mol Biol Evol.*, 33: 2167-2169.
- Chae, C. (2012). Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in Korea. *Virus Res.*, 164: 107-113.
- Cheung, A. K., K. M. Lager, O. I. Kohutyuk, A. L. Vincent, S. C. Henry, R. B. Baker, R. R. Rowland and A. G. Dunham (2007). Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch Virol.*, 152: 1035-1044.
- Cortey, M., E. Pileri, M. Sibila, J. Pujols, M. Balasch, J. Plana and J. Segales (2011). Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. *Vet J.*, 187: 363-368.
- Drummond, A. J., M. A. Suchard, D. Xie and A. Rambaut (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.*, 29.
- Dupont, K., E. O. Nielsen, P. Baekbo and L. E. Larsen (2008). Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol.*, 128: 56-64.
- Fenaux, M., P. G. Halbur, M. Gill, T. E. Toth and X. J. Meng (2000). Genetic characterization of type 2 Porcine circovirus (PCV-2) from pigs with Postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 2494-2503.
- Franzo, G., M. Cortey, J. Segales, J. Hughes and M. Drigo (2016). Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2: Methodological approach and datasets. *Data Brief*, 8: 549-552.
- Franzo, G., C. M. Tucciarone, G. Dotto, A. Gigli, L. Ceglie and M. Drigo (2015). International trades, local spread and viral evolution: The case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy. *Infect Genet Evol.*, 32.
- Guo, L. J., Y. H. Lu, Y. W. Wei, L. P. Huang and C. M. Liu (2010a). Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virol J.*, 7: 273.
- Guo, L. J., Y. H. Lu, Y. W. Wei, L. P. Huang and C. M. Liu (2010b). Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virol J.*, 7.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Hammer, Ø., D. A. T. Harper and P. D. Ryan (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4: 1-9.
- Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Lê Văn Phan, Nguyễn Văn Giáp, Nguyễn Bá Hiên và Trịnh Đình Thâu (2015). Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học phân tử của Porcine circovirus type 2 (PCV2) lưu hành ở một số tỉnh miền Bắc Việt Nam năm 2013- 2014. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, 22, 19-27.
- Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Nguyễn Văn Giáp, Đặng Hữu Anh, Trần Thị Hương Giang, Mai Thị Ngân, Vũ Thị Ngọc, Lê Văn Trường, Ngô Minh Hà và Bong Kyun Park (2012). Ứng dụng kỹ thuật nested-PCR phát hiện và định type Porcine circovirus type 2

- (PCV2) ở đàn lợn nuôi tại một số tỉnh miền Bắc. Khoa học kỹ thuật Thú y, 19: 18-25.
- Huynh, T. M., B. H. Nguyen, V. G. Nguyen, H. A. Dang, T. N. Mai, T. H. Tran, M. H. Ngo, V. T. Le, T. N. Vu, T. K. Ta, V. H. Vo, H. K. Kim and B. K. Park (2014). Phylogenetic and phylogeographic analyses of porcine circovirus type 2 among pig farms in Vietnam. *Transbound Emerg Dis.*, 61: e25-34.
- Jaganathan, S., O. Toung, P. Yee, T. Yew, C. Yoon and L. Keong (2011). Genetic characterization of Porcine circovirus 2 found in Malaysia. *Virology Journal*, 8: 437.
- Jantafong, T., A. Boonsoongnern, P. Poolperm, K. Urairong, C. Lekcharoensuk and P. Lekcharoensuk (2011). Genetic characterization of porcine circovirus type 2 in piglets from PMWS-affected and -negative farms in Thailand. *Virology Journal*, 8: 88.
- Kass, R. E. and A. E. Raftery, 1995). Bayes Factors. *Journal of the American Statistical Association*, 90, 773-795.
- Kwon, T., D. U. Lee, S. J. Yoo, S. H. Je, J. Y. Shin and Y. S. Lyoo (2017). Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotype shift to PCV2d in Korean pig population. *Virus Res.*, 228: 24-29.
- Lemey, P., A. Rambaut, A. J. Drummond and M. A. Suchard (2009). Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput Biol*, 5, e1000520.
- Liu, X., F. X. Wang, H. W. Zhu, N. Sun and H. Wu (2016). Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from China with high homology to PCV2c. *Arch Virol.*, 161: 1591-1599.
- Nguyen, V. G., H. K. Kim, H. J. Moon, S. J. Park, H. O. Keum, S. Rho, J. Y. Han and B. K. Park (2012). Population dynamics and ORF3 gene evolution of porcine circovirus type 2 circulating in Korea. *Arch Virol.*, 157: 799-810.
- Olvera, A., M. Cortey and J. Segales (2007). Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology*, 357: 175-185.
- Opriessnig, T., X. J. Meng and P. G. Halbur (2007). Porcine Circovirus Type 2 associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest.*, 19: 591-615.
- Ramos, N., S. Mirazo, G. Castro and J. Arbiza (2015). First identification of Porcine Circovirus Type 2b mutant in pigs from Uruguay. *Infect Genet Evol.*, 33, 320-323.
- Rincon Monroy, M. A., G. C. Ramirez-Nieto, V. J. Vera, J. J. Correa and J. D. Mogollon-Galvis (2014). Detection and molecular characterization of porcine circovirus type 2 from piglets with porcine circovirus associated diseases in Colombia. *Virol J.*, 11: 143.
- Segales, J., A. Olvera, L. Grau-Roma, C. Charreyre, H. Nauwynck, L. Larsen, K. Dupont, K. McCullough, J. Ellis, S. Krakowka, A. Mankertz, M. Fredholm, C. Fossum, S. Timmusk, N. Stockhofe-Zurwieden, V. Beattie, D. Armstrong, B. Grassland, P. Baekbo and G. Allan (2008). PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec.*, 162: 867-868.
- Segalés, J., A. Olvera, L. Grau-Roma, C. Charreyre, H. Nauwynck, L. Larsen, K. Dupont, K. McCullough, J. Ellis, S. Krakowka, A. Mankertz, M. Fredholm, C. Fossum, S. Timmusk, N. Stockhofe-Zurwieden, V. Beattie, D. Armstrong, B. Grassland, P. Baekbo and G. Allan (2008). PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Veterinary Record*, 162: 867-868.
- Seo, H. W., C. Park, I. Kang, K. Choi, J. Jeong, S. J. Park and C. Chae (2014). Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. *Arch Virol.*, 159: 3107-3111.
- Takahagi, Y., Y. Nishiyama, S. Toki, T. Yonekita, F. Morimatsu and H. Murakami (2008). Genotypic change of Porcine circovirus type 2 on Japanese pig farms as revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Vet. Med. Sci.*, 70: 603-606.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.*, 30: 2725-2729.
- Xiao, C. T., P. G. Halbur and T. Opriessnig (2015). Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *J Gen Virol.*, 96: 1830-1841.
- Yang, J. S., D. S. Song, S. Y. Kim, K. S. Lyoo and B. K. Park (2003). Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with or without enteric disease by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.*, 15: 369-373.
- Zhai, S. L., S. N. Chen, Z. H. Xu, M. H. Tang, F. G. Wang, X. J. Li, B. B. Sun, S. F. Deng, J. Hu, D. H. Lv, X. H. Wen, J. Yuan, M. L. Luo and W. K. Wei (2014). Porcine circovirus type 2 in China: an update on and insights to its prevalence and control. *Virol J.*, 11: 88.