

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA VIRUS GÂY VIÊM DẠ DÀY – RUỘT TRUYỀN NHIỄM (TGE) Ở LỢN TẠI BẮC NINH VÀ THÁI BÌNH NĂM 2015

Lê Văn Phan, Đồng Văn Hiếu, Lại Thị Lan Hương, Nguyễn Thị Lan
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Bệnh viêm dạ dày - ruột truyền nhiễm (TGE) là một bệnh cấp tính, rất dễ lây lan ở lợn và gây ra tổn thất lớn về kinh tế. Trong nghiên cứu này, 5 mẫu bệnh phẩm là phân và ruột của lợn bị tiêu chảy thu thập được tại 2 tỉnh Bắc Ninh và Thái Bình trong năm 2015 đã được sử dụng để chẩn đoán virus gây bệnh TGE. Kết quả chẩn đoán cho thấy 5/5 mẫu bệnh phẩm dương tính với virus TGE. Kết quả phân tích về trình tự nucleotide (nt) và amino acid (aa) trên cơ sở giải mã trình tự gen S cho thấy cả 5 chủng virus TGE có mức độ tương đồng với nhau rất cao, tỷ lệ tương đồng từ 99,5 – 100 % về trình tự nt và 98,9 – 100 % về trình tự aa. Khi so sánh với chủng virus vacxin từ Trung Quốc (attenuated H, mã số truy cập GenBank: EU074218), các chủng virus TGE trong nghiên cứu này có tỷ lệ tương đồng từ 99,1 – 99,3 % về trình tự nt và 97,9 – 98,2 % về trình tự aa.

Từ khóa: RT-PCR, TGE, gen S

Molecular characterization of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) from pigs in Bac Ninh and Thai Binh in 2015

Le Van Phan, Dong Van Hieu, Lai Thi Lan Huong, Nguyen Thi Lan

SUMMARY

Transmissible gastroenteritis (TGE) is a highly contagious, acute disease, causing economic loss in the pig production. Five intestine and fecal samples were collected from the diarrheal pigs in the farms in Thai Binh and Bac Ninh provinces in 2015 was used for identifying TGEV by rapid kit and RT-PCR technique. The studied results showed that 5/5 samples were positive with TGEV. The result of S gene sequence analysis indicated that five Vietnamese TGEV isolates shared a high similarity level of nucleotide sequence (99.5 – 100%) and amino acid sequence (98.9 – 100%). The similarity level of nucleotide and amino acid sequences of these isolates compared to those of the Chinese vaccine TGEV strain (Genbank accession number: EU074218) was 99.1 – 99.3% and 97.9 – 98.2%, respectively.

Keywords: RT-PCR, TGE, S gene.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh viêm dạ dày-ruột truyền nhiễm (TGE) là một trong những bệnh truyền nhiễm nguy hiểm ở lợn do virus thuộc họ Coronavirus gây ra. Bệnh gây ra những tổn thất lớn về kinh tế đối với ngành chăn nuôi lợn thông qua tác động làm cho lợn bị tiêu chảy, bỏ ăn, nôn mửa, cơ thể mất nước và giảm tăng trọng (Moon và cs., 1973; Simkins và cs., 1989; Cubero và cs., 1992; Shoup và cs.,

1996) và tỷ lệ tử vong rất cao, lên tới 100% ở lợn sơ sinh (Saif và Wesley, 1992).

TGEV có cấu trúc hạt virus hình cầu được bao bọc và chứa sợi dương RNA với bộ genome khoảng 28,5 kb. Bộ gen chứa chín khung đọc mở (ORFs) mã hoá tổng hợp bốn loại protein cấu trúc gồm gai (S), vỏ (E), màng (M), nucleoprotein (N) và năm protein không cấu trúc (Meng và Ren, 2010; Wang và cs., 2010). Glycoprotein gai

(Spike - S) giúp TGEV gắn vào các thụ thể tế bào thông qua các liên kết aminopeptidase N, protein S ảnh hưởng rất lớn đến độc lực của các chủng virus TGE và trình tự đầu 5' của gen S là tốt nhất để phân biệt loại virus này từ nhóm *Coronavirus* (Valle và cs., 2005).

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về nguyên nhân gây tiêu chảy ở lợn chủ yếu tập trung vào PEDV, rất ít nghiên cứu về vai trò gây bệnh của virus gây bệnh TGE. Nghiên cứu này nhằm xác định vai trò của TGEV ở lợn tiêu chảy đang lưu hành ở một số trang trại trong địa bàn nghiên cứu. Bước đầu nghiên cứu đặc điểm sinh học phân tử của một số chủng TGEV làm cơ sở cho những nghiên cứu sâu hơn như nghiên cứu chế tạo kit chẩn đoán và phát triển vaccin phòng bệnh.

II. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ

Bảng 1. Thông tin về các mẫu bệnh phẩm được sử dụng trong nghiên cứu

TT	Ký hiệu mẫu	Ngày tuổi của lợn lấy mẫu	Địa phương thu thập	Loại mẫu
1	T1/BacNinh/VN/2015	11	Bắc Ninh	Phân
2	T3/BacNinh/VN/2015	6	Bắc Ninh	Phân
3	T7/ThaiBinh/VN/2015	11	Thái Bình	Ruột
4	T9/ThaiBinh/VN/2015	10	Thái Bình	Ruột
5	T10/ThaiBinh/VN/2015	12	Thái Bình	Ruột

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp phát hiện nhanh virus bằng Rapid Kit

Mẫu sau khi được đồng nhất đã được thử với các bộ Kit chẩn đoán nhanh để chẩn đoán với 3 loại kháng nguyên gồm TGEV, PEDV và Rotavirus, lần lượt là Antigen Rapid TGE Ag test, Antigen Rapid PED Ag test và Rotavirus Kit (Bionote, Hàn Quốc). Phương pháp tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3.2. Phương pháp tách chiết RNA của TGEV

Trizol (Invitrogen) được dùng để tách chiết RNA của virus TGE, các bước được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 250 µl huyền

PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Chẩn đoán virus TGE ở lợn mắc tiêu chảy ở Bắc Ninh và Thái Bình năm 2015 bằng phương pháp RT-PCR.

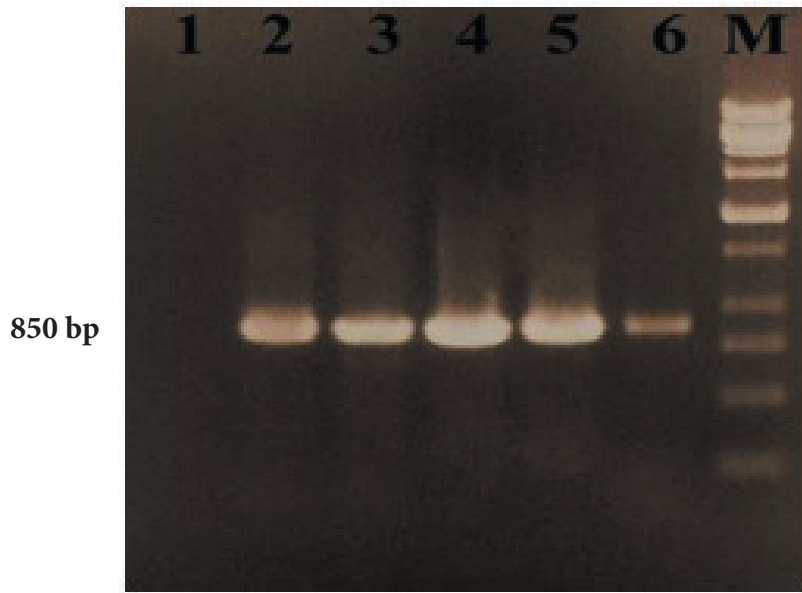
- Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học phân tử của một số chủng virus TGE gây tiêu chảy ở lợn trên địa bàn nghiên cứu.

2.2. Vật liệu

- Mẫu bệnh phẩm: Năm mẫu bệnh phẩm gồm phân và ruột được thu thập từ lợn con từ 6 đến 12 ngày tuổi mắc tiêu chảy nuôi ở 2 trang trại tại Bắc Ninh và Thái Bình năm 2015. Mẫu sau đó được nghiền nhỏ, đồng nhất trong dung dịch 1xPBS và bảo quản ở -80°C tới khi sử dụng (bảng 1).

dịch được dung giải trong 750 µl dung dịch Trizol, trộn đều và bổ sung 200 µl dung dịch Chloroform. Huyền dịch được trộn đều bằng cách vortex mạnh trong 15 giây và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Sau khi ly tâm, 500 µl dịch nổi có chứa RNA được chuyển vào một ống Eppendorf mới. RNA được kết tủa bằng 500 µl dung dịch Isopropanol. Sau khi ly tâm và loại bỏ dịch nổi, RNA được rửa hai lần bằng 1 ml dung dịch Ethanol 70%, và ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. RNA được hong khô và hòa tan trong 30 µl nước vô trùng đã loại *Rnase* và bảo quản ở -20°C tới khi sử dụng.

2.3.3. Phương pháp tổng hợp cDNA



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR chẩn đoán TGEV

(Giếng 1: đối chứng âm; giếng 2: mẫu T1/BacNinh/2015; giếng 3: mẫu T1/BacNinh/2015; giếng 4: mẫu T7/ThaiBinh/2015; giếng 5: T7/ThaiBinh/2015; giếng 6: T7/ThaiBinh/2015; Giếng M: Marker 1kb)

3.2. Kết quả phân tích trình tự gen S và xây dựng cây phả hệ

Kết quả giải trình tự gen và phân tích trình tự gen S của virus TGE cho thấy mức độ tương đồng cao về trình tự nucleotide (nt) khi so sánh 5 chủng virus TGE trong nghiên cứu này với nhau, tỷ lệ tương đồng nằm trong khoảng từ 99,5 – 100%. Khi so sánh với các chủng virus TGE tham chiếu khác, mức độ tương đồng dao động từ 81 – 99,6% (bảng 4). Cụ thể các chủng virus TGE của Việt Nam có tỷ lệ tương đồng cao nhất với chủng virus TGE phân lập được ở Tây Ban Nha, tỷ lệ tương đồng dao động từ 99,5 - 99,6%.

Khi so sánh với chủng virus TGE Virulent purdue (DQ811789), kết quả cho thấy mức độ tương đồng về nucleotide khá cao, trong khoảng 99,3 – 99,5%.

Trình tự nt của các chủng TGE ở Việt Nam có độ tương đồng khá cao với một số chủng TGEV vaccin của Trung Quốc (chủng H165 và H16) (bảng 4). Đặc biệt trong đó, các chủng TGE thực địa tại Việt Nam có độ tương đồng cao nhất

(99,6%) với chủng NEB72-RT (M94099 -Spain 1990) của Tây Ban Nha.

Phân tích các điểm đột biến trên trình tự nt cho thấy, các chủng TGE thực địa tại Việt Nam có những điểm sai khác với nhau và với các chủng tham chiếu trong các nghiên cứu khác. Cụ thể, các đột biến gen ở các vị trí 12 (T-C); 81 (T-G) và 622 (G-T) ở chủng T1 và T3, 760 (G-T) ở chủng T7 và T10, 776 (C-A) ở chủng T9 được quan sát thấy ở các chủng thực địa thu thập đầu năm 2015 so với chủng TGE Virulent Purdue của Mỹ (DQ811789) (Số liệu không thể hiện).

Mức độ tương đồng về trình tự aa mã hóa trên gen S của 5 chủng TGEV thu thập được là 90 – 100% và 81-99,3% đối với các chủng tham chiếu khác. Một số điểm đột biến được ghi nhận ở các vị trí aa 27 (H – Q), 218 (A – S) và 254 (V – N). Ngoài ra, mẫu T9 có sự đột biến ở vị trí aa 259 (N-T) (bảng 5).

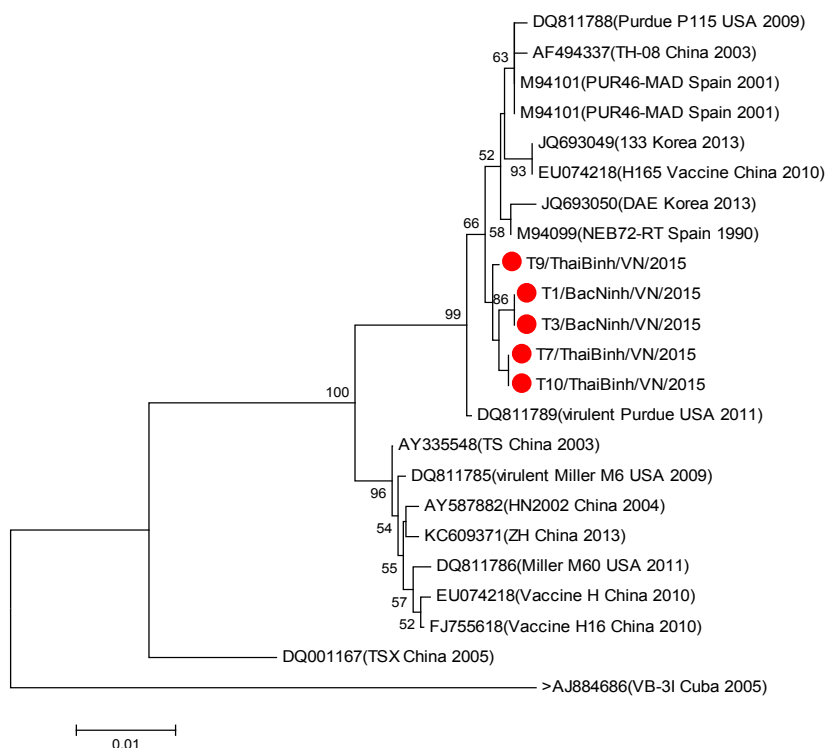
Phân tích cây phát sinh loài hình 4 cho thấy 5 chủng TGEV được xếp trên nhánh riêng cùng nhóm với các chủng TGEV NEB72 phân lập ở

Bảng 4. Tỷ lệ tương đồng (%) về trình tự nucleotide của 5 chủng TGEV thực địa với nhau và với các chủng virus TGE tham chiếu khác

Stt	Mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	T1/BacNinh/VN/2015	100																						
2	T3/BacNinh/VN/2015	100	100																					
3	T7/Thai Binh/VN/2015	99.6	99.6	100																				
4	T9/Thai Binh/VN/2015	99.5	99.5	99.6	100																			
5	T10/Thai Binh/VN/2015	99.6	99.6	100	99.6	100																		
6	JO693050(DAE Korea 2013)	99.4	99.4	99.3	99.4	99.3	100																	
7	JO693049(133 Korea 2013)	99.3	99.3	99.1	99.3	99.1	99.4	100																
8	DQ001167(TSX China 2005)	95.3	95.3	95.4	95.4	95.4	94.9	95.1	100															
9	M94101(PUR46-MAD Spain 2001)	99.4	99.4	99.3	99.4	99.3	99.5	99.6	95.4	100														
10	DQ811788(Purdue P115 USA 2009)	99.3	99.3	99.1	99.3	99.1	99.4	99.5	95.3	99.8	100													
11	M94101(PUR46-MAD Spain 2001)	99.4	99.4	99.3	99.4	99.3	99.5	99.6	95.4	100	99.8	100												
12	DQ811789(virulent Purdue USA 2011)	99.3	99.3	99.4	99.5	99.4	99.1	99.3	95.8	99.6	99.5	99.6	100											
13	M94099(NEB72-RT Spain 1990)	99.6	99.6	99.5	99.6	99.5	99.7	99.6	95.2	99.7	99.6	99.7	99.4	100										
14	AY335548(TS China 2003)	98.1	98.1	98.2	98.1	98.2	97.7	97.9	96.5	98	97.9	98	98.3	98	100									
15	AF494337(TH-08 China 2003)	99.3	99.3	99.1	99.3	99.1	99.4	99.5	95.3	99.8	99.7	99.8	99.5	99.6	97.9	100								
16	AY587882(HN2002 China 2004)	97.9	97.9	98	97.9	98	97.5	97.6	96.2	97.7	97.6	97.7	98.1	97.7	99.7	97.6	100							
17	EU074218(Vaccine H China 2010)	97.7	97.7	97.9	97.7	97.9	97.4	97.5	96.1	97.6	97.5	97.6	98	97.6	99.6	97.5	99.6	100						
18	EU074218(H165 Vaccine China 2010)	99.3	99.3	99.1	99.3	99.1	99.4	100	95.1	99.6	99.5	99.6	99.3	99.6	97.9	99.5	97.6	97.5	100					
19	FJ755618(Vaccine H16 China 2010)	97.9	97.9	98	97.9	98	97.5	97.6	96.2	97.7	97.6	97.7	98.1	97.7	99.5	97.6	99.5	99.8	97.6	100				
20	KC609371(ZH China 2013)	97.7	97.7	97.9	97.7	97.9	97.4	97.5	96.1	97.6	97.5	97.6	98	97.6	99.6	97.5	99.6	99.5	97.5	99.4	100			
21	DQ811786(Miller M60 USA 2011)	97.7	97.7	97.9	97.7	97.9	97.4	97.5	96.1	97.6	97.5	97.6	98	97.6	99.6	97.5	99.6	99.7	97.5	99.6	99.5	100		
22	DQ811785(Miller M6 USA 2009)	98	98	98.1	98	98.1	97.6	97.7	96.3	97.9	97.7	97.9	98.2	97.9	99.8	97.7	99.7	99.6	97.7	99.5	99.6	99.6	100	
23	>AJ884686(VB-31 Cuba 2005)	81.9	81.9	82.1	82	82.1	81.6	81.8	83.8	82	81.9	82	82.4	81.8	83	82	82.7	82.6	81.8	82.7	82.6	82.7	82.8	100

Bảng 5. Tỷ lệ tương đồng (%) về trình tự amino acid của 5 chủng virus TGE thực địa với nhau và với các chủng virus TGE tham chiếu khác

Stt	Mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	T1/BacNinh/VN/2015	100																			
2	T3/BacNinh/VN/2015	100	100																		
3	T7/ThaiBinh/VN/2015	98.9	98.9	100																	
4	T9/ThaiBinh/VN/2015	98.9	98.9	99.3	100																
5	T10/ThaiBinh/VN/2015	98.9	98.9	100	99.3	100															
6	JQ693050 (DAE Korea 2013)	98.9	98.9	98.6	98.6	98.6	100														
7	JQ693049 (133 Korea 2013)	98.2	98.2	97.9	97.9	97.9	98.6	100													
8	DQ001167 (TSX China 2005)	94.7	94.7	95.1	95.4	95.1	94.4	94.0	100												
9	DQ811788 (Purdue P115 USA 2009)	98.2	98.2	97.9	97.9	97.9	98.6	98.6	94.7	100											
10	M94101 (PUR46-MAD Spain 2001)	99.4	99.4	99.3	99.4	99.3	99.5	99.6	95.4	99.8	100										
11	DQ811789 (virulent Purdue USA 2011)	98.6	98.6	98.2	98.2	98.2	98.9	98.9	95.8	95.1	99.6	100									
12	M94099 (NEB72-RT Spain 1990)	99.3	99.3	98.9	98.9	98.9	99.6	98.9	94.7	89.9	99.3	98.6	100								
13	AY335548 (TS China 2003)	97.5	97.5	97.9	97.9	97.9	97.2	97.2	95.4	97.2	97.5	98.2	97.5	100							
14	AF494337 (TH-08 China 2003)	98.6	98.6	98.2	98.2	98.2	98.9	99.9	95.1	99.6	100	99.3	99.3	97.5	100						
15	AY587882 (HN2002 China 2004)	96.8	96.8	97.2	97.2	97.2	96.8	96.5	94.7	96.5	96.8	97.5	96.8	99.3	96.8	100					
16	EU074218 (H165 Vaccine China 2010)	98.2	98.2	97.9	97.9	97.9	98.6	100	94.0	98.6	98.9	98.2	98.9	97.2	98.9	96.5	100				
17	KC609371 (ZH China 2013)	96.5	96.5	96.8	96.8	96.8	96.5	96.1	94.4	96.1	96.5	97.2	96.5	98.9	96.5	98.9	96.1	100			
18	DQ811786 (Miller M60 USA 2011)	96.5	96.5	96.8	96.8	96.8	96.5	96.1	94.4	96.1	96.5	97.2	96.5	98.9	96.5	98.9	96.1	98.6	100		
19	DQ811785 (Miller M6 USA 2009)	97.2	97.2	97.5	97.5	97.5	97.2	96.8	95.1	96.8	97.2	97.9	97.2	99.6	97.2	99.3	96.8	98.9	98.9	100	
20	AJ884685 (VB-31 Cuba 2005)	81.1	81.1	81.1	81.1	81.1	80.8	81.1	83.6	81.5	81.8	82.5	81.8	82.2	81.8	81.5	81.1	81.5	81.1	81.1	100



Hình 2. Cây phả hệ của các mẫu virus TGE thực địa (●) với các chủng virus TGE tham chiếu

Tây Ban Nha năm 1990 (M94099), chủng 133 của Hàn Quốc và chủng H165 vaccine nhược độc của Trung Quốc, chủng virus độc P115 của Mỹ công bố năm 2009, những chủng virus này có quan hệ di truyền gần (Hình 4). Hai nhánh này có liên quan chặt chẽ với chủng tham chiếu TGEV virulent Purdue (DQ811789), một nhánh khác gồm một số chủng TGEV phân lập từ Mỹ và Trung Quốc. Từ đó cho thấy các chủng TGEV ở Việt Nam có quan hệ khá gần gũi với một số chủng TGEV trên thế giới như Mỹ, Tây Ban Nha và Trung Quốc.

Gen S có vai trò quan trọng quyết định độc lực của TGEV (Krempl và cs., 1998; Krempl và cs., 2000) liên kết với các sialoglycoprotein bề mặt tế bào (Schwegmann và cs., 2001). Các chủng TGEV của Việt Nam có độ tương đồng cao nhất 99,6% với chủng NEB72-RT (M94099 -Spain

1990) của Tây Ban Nha, chủng này được công bố là chủng độc tính và có những vị trí kháng nguyên C và B tham gia vào các vị trí gắn thụ thể (RBS) có ái tính với tế bào ruột và không có những điểm đột biến đặc trưng của coronavirus gây bệnh hô hấp ở lợn (PRCVs) được bắt nguồn từ TGEV. Tuy nhiên, chủng thực địa ở Việt Nam có 4 acid amin thay đổi đã được tìm thấy tại các vị trí 27, 218, 254 và 259 so với chủng TGE virulent Purdue của Mỹ (DQ811789). Những thay thế này có thể ảnh hưởng đến khả năng gây bệnh của chủng TGEV (Sanchez và cs., 1999). Các nghiên cứu tiếp theo sẽ tập trung phân tích vai trò của những điểm đột biến trên gen S đối với các chủng TGEV gây bệnh ở thực địa dựa trên những phân tích về đặc điểm dịch tễ và bệnh cảnh của lợn mắc bệnh.



IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này bước đầu xác định nguyên nhân gây tiêu chảy ở lợn con tại trang trại lợn ở Bắc Ninh và Thái Bình là do virus TGE. Kết quả phân tích trình tự gen S cho thấy, 5 chủng virus TGE trong nghiên cứu này có sự tương đồng với nhau rất cao về trình tự nucleotide (99,5 – 100 %) và amino acid (98,9 – 100 %). Các chủng virus TGE này của Việt Nam cũng có tỷ lệ tương đồng từ 99,1 – 99,3 % về trình tự nt và từ 97,9 – 98,2 % về trình tự aa khi so sánh với chủng virus vacxin của Trung Quốc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cubero MJ., Bernard S., Leon L., Berthon P., Contreras A (1992). Pathogenicity and antigen detection of the Nouzilly strain of transmissible gastroenteritis coronavirus, in 1-week-old piglets. *J Comp Pathol*, 106: 61-72.
2. Kim S. Y., Song D. S., Park B. K. (2001) Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J Vet Diagn Invest*, 13: 516–520.
3. Kreml C., Ballesteros ML., Enjuanes L., Herrler G (1998). Isolation of hemagglutination-defective mutants for the analysis of the sialic acid binding activity of transmissible gastroenteritis virus. *Adv Exp Med Biol*, 440: 563-8.
4. Kreml C., Ballesteros M. L., Zimmer G., Enjuanes L., Klenk H. D., Herrler G. (2000) Characterization of the sialic acid binding activity of transmissible gastroenteritis coronavirus by analysis of haemagglutination-deficient mutants. *J Gen Virol*, 81: 489-96.
5. Meng F and Ren X (2010). Characterization and utility of monoclonal antibodies against spike protein of transmissible gastroenteritis virus. *Lett Appl Microbiol*, 52: 201-7.
6. Moon HW., Norman JO., Lambert G (1973). Age dependent resistance to transmissible gastroenteritis of swine (TGE). I. Clinical signs and some mucosal dimensions in small intestine. *Can J Comp Med*, 37: 157-66.
7. Saif LJ and Wesley R (1992). Transmissible gastroenteritis. In: *Diseases of swine* (ed. Leman AD SB, Glock RD, et al.), pp. 362-386. Iowa State University Press, Ames, IA.
8. Schwegmann C., Zimmer G., Yoshino T., Enns M., Herrler G (2001). Comparison of the sialic acid binding activity of transmissible gastroenteritis coronavirus and E. coli K99. *Virus Res*, 75: 69-73.
9. Simkins RA., Saif LJ., Weilnau PA (1989). Epitope mapping and the detection of transmissible gastroenteritis viral proteins in cell culture using biotinylated monoclonal antibodies in a fixed-cell ELISA. *Arch Virol*, 107: 179-90.
10. Valle MB., Landa HD., Beiras AMA., Portal SC., Batista ER., Redondo AV., Varela RU., Lepoureau MTF (2005). Transmissible gastroenteritis in Cuba: experimental reproduction of the disease and molecular characterization of the virus. *Span J Agric Res*, 3: 267-274.
11. Wang C., Chen J., Shi H., Qiu H., Xue F., Liu C., Zhu Y., Liu S., Almazan F., Enjuanes L., Feng L (2010). Molecular characterization of a Chinese vaccine strain of transmissible gastroenteritis virus: mutations that may contribute to attenuation. *Virus Genes*, 40: 403-9.

Ngày nhận 21-9-2017

Ngày phản biện 5-10-2017

Ngày đăng 1-1-2018