

PHÂN TÍCH DI TRUYỀN CỦA VIRUS GÂY BỆNH DỊCH TẢ HEO CHÂU PHI DỰA TRÊN GIEN B646L (P72) Ở MỘT SỐ TỈNH MIỀN NAM VIỆT NAM TRONG NĂM 2019 - 2020

Nguyễn Ngọc Hải^{1,2*}, Nguyễn Trung Quân², Nguyễn Thị Phương Bình²,
Trần Hoàng Anh Thu², Phùng Thị Ánh Ngọc², Ngô Phương Uyên² và Lê Thị Thu Hà³

Tóm tắt

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân tích đặc điểm di truyền của virus dịch tả heo châu Phi (ASFV) dựa trên gen B646L (p72) từ 10 chủng ASFV phân lập ở các tỉnh Đồng Nai, Bình Dương, Bà Rịa - Vũng Tàu, Thành phố Hồ Chí Minh trong năm 2019 và 2020. Gen B646L được thu nhận bằng kỹ thuật PCR sau đó được tạo dòng vào vector pGEM - T với tế bào chủ *Escherichia coli DH5a*. Kết quả giải trình tự gen B646L của 10 chủng ASFV trong nghiên cứu cho thấy 10 chủng ASFV phân bố ở khu vực phía nam Việt Nam thuộc genotype II. Có sự khác biệt di truyền giữa các chủng ASFV ở các địa phương ở mức độ thấp (0,5%), cũng như có sự biến đổi trình tự nucleotide của các chủng ASFV theo thời gian, từ năm 2019 đến năm 2020, (0,5% và 0,7%). Các chủng ASFV trong cùng một năm có độ tương đồng di truyền cao hơn so với khác năm.

Từ khóa: Virus dịch tả heo châu Phi, gen B646L (p72), phân tích di truyền.

GENETIC ANALYSIS BASED ON B646L (P72) GENE OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS IN THE SOUTHERN VIETNAM DURING 2019 - 2020

Abstract

The study was conducted to analyze the genetic characteristics of African swine fever virus (ASFV) based on B646L (p72) gene from 10 ASFV strains in Dong Nai, Binh Duong, Ba Ria - Vung Tau provinces and Ho Chi Minh City in 2019 and 2020. B646L gene was amplified by PCR and cloned into pGEM-T vector with *Escherichia coli* DH5a. Results of B646L genetic sequencing of 10 ASFV strains in the study showed that all of 10 ASFV strains distributed in southern Vietnam belong to genotype II. There is genetic variation between ASFV strains locally at low levels (0.5%), as well as variation in the nucleotide sequence of ASFV strains over time, from 2019 to 2020, (0.5% and 0.7%). ASFV strains in the same year had higher genetic similarity compared to other years.

Keywords: ASFV, B646L (p72) gene, genetic analysis.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo thống kê của Tổ chức Thú y thế giới (OIE), tính đến tháng 2/2021 đã có hơn 25 quốc gia, vùng lãnh thổ xuất hiện dịch bệnh này, trong đó có Việt Nam. Ngày 19/2/2019, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Việt Nam đã thông báo phát hiện ổ Dịch tả heo châu Phi đầu tiên tại tỉnh Hưng Yên và Thái Bình. Sau đó, dịch bệnh nhanh chóng lây lan trên 667 quận, huyện của 63 tỉnh, thành phố với tổng số heo tiêu hủy gần 6 triệu con (khoảng trên 340.000 tấn).

Bệnh dịch tả heo châu Phi do African swine fever virus (ASFV) gây ra, virus này thuộc chi Asfvirus, họ Asfarviridae, bộ gen của ASFV là DNA mạch kép, có kích thước khoảng 170 - 193 kbp, có khoảng 150 - 167 khung đọc mở (ORF) (Dixon và cs., 2013). ASFV có 24 kiểu gen (genotype), trong đó protein capsid p72 được mã hóa bởi gen B646L được sử dụng để xác định kiểu gen của virus này (Mwiine và cs., 2019).

¹ Bộ môn Bệnh truyền nhiễm - Thú y Cộng đồng, Khoa Chăn nuôi Thú y, Trường Đại Học Nông Lâm TP. HCM;

² Phòng Chẩn đoán - Xét nghiệm Hàn Việt, Khoa Chăn nuôi Thú y, Trường Đại Học Nông Lâm TP. HCM;

³ Công ty TNHH MSD Animal Health Việt Nam;

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Ngọc Hải; Email: nguyenngochai@hcmuaf.edu.vn; ĐT: 0908840765

Hiện nay, bệnh Dịch tả heo châu Phi vẫn đang xảy ra ở một số khu vực với những thay đổi về lâm sàng so với giai đoạn trước đây, khi dịch bệnh ASF mới xuất hiện. Sự biến đổi di truyền của ASFV theo thời gian cần được nghiên cứu nhằm làm rõ khả năng biến chủng của ASFV, qua đó góp phần định hướng các biện pháp kiểm soát dịch bệnh. Nghiên cứu phân tích di truyền được thực hiện dựa trên gen B646L của một số chủng ASFV ở miền Nam Việt Nam trong năm 2019 và 2020.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thu nhận gen B646L bằng kỹ thuật PCR

Tổng số 10 chủng ASFV được thu thập trên heo bệnh tại 10 trại heo ở các tỉnh Đồng Nai (4 chủng), Bình Dương (2 chủng), Bà Rịa - Vũng Tàu (2 chủng) và Thành phố Hồ Chí Minh (2 chủng) trong năm 2019 và 2020 (Bảng 1).

Bảng 1. Thông tin các mẫu DNA ASFV được thu nhận

STT	Ký hiệu mẫu	Địa điểm	Thời gian thu mẫu	Loại mẫu
1	HVDN1/2019	Đồng Nai	2019	Huyết thanh
2	HVDN2/2019	Đồng Nai	2019	Mô
3	HVDB1/2019	Bình Dương	2019	Máu kháng đông
4	HVBRVT1/2019	Bà Rịa - Vũng Tàu	2019	Huyết thanh
5	HVHCM1/2019	Tp. Hồ Chí Minh	2019	Huyết thanh
6	HVDN3/2020	Đồng Nai	2020	Mô
7	HVDN4/2020	Đồng Nai	2020	Huyết thanh
8	HVBD2/2020	Bình Dương	2020	Mô
9	HVBRVT2/2020	Bà Rịa - Vũng Tàu	2020	Huyết thanh
10	HVHCM2/2020	Tp. Hồ Chí Minh	2020	Huyết thanh

DNA ASFV được thu nhận bằng kit ly trích GenJET Viral DNA and RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Mỹ).

Phản ứng PCR được thực hiện với cặp primer p72-U (5'-GGCACAAGTTCGGACATGT-3'), p72-D (5'-GTACTGTAACGCAGCACAG-3') (Mwiine và cs, 2019) nhằm thu nhận đoạn DNA kích thước là 478 bp trên gen B646L. Phản ứng PCR sử dụng hóa chất GoTaq G2 Green Master Mix (Promega, Mỹ), tổng phản ứng 25 µl (12,5 µl GoTaq G2 Green Master Mix; 1 µl primer p72-U/D nồng độ 10 µM; 5,5 µl nước không có nuclease; 5 µl DNA).

Chu trình nhiệt phản ứng PCR gồm 35 chu kỳ (biến tính 95°C trong 5 phút, bắt cặp 58°C trong 30 giây, kéo dài 72°C trong 1 phút). Sau đó, kiểm tra kết quả PCR bằng điện di trên gel agarose nồng độ 1,5%.

2.2. Tạo dòng gen B646L vào vector pGEM - T

Gen B646L được chèn vào vào vector pGEM - T (Promega, Mỹ). Sau đó, vector tái tổ hợp pGEM - T/ B646L được biến nạp vào tế bào *E. coli DH5α* khả nạp bằng kỹ thuật sốc nhiệt. Chọn lọc dòng *E. coli DH5α* mang vector tái tổ hợp bằng hệ thống xanh trắng và PCR khuẩn lạc với cặp primer T7/SP6 trên vector pGEM - T để khẳng định gen B646L đã được chèn vào vector.

2.3. Giải trình tự và phân tích đa dạng di truyền

Các dòng khuẩn lạc cho kết quả PCR dương tính với gen B646L sẽ được tách plasmid bằng GenJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Mỹ) và gửi đi giải trình tự tại công ty Nam Khoa với cặp primer T7/SP6 để kiểm tra chính xác trình tự đoạn gen được chèn vào.

Bảng 2. Thông tin các chủng ASFV tham khảo trên ngân hàng gen

STT	Tên chủng	Nơi phân lập	Năm	Mã số truy cập ngân hàng gen
1	E75	Spain		FN557520
2	L60	Portugal	1960	KM262844
3	47/Ss/2008	Italy	2008	KX354450
4	26544/OG10	Italy	2010	KM102979
5	Benin 97/1	Benin		AM712239
6	Liv13/33	France	2017	MN913970
7	Georgia 2007/1	USA	2007	FR682468.2
8	Georgia 2008/1	USA	2008	MH910495
9	Russia/2012	Russia	2012	KJ195685
10	Estonia/2014	Estonia	2014	LS478113
11	ASFV/LT14/1490	Lithuania	2014	MK628478
12	ASFV/POL/2015/Podlaskie	Poland	2015	MH681419
13	Belgium/Etalle/wb/2018	Belgium	2018	MK543947
14	SY18	China	2018	MH713612
15	AnhuiXCGQ	China	2018	MK128995
16	DB/LN/2018	China	2018	MK333181
17	CAS19-01/2019	China	2019	MN172368
18	Pig/Heilongjiang/HRB1/2020	China	2020	MW656282
19	VNUA/HY-ASF1	Vietnam	2019	MK554698
20	VNUA/TB-ASF1	Vietnam	2019	MN793051
21	ASFV/NgheAn/2019	Vietnam	2019	MT180393
22	ASFV/Hanoi/2019	Vietnam	2019	MT166692
23	VNUA-ASFV05L1/HaNam/VN/2020	Vietnam	2020	MW465755
24	Warmbaths	SouthAfrica	1987	AY261365
25	Tengani 62	Malawi	1962	AY261364
26	Malawi Lil-20/1 (1983)	Malawi	1983	AY261361
27	R35	Uganda	2015	MH025920
28	N10	Uganda	2015	MH025919
29	Ken06.Bus	Kenya	2006	KM111295
30	Ken05/Tk1	Kenya	2005	KM111294
31	RSA_2_2004	SouthAfrica	2004	MN641877
32	ETH/1	Ethiopia	2011	KT795354

Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm Sequencher 5.4.6 (Giencodes), sau

đó so sánh với các trình tự trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST.

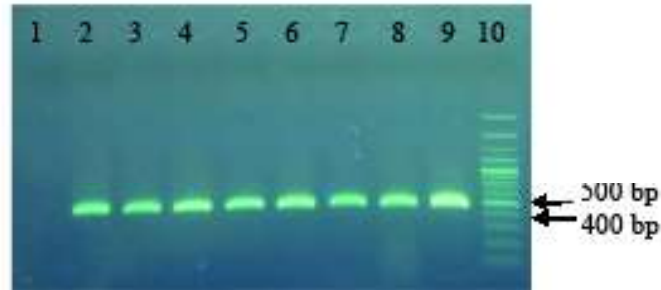
Mức độ tương đồng trình tự nucleotide và amino acid của các chủng ASFV khảo sát với các chủng ASFV tham khảo đã công bố trên ngân hàng gen được phân tích và so sánh bằng phần mềm Bioedit 7.2.6 (Hall, 1999).

Tiến hành xây dựng cây di truyền dựa trên gen B646L để phân tích mối quan hệ di truyền của các chủng ASFV khảo sát bằng phần mềm MEGA 7.0.26 (Tamura và cs., 2013).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thu nhận gen B646L bằng kỹ thuật PCR

Gen B646L của các chủng ASFV được thu nhận bằng phương pháp PCR với cặp primer p72-U/D cho kích thước sản phẩm khuếch đại là 478 bp. Kết quả ở Hình 1 cho thấy sản phẩm PCR có băng sáng, rõ, đúng với kích thước về mặt lý thuyết.



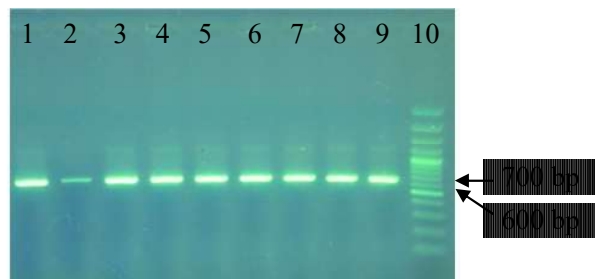
Hình 1. Kết quả PCR thu nhận gen B646L. Giếng (1) đối chứng âm, giếng (2) - (9) mẫu ASFV thực địa, (10) Thang chuẩn DNA 100 bp

3.2. Chọn lọc dòng *E. coli* DH5 α mang vector tái tổ hợp

Những dòng vi khuẩn *E. coli* DH5 α mang vector tái tổ hợp pGEM - T/B646L sẽ phát triển được trên môi trường có chứa kháng sinh ampicillin, nhưng không phân giải X-gal tạo nên những khuẩn lạc có màu trắng. Trong khi đó, những dòng vi khuẩn *E. coli* không chứa vector sẽ không mọc được trên môi trường có chứa kháng sinh ampicillin, hoặc nếu có chứa vector nhưng vector này không có gen chèn thì sẽ tạo những khuẩn lạc màu xanh lơ.

Phản ứng PCR kiểm tra khuẩn lạc có gen B646L được tiến hành với cặp primer

T7/SP6 trên vector pGEM - T. Sản phẩm PCR có kích thước là 177 bp đối với vector chưa được chèn gen, và sản phẩm PCR có kích thước là 655 bp đối với vector đã được chèn gen B646L. Như vậy, dựa vào kích thước sản phẩm PCR có thể xác định được dòng khuẩn lạc nào đã chèn được gen. Kết quả PCR khuẩn lạc (Hình 3) cho thấy nghiên cứu đã tạo thành công các dòng *E. coli* DH5 α mang vector tái tổ hợp có gen B646L. Để xác định chính xác trình tự gen B646L đã được chèn vào vector pGEM - T, các dòng vi khuẩn cho kết quả PCR khuẩn lạc dương tính sẽ được tách plasmid và gửi giải trình tự 2 chiều với cặp primer T7/SP6.



Hình 3. Kết quả PCR khuẩn lạc kiểm tra *E. coli* DH5 α mang vector tái tổ hợp
Giếng 2 - 9: Khuẩn lạc biến nạp pGEM - T/B646L; Giếng 10: Thang DNA 100 bp

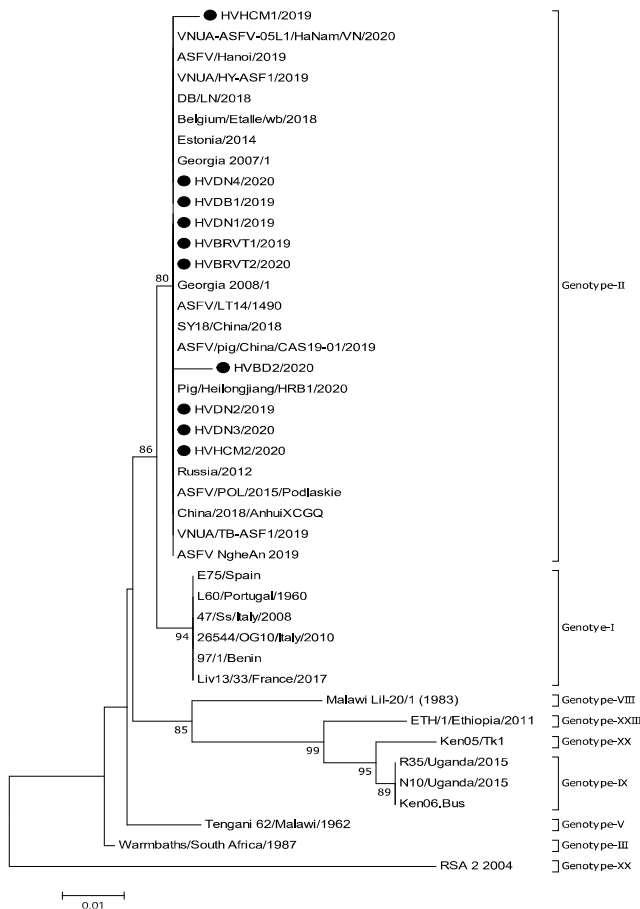
3.3. Kết quả phân tích di truyền của các chủng ASFV khảo sát

Nghiên cứu thực hiện giải trình tự một phần gen B646L (478 bp) của 10 chủng ASFV thực địa gồm 5 chủng năm 2019 và 5 chủng năm 2020 (4 chủng ở Đồng Nai, 2 chủng ở Bình Dương, 2 chủng ở Bà Rịa - Vũng Tàu và 2 chủng ở Thành phố Hồ Chí Minh). Bảng phần trăm tương đồng Nu và Aa được xây dựng bằng phần mềm Bioedit 7.2.6 (Bảng 1). Cây di truyền được xây dựng theo phương pháp Neighbor Joining bằng phần mềm MEGA 7.0.26 (Hình 4).

Các chủng ASFV phân lập tại Việt Nam trong năm 2019 và 2020 đều thuộc genotype II và có độ tương đồng Nu từ 98,9 - 100% và Aa từ 97,4 - 100% giữa các chủng. So với các

chủng ASFV tham khảo trên ngân hàng gen thuộc genotype II, các chủng ASFV trong khảo sát có độ tương đồng Nu từ 99,3 - 100%. Trong đó, năm chủng ASFV khảo sát năm 2019 có độ tương đồng Nu từ 99,5 - 100% và năm chủng ASFV khảo sát năm 2020 có độ tương đồng Nu từ 99,3 - 100%.

Các chủng ASFV khảo sát (10 chủng) so với 5 chủng ASFV ở Việt Nam đã được công bố trước đó, tham khảo trên ngân hàng gen, có độ tương đồng Nu là 99,3 - 100% và Aa là 98,7- 100%, trong đó năm chủng ASFV khảo sát năm 2019 tương đồng Nu từ 99,5 - 100% và Aa từ 98,7 - 100%, và năm chủng ASFV khảo sát năm 2020 có độ tương đồng Nu từ 99,3 - 100% và Aa từ 98,7 - 100% so với các chủng ASFV ở Việt Nam đã được công bố trước đó.



Hình 4. Cây di truyền dựa trên trình tự nucleotide của gen B646L của các chủng ASFV. Cây di truyền được xây dựng theo phương pháp Neighbor-Joining bằng phần mềm MEGA 7.0.26. Các con số ở mỗi nhánh đại diện cho phần trăm giá trị bootstrap với 1.000 lần lặp lại (Giá trị <70 không được trình bày). ● Các chủng ASFV khảo sát

Bốn chủng HVDN1/2019, HVDN2/2019, HVBD1/2019, HVBRVT1/2019 ở Đồng Nai, Bình Dương, Bà Rịa - Vũng Tàu trong 5 chủng ASFV được thu nhận năm 2019 có độ tương đồng Nu và Aa là 100%, riêng chủng HVHCM1/2019 ở TP. Hồ Chí Minh năm 2019 có độ tương đồng Nu và Aa so với bốn chủng ASFV năm 2019 thấp hơn, lần lượt là 99,5% và 98,7%.

Bốn chủng ASFV HVDN3/2020, HVDN4/2020, HVBRVT2/2020, HVHCM2/2020 ở Đồng Nai, Bà Rịa - Vũng Tàu, TP. Hồ Chí Minh trong 5 chủng ASFV thu được năm 2020 có độ tương đồng Nu và Aa là 100%, riêng chủng HVBD2/2020 ở Bình Dương năm 2020 có độ tương đồng Nu và Aa so với bốn chủng ASFV năm 2020 thấp hơn, lần lượt là 99,3% và 98,7%.

Hai chủng HVDN3/2020, HVDN4/2020 phân lập ở Đồng Nai năm 2020 có độ tương đồng Nu và Aa với hai chủng HVDN1/2019, HVDN2/2019 phân lập ở Đồng Nai năm 2019 là 100%. Chủng HVBD2/2020 phân lập ở Bình Dương năm 2020 có độ tương đồng Nu và Aa so với chủng HVBD1/2019 phân lập ở Bình Dương năm 2019 lần lượt là 99,3% và 98,7%. Chủng HVBRVT2/2020 phân lập ở Bà Rịa - Vũng Tàu năm 2020 có độ tương đồng Nu và Aa so với chủng HVBRVT1/2019 phân lập ở Bà Rịa - Vũng Tàu năm 2019 là 100%. Chủng HVHCM2/2020 phân lập ở TP. Hồ Chí Minh năm 2020 có độ tương đồng Nu và Aa so với chủng HVHCM1/2019 phân lập ở TP. Hồ Chí Minh năm 2019 lần lượt là 99,5% và 98,7%.

Hai chủng HVHCM1/2019 và HVBD2/2020 có sự khác biệt so với 8 chủng ASFV khảo sát về Nu lần lượt là 0,5% và 0,7%, về Aa là 1,3%.

4. KẾT LUẬN

Như vậy, dựa trên phân tích di truyền ASFV trong nghiên cứu này các chủng ASFV phân bố ở miền nam Việt Nam trong năm 2019 và 2020 đều thuộc genotype II. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu về đặc điểm di truyền của ASFV ở Việt Nam (Trần

Thị Thanh Hà và cs., 2020; Lê Văn Phan và cs., 2019; Mai Nguyễn Tuấn Anh và cs., 2021). Tuy nhiên, có thể nhận thấy sự khác biệt di truyền giữa các chủng ASFV ở các địa phương, cũng như có sự biến đổi trình tự nucleotide của các chủng ASFV theo thời gian. Các chủng ASFV trong cùng một năm có độ tương đồng di truyền cao hơn so với khác năm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Le, V.P., Jeong, D.G., Yoon, S.W., Kwon, H.M., Trinh, T.B.N., Nguyen, T.L., Bui, T.T.N., Oh, J., Kim, J.B., Cheong K.M., Tuyen N.V., Bae, E., Vu, T.T.H., Yeom, M., Na, W., and D. Song (2019). Outbreak of African Swine Fever, Vietnam, 2019. *Emerg. Infect. Dis.*, 25(7): 1433-1435.
- Tran, H.T.T., Truong, A.D., Ly, D.V., Vu, T.H., Hoang, V.T., Nguyen, T.C., Chu, T.N., Nguyen, T.H., Pham, N.T., Nguyen, T., Yersin, A.G., and H. V. Dang (2020). Genetic characterization of African swine fever virus in outbreaks in Ha Nam province, Red River Delta Region of Vietnam, and activity of antimicrobial products against virus infection in contaminated feed. *J. Vet. Res.* 64: 207-213.
- Mai, Nguyen Tuan Anh; Vu, Xuan Dang; Nguyen, Thi Thu Huyen; Nguyen, Van Tam; Trinh, Thi Bich Ngoc; Kim, Yong Joo; Kim, Hyun-Joo; Cho, Ki-Hyun; Nguyen, Thi Lan; Bui, Thi To Nga; Jeong, Dae Gwin; Yoon, Sun-Woo; Truong, Thang; Ambagala, Aruna; Song, Daesub; Le, Van Phan (2021). Molecular profile of African swine fever virus (ASFV) circulating in Vietnam during 2019-2020 outbreaks. *Archives of Virology.* (3):885-890.
- Dixon, L.K., Abrams, C. C., Bowick, B., Goatley, L.C., Kay-Jackson, P.C., Chapman, D., Liverani, E., Nix, R., Silk, R.S., F. Zhang (2004). African swine fever virus proteins involved in evading host defense systems. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 100: 117-134.



- Dixon, L.K., Chapman, D.A., Netherton, C.L., and C. Upton (2013). African swine fever virus replication and genomics. *Virus Research*. 173(1): 3-14.
- Panasiuk1, N.M., Woźniakowski, G., and K. Niemczuk (2018). The first complete genomic sequences of African swine fever virus isolated in Poland. *Virology Journal* 18(23).
- Mwiine, F.N., Nkamwesiga,J., Ndekezi E. and O. Sylvester (2019). Molecular Characterization of African Swine Fever Viruses from Outbreaks in Peri-Urban Kampala, Uganda. *Adv. Virol*: 1463245.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Tamura, K. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12): 2725-9.