

Tính ổn định của kháng nguyên GP5 ở chủng virus PRRS nhược độc BG895

Bùi Anh Thy^{1,2,*}, Trần Xuân Hạnh¹, Trần Linh Thuộc^{2,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Trung tâm Nghiên cứu thú y, Công ty Cổ phần Thuốc thú y TW NAVETCO

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Liên hệ

Bùi Anh Thy, Trung tâm Nghiên cứu thú y, Công ty Cổ phần Thuốc thú y TW NAVETCO

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Email: anhthy.bui@gmail.com

Liên hệ

Trần Linh Thuộc, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Email: tlthuoc@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 24/5/2021
- Ngày chấp nhận: 18/8/2021
- Ngày đăng: 28/8/2021

DOI: 10.32508/stdjns.v5i3.1077



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



TÓM TẮT

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở heo (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm trong ngành chăn nuôi heo, do virus PRRS (PRRSV) là một virus RNA sợi đơn, mạch dương gây ra. Vỏ bọc bên ngoài của PRRSV chứa 6 loại protein cấu trúc, trong đó GP5 là kháng nguyên cấu trúc đóng vai trò quan trọng trong sự xâm nhiễm vào tế bào chủ, mang các domain miễn dịch quan trọng liên quan đến khả năng trung hòa virus, nhưng lại rất dễ xảy ra đột biến. Từ chủng PRRSV cường độc BG8, được phân lập từ heo bị bệnh, bằng cách nuôi cấy tiếp truyền trên tế bào MARC-145, chúng tôi đã tạo được chủng nhược độc BG895 có tiềm năng sử dụng làm vaccine. Trong bài báo này, dựa trên phân tích trình tự ORF5 và GP5, kháng nguyên GP5 được khảo sát tính ổn định và mối quan hệ di truyền của chủng BG895 so với chủng gốc BG8, một số chủng PRRSV được phân lập tại Việt Nam và hai chủng nhược độc đang được sử dụng làm vaccine. Kết quả phân tích cho thấy mặc dù có một số thay đổi về nucleotide trên ORF5 và thay đổi về amino acid trên GP5 xảy ra trong quá trình nuôi tiếp truyền chủng PRRSV từ chủng gốc BG8, chủng BG895 vẫn có 99,5% tương đồng về trình tự nucleotide trên ORF5 và 99% tương đồng về trình tự amino acid trên GP5 so với BG8. Chủng BG895 có 99,8% tương đồng về trình tự nucleotide với các chủng được nuôi tiếp truyền từ đời thứ 50 trở đi và 99,5% tương đồng về trình tự amino acid với các chủng được nuôi tiếp truyền từ đời thứ 25 trở đi. So sánh với 5 chủng PRRSV cường độc khác đã được phân lập tại Việt Nam (DN42 VN2009, HCM.CC3 VN2010, TG34 VN2011, CT.C1 VN2012, HUA/HP30 VN2015), độ tương đồng này đạt 97,3-99,1% về trình tự nucleotide và đạt 96-99% về trình tự amino acid. Tại đầu C của GP5, đã ghi nhận sự đột biến Q196R, xảy ra từ đời 95 đến đời 100, góp phần hình thành motif GP5R¹⁹⁶WGRL²⁰⁰, thường xuất hiện trên kháng nguyên GP5 của các chủng PRRSV nhược độc thuộc kiểu gene Bắc Mỹ. Phân tích cây phả hệ dựa trên trình tự amino acid của GP5 cho thấy các chủng BG81-BG895 ở trong phân dòng 8.7 thường xuất hiện tại châu Á và BG895 có 96-99,5% tương đồng với các chủng đang lưu hành Việt Nam. Các kết quả này xác nhận tính ổn định kháng nguyên GP5 của chủng BG895 và mối quan hệ di truyền chặt chẽ với các chủng PRRSV lưu hành tại Việt Nam. Trên cơ sở này, chủng BG895 sẽ được sử dụng làm kháng nguyên tạo vaccine để đánh giá tính an toàn và khả năng bảo hộ đối với PRRSV gây bệnh tai xanh trên heo nuôi thực nghiệm và nuôi trong thực tế sản xuất.

Từ khóa: hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp, chủng virus PRRS nhược độc, BG895, ORF5, GP5

MỞ ĐẦU

Bệnh tai xanh, hay hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở heo (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm trong ngành chăn nuôi heo, gây rối loạn sinh sản ở heo nái và bệnh đường hô hấp ở heo con. Tác nhân gây bệnh là PRRSV, thuộc giống *Arterivirus*, họ *Arteriviridae*, bộ *Nidovirales*¹, có bộ gene là phân tử RNA sợi đơn, mạch dương, không phân đoạn, dài 15,3–15,5 kb, chứa 10 khung đọc mở gồm ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF5a, ORF6 và ORF7². Trong đó, ORF5 mã hóa glycoprotein vỏ ngoài GP5 mang tính kháng nguyên cao³. Glycoprotein GP5 dài khoảng 200 amino acid, với trọng lượng phân tử là 24-26 kDa, chứa 3 vị trí glycosyl hóa N34, N44 và N51³⁻⁵. GP5 gắn với màng bọc

ngoài của PRRSV qua 3 domain xuyên màng tại các vị trí 62-83, 90-106 và 113-130, rất đa dạng về di truyền, có khả năng bám dính đa dạng trên bề mặt tế bào⁶. Sự siêu biến đổi của GP5 là một trong những nguyên nhân làm gia tăng khả năng lây nhiễm và gây bệnh của PRRSV, khiến cho bệnh PRRS ngày càng phức tạp, làm giảm hiệu quả phòng bệnh của các vaccine hiện đang lưu hành⁵. Đồng thời, GP5 được xem là thành phần cảm ứng của kháng thể trung hòa, vì epitope trung hòa lớn nhất của PRRSV định vị tại trung tâm vùng domain ngoại bào của GP5 (từ amino acid 36 đến 52)^{7,8}. Do đó, GP5 còn được ứng dụng trong việc tạo kháng thể đơn dòng kháng PRRSV⁹. Mặc dù chưa được biết chính xác, nhưng nhiều công trình nghiên cứu cho thấy rằng đầu C của GP5 (từ amino acid 164 đến 200) có vai trò quan trọng trong truyền

Trích dẫn bài báo này: Thy B A, Hạnh T X, Thuộc T L. Tính ổn định của kháng nguyên GP5 ở chủng virus PRRS nhược độc BG895. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 5(3):1539-1554.

tải tín hiệu liên quan đến sự nhân lên của virus^{10,11}. Điều đặc biệt là motif GP5Q¹⁹⁶WGRL/P²⁰⁰ tại đầu C của GP5 được bảo tồn ở tất cả chủng PRRSV thuộc dòng Bắc Mỹ^{11,12}. Nếu xảy ra đột biến amino acid tại vị trí này, sẽ ảnh hưởng đến độc lực của virus^{10,11}.

Dựa vào sự khác biệt về tính di truyền, PRRSV được phân chia làm hai kiểu gene: kiểu gene Châu Âu, European genotype, đại diện là chủng Lelystad (LV), và kiểu gene Bắc Mỹ, Northern American genotype, đại diện là chủng virus ATCC-VR2332⁵. PRRSV rất đa dạng về di truyền, độc lực, trình tự nucleotide và dễ xuất hiện những biến chủng; điều này gây khó khăn cho việc sản xuất vaccine phòng bệnh⁵. Tại Việt Nam, PRRSV lưu hành trên đàn heo bao gồm cả hai kiểu gene Bắc Mỹ và Châu Âu. Từ năm 2012, PRRSV lây truyền trên heo ở các trại rất phức tạp, có thể được phân thành 3 kiểu nhiễm PRRSV: nhiễm 1 kiểu gene PRRSV Bắc Mỹ dòng Trung Quốc (65,22%), nhiễm 1 kiểu gene PRRSV Bắc Mỹ dòng cổ điển (32,60%), nhiễm đồng thời kiểu gene PRRSV Bắc Mỹ và kiểu gene Châu Âu (1,28%). Sự phức tạp của các kiểu gene PRRSV gây khó khăn không chỉ trong chẩn đoán mà cả trong việc áp dụng biện pháp tiêm phòng, lựa chọn vaccine đối với bệnh PRRS¹³. Do đó, việc chẩn đoán và phòng trị bệnh PRRS đến nay vẫn còn nhiều khó khăn nhất định.

Theo Cục thú y, các loại vaccine phòng bệnh PRRS đang được sử dụng phổ biến tại Việt Nam là: vaccine nhược độc Porcilis PRRS (chủng DV) của Intervet (Hà Lan), vaccine nhược độc Amervac PRRS (chủng VP046 BIS) của Hipra (Tây Ban Nha), vaccine nhược độc BSL-PS100 (chủng JKL 100) của Bestar (Singapore), vaccine nhược độc Ingelvac PRRS MLV (chủng ATCC VR2332) của Boehringer (Đức), vaccine vô hoạt (chủng NVDC-JXA1) của Chengdu (Trung Quốc), vaccine nhược độc (chủng JXA1-R) của CAHIC và của Đại Hoa Nông (Trung Quốc), vaccine phòng bệnh tai xanh của HANVET (Việt Nam)... Vaccine nhược độc đã được chứng minh có khả năng phòng bệnh cao hơn vaccine vô hoạt¹⁴.

Nhằm mục đích sản xuất vaccine sử dụng để tiêm phòng PRRS trên đàn heo tại Việt Nam, chúng tôi đã phân lập được chủng PRRSV cường độc BG8 từ heo bị bệnh, nuôi tiếp truyền nhiều đời trên tế bào MARC-145 để tạo ra chủng nhược độc và đã thu được chủng BG895 ở đời nuôi tiếp truyền thứ 95 không còn độc lực gây bệnh trên heo nhưng vẫn có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể kháng PRRSV ổn định¹⁵. Chủng BG895 có bộ gene với kích thước 15.321 bp tương tự như chủng gốc BG8 nhưng mang 38 đột biến thay thế nucleotide làm thay đổi 14 amino acid. Đột biến nhiều nhất và quan trọng nhất xảy ra ở protein GP3 và GP5. Vị trí amino acid

thay đổi trong các protein của PRRSV (từ chủng BG8 đến chủng BG895) có khả năng ảnh hưởng đến đặc điểm sinh học và tính sinh miễn dịch ở các chủng, đặc biệt là những thay đổi tạo thành arginine (R), cysteine (C) như Y₁₀₆C/(GP5), Q₁₉₆R/(GP5), tạo nên điểm cắt của protease giải phóng oligopeptide miễn dịch^{11,12,15-18}. Như vậy, chủng nhược độc BG895 tuy xuất hiện nhiều đột biến nhưng vẫn giữ nguyên tính sinh miễn dịch tạo kháng thể đặc hiệu trên heo đồng thời không còn khả năng gây bệnh, nên là chủng có tiềm năng được dùng để sản xuất vaccine phòng bệnh tai xanh tại Việt Nam.

Do glycoprotein GP5 được mã hóa bởi ORF5 có vai trò quan trọng trong miễn dịch đối với bệnh tai xanh, nếu một chủng PRRSV (thuộc kiểu gene Bắc Mỹ) được chọn làm kháng nguyên để sản xuất vaccine có trình tự ORF5 và GP5 khác biệt quá lớn so với trình tự tương ứng của các chủng lưu hành trong thực tế thì vaccine có thể bị giảm hoặc không còn khả năng bảo hộ. Bên cạnh việc khảo sát tính ổn định của kháng nguyên virus qua quá trình nuôi tiếp truyền, việc phân tích biến đổi di truyền trên ORF5, GP5 và mối quan hệ về trình tự tương ứng của các chủng trên thế giới, đặc biệt ở Việt Nam, là cần thiết nhằm góp phần tạo cơ sở khoa học cho hiệu quả phòng bệnh của chủng PRRSV dùng làm kháng nguyên vaccine. Trong bài báo này, chúng tôi phân tích các biến đổi nucleotide trên ORF5 và amino acid trên GP5 của chủng virus cường độc gốc BG81 qua quá trình tiếp truyền trên tế bào MARC-145 để thu nhận chủng nhược độc BG895 trong mối tương quan với các trình tự tương ứng của 5 chủng PRRSV gây bệnh khác được phân lập tại Việt Nam để xác định khả năng bảo hộ khi được chọn làm kháng nguyên vaccine. Cùng với những kết quả thu được từ công trình nghiên cứu của Bùi Anh Thy và cộng sự năm 2020¹⁵, tính ổn định kháng nguyên GP5 của chủng BG895 qua 95 đời tiếp truyền trên tế bào cũng được kiểm chứng thêm thông qua việc phân tích trình tự amino acid và các đặc trưng amino acid đầu C của GP5, đồng thời xem xét mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự amino acid trên GP5 của chủng nhược độc BG895 so với các chủng PRRSV cường độc thực địa và các chủng nhược độc được sử dụng làm vaccine ở nước ta. Các kết quả này là cơ sở khoa học cần thiết trước khi tiến hành đánh giá tính an toàn và khả năng bảo hộ của chủng BG895 dùng làm kháng nguyên vaccine trên heo nuôi thực nghiệm và nuôi trong thực tế sản xuất.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng virus

Chủng PRRSV BG8 cường độc được phân lập từ heo thực địa tại Việt Nam và nuôi trên tế bào MARC-145,

được kí hiệu là BG81 (chủng tiếp truyền đời 1) trong bài báo. Các chủng thu được từ việc tiếp truyền chủng gốc BG81 trên tế bào MARC-145¹⁵ đến đời thứ 25, 50, 75, 80, 85, 90, 95 và 100 được ký hiệu lần lượt là BG825, BG850, BG875, BG880, BG885, BG890, BG895 và BG8100.

Dữ liệu trình tự của các chủng PRRSV cường độc và PRRSV nhược độc dùng làm vaccine

Năm chủng phân lập tại Việt Nam gồm TG34 (Tiền Giang), DN42 (Đồng Nai), HCM.CC3 (Hồ Chí Minh), CT.C1 (Cần Thơ), HUA/HP30 (Bắc Ninh) là những chủng độc lực cao, và hai chủng nhược độc làm vaccine là: JXA1-R (Trung Quốc) và HANVET1.VN (Việt Nam). Tất cả bảy chủng PRRSV được dùng để phân tích, so sánh trong nghiên cứu này đều thuộc kiểu gene Bắc Mỹ. Dữ liệu trình tự của các chủng virus này được tham khảo từ ngân hàng gene (Bảng 1).

Thu nhận vùng gene ORF5 của virus và giải trình tự

Bộ gene RNA của các chủng PRRSV BG81-BG8100 được thu nhận nhờ bộ kit tách chiết QIAampViral RNA kit của QIAGEN (Đức). Thu nhận DNA bổ sung (cDNA) từ RNA bằng phản ứng phiên mã ngược với mỗi ngẫu nhiên (random hexamer) sử dụng bộ kit của ThermoScientific; thành phần của phản ứng có tổng thể tích 20 μL gồm: 5 μL RNA tổng số mỗi loại (10-20 ng/ μL), 1 μL mỗi hexamer (100 picomol/ μL), 1 μL dNTP (10 mM), 7,5 μL nước không nuclease, 4 μL đệm 5X buffer, 1 μL enzyme MaximaTM Reverse Transcriptase (20 U/ μL) và 0,5 μL RiboLockTM RNase Inhibitor (20 U/ μL) phản ứng được thực hiện ở 50°C trong 60 phút và vô hoạt ở 85°C trong 5 phút. Sản phẩm cDNA được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng để thực hiện phản ứng PCR.

Phản ứng PCR để thu nhận ORF5 được thực hiện với thể tích 50 μL gồm: 25 μL PCR mastermix (Thermo Scientific), 2 μL mỗi loại môi (10 pmol/ μL) (Bảng 2), 3 μL khuôn cDNA, 2 μL DMSO (dimethyl sulfoxide) và 16 μL nước không nuclease. Chu trình nhiệt PCR bao gồm 1 chu kỳ ở 98°C/30 giây, 35 chu kỳ ở [98°C/10 giây, 60°C/30 giây 72°C/30 giây], chu kỳ cuối ở 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1%, nhuộm bằng SYBRTM Safe DNA gel stain và quan sát sản phẩm, chụp ảnh trên máy soi gel Wealtec.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit GeneAll Combo GP, tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các sản phẩm PCR được tạo dòng vào plasmid pCR-XL-2-TOPO để lưu trữ các chuỗi gene ORF5 và giải trình tự 2 chiều tại 1st Base.

Xử lý dữ liệu trình tự và xây dựng cây phả hệ

Trình tự các chuỗi nucleotide được xử lý bằng phần mềm Chromas LITE v2.01; các chuỗi thu được từ nghiên cứu và thu thập từ ngân hàng gene (GenBank) được so sánh đối chiếu, xử lý số liệu và suy diễn trình tự amino acid của hệ gene và từng gene bằng chương trình BioEdit7.2 và GeneDoc2.7. Các chủng được so sánh về thành phần nucleotide và amino acid, xem xét mối quan hệ tương đồng, xác định các loại hình đột biến nucleotide và amino acid.

Cây phả hệ dựa trên trình tự amino acid của GP5 được xây dựng bằng chương trình MEGA6.06, với phương pháp ‘kết nối liền kề’ (NJ, Neighbor-joining) kết hợp phương pháp ‘tương quan cực đại’ (ML, Maximum likelihood), có hệ số tin tưởng (bootstrap) là 1000 lần lặp lại²⁴.

KẾT QUẢ

Thu nhận ORF5 bằng phản ứng PCR

Đoạn gene tương ứng với ORF5 của chủng PRRSV gốc BG81 và các chủng được nuôi tiếp truyền đến đời thứ 25 (BG825), 50 (BG850), 75 (BG875), 80 (BG880), 85 (BG885), 90 (BG890), 95 (BG895) và 100 (BG8100) được nhân bản bằng phản ứng PCR từ cDNA tương ứng (Hình 1). Tất cả các sản phẩm PCR được khuếch đại từ đoạn gene ORF5 của các lần tiếp truyền virus trên tế bào đều có kích thước 800 bp (Hình 1). Qua quá trình nuôi tiếp truyền phải chăng đã không xảy ra đột biến mất đoạn hay thêm đoạn trên vùng gene ORF5? Để biết chính xác, toàn bộ đoạn gene ORF5 của chủng BG81 và các chủng được nuôi tiếp truyền (BG825, BG850, BG875, BG880, BG885, BG890, BG895 và BG8100) đều được giải trình tự.

Đột biến thay đổi nucleotide trên ORF5 và amino acid trên GP5 trong quá trình nuôi tiếp truyền

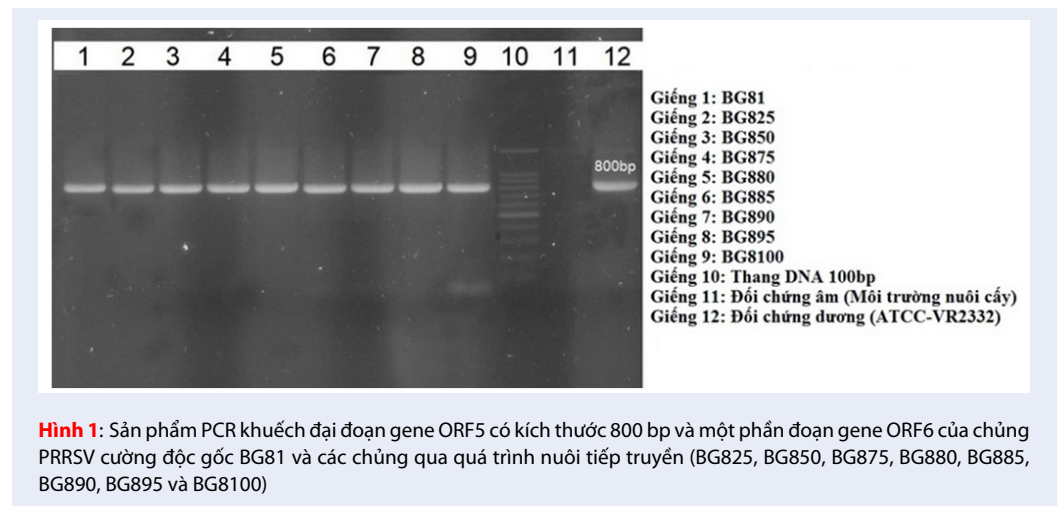
Để nghiên cứu độ ổn định của kháng nguyên glycoprotein GP5 do gene ORF5 mã hoá, trình tự nucleotide và amino acid của chủng virus BG81 và ở các lần tiếp truyền khác nhau (BG825, BG850, BG875, BG880, BG885, BG890, BG895 và BG8100) được phân tích và so sánh với 5 chủng PRRSV được phân lập tại Việt Nam là TG34 (Tiền Giang, 2011), DN42 (Đồng Nai, 2009), HCM.CC3 (Hồ Chí Minh, 2010), CT.C1 (Cần Thơ, 2012), HUA/HP30 (Bắc Ninh, 2015) và 2 chủng nhược độc vaccine là JXA1-R (Trung Quốc) và HANVET1.VN (Việt Nam). Kết quả cho thấy độ dài trình tự nucleotide trên đoạn gene ORF5 của chủng virus gốc và các lần tiếp truyền đều là 603 bp, và chiều dài chuỗi amino acid của glycoprotein GP5 là 200 amino acid (Hình 2 và Hình 3). Các

Bảng 1: Thông tin của các chủng cường độc và các chủng vaccine nhược độc được phân tích trong bài

Tên chủng	Năm phân lập	Địa điểm thu mẫu/ phân lập	Số đăng kí trên ngân hàng gene	Tài liệu tham khảo
TG34	2011	Tiền Giang	Đang đăng kí	Thy et al., 2020 ¹⁵
DN42	2009	Đồng Nai	JQ860367	Thuy et al., 2013 ²²
HCM.CC3	2010	Hồ Chí Minh	JQ860379	
CT.C1	2012	Cần Thơ	JQ860382	
HUA/HP30	2015	Bắc Ninh	KX424890	Le et al., 2016 ¹⁹
JXA1-R	2006	Trung Quốc	FJ548853	Han et al., 2009 ²⁰
HANVET1.VN	2010	Việt Nam	KU842720	Nga et al., 2019 ²¹

Bảng 2: Trình tự mỗi của phản ứng PCR thu nhận ORF5²³

Mỗi	Trình tự nucleotide	Kích thước sản phẩm PCR
ORF5F	5' CAT GAG GTG GGC AAC TGT TT 3'	800 bp
ORF5R	5' GTC ATG TAC CCG AAG GTG AA 3'	



vị trí thay đổi nucleotide trên ORF5 và biến đổi amino acid trên GP5 được trình bày trong Bảng 3 và Bảng 4. Chủng gốc BG81 qua quá trình tiếp truyền nhiều đời trên tế bào MARC-145 đã xảy ra đột biến điểm thay thế nucleotide tại các vị trí 144, 316, 317, 436, 587 (Hình 2 và Bảng 3). Sau 25 đời tiếp truyền tại vị trí 144 có sự thay đổi T > C, đột biến này được duy trì đến đời 95, nhưng đến đời 100 có sự hồi biến C > T. Tại vị trí 317 xảy ra đột biến A > G từ đời 25, được duy trì đến đời 100. Tại vị trí 587, từ đời 95 mới xảy ra đột biến A > G, được duy trì đến đời 100. Ở đời 100, ngoài 3 đột biến điểm tại 3 vị trí 144, 317 và 587, còn xảy ra thêm 2 đột biến nucleotide T > C ở vị trí 316 và C > T ở vị trí 436.

So sánh trình tự nucleotide trên ORF5 của chủng BG895 với trình tự tương ứng của 5 chủng cường độc được phân lập tại Việt Nam (Hình 2 và Bảng 3), đã ghi nhận được là: (i) So với chủng TG34 (Tiền Giang), có 5 sự sai khác tại các vị trí nucleotide lần lượt là 29, 144, 317, 495 và 587; (ii) So với chủng DN42 (Đồng Nai) có 6 sự sai khác ở các vị trí nucleotide lần lượt là 144, 189, 310, 317, 495 và 587; (iii) So với chủng HCM.CC3 (Hồ Chí Minh) có 16 sự sai khác ở các vị trí nucleotide lần lượt là 29, 71, 86, 104, 144, 172, 240, 279, 317, 378, 447, 471, 495, 519, 587 và 599; (iv) So với chủng CT.C1 (Cần Thơ) có 7 sự sai khác ở các vị trí nucleotide lần lượt là 144, 171, 246, 279, 317, 495 và 587; (v) So với chủng HUA/HP30 (Bắc Ninh) có 12 sự sai khác ở các vị trí nucleotide 44, 86, 101, 144, 240,

279, 317, 447, 471, 490, 495, và 587. Như vậy, so sánh trình tự nucleotide trên ORF5 của chủng BG895 với 5 chủng PRRSV cường độc, kết quả ghi nhận có 4 vị trí đột biến điểm xảy ra trên tất cả 5 chủng là 144 (C > T), 317 (G > A), 495 (C > T) và 587 (G > A); trong đó, có 2 vị trí đột biến sai nghĩa là 317 (G > A), và 587 (G > A), và 2 vị trí đột biến này cũng được tìm thấy trên chủng BG895 khi so với chủng gốc BG81.

So sánh trình tự nucleotide trên ORF5 của chủng BG895 với trình tự tương ứng của chủng HANVET1.VN, cũng đã ghi nhận được 14 sai khác ở các vị trí nucleotide lần lượt là 86, 97, 101, 135, 144, 177, 240, 279, 317, 447, 471, 490, 495 và 587. Trong khi đó, so với chủng JXA1-R (Trung Quốc) có 14 sự sai khác ở các vị trí nucleotide thứ 86, 101, 135, 144, 177, 240, 266, 279, 317, 447, 471, 490, 495 và 587. Trong số các vị trí biến đổi nucleotide trên ORF5 xảy ra trên cả 2 chủng với JXA1-R và HANVET1.VN khi so sánh với BG895, có 6 đột biến sai nghĩa xảy ra ở các vị trí 86 (C > T), 101 (G > A), 177 (A > T), 317 (G > A), 490 (G > A) và 587 (G > T), và 7 đột biến đồng nghĩa ở các vị trí 135 (A > G), 144 (C > T), 240 (A > G), 279 (A > G), 447 (A > G), 471 (A > G) và 495 (C > T).

Bảng 3: Các vị trí nucleotide thay đổi trên ORF5 của các chủng PRRSV

Vị trí nu- cleotide thay đổi	BG81	BG825	BG850	BG875	BG880	BG885	BG890	BG895	BG8 100	TG34	JXA1-R	HANVET1	DN42	HCM.C	CT.C1	HUA/HP30
29	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	A	G	G
44	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C
71	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A
86	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	T	C	T	C	T
97	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A
101	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A	G	G	G	A
104	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A
135	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	A	A	A	A
144	T	T	C	C	C	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T
171	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A
172	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	G	C	C
177	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	T	A	A	A	A
189	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	A
240	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	A	G	A	G
246	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C
266	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A
279	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	A	G	G	G
310	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G
316	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T
317	A	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A
378	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G
436	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C
447	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	A	G	A	G
471	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	A	G	A	G
490	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	A	G	G	G	A
495	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T
519	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	C	G	G
587	A	A	A	A	A	A	A	G	G	A	T	T	A	A	A	A
599	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T

Từ kết quả so sánh thành phần nucleotide, trình tự amino acid trên protein GP5 do gene ORF5 mã hóa cũng được so sánh (Hình 3 và Bảng 4). Chủng gốc BG81 qua quá trình tiếp truyền trên tế bào MARC-145 từ đời 25 đến đời 95 tại vị trí amino acid 106, tyrosine (Y) đã đột biến thành cysteine (C); đến đời 100, cysteine (C) tại vị trí 106 này biến đổi thành arginine (R); tại vị trí 196, đến đời 95, glutamine (Q) thay đổi thành arginine (R), duy trì đến đời 100.

So sánh trình tự amino acid trên GP5 của chủng BG895 với trình tự tương ứng của 5 chủng cường độc được phân lập tại Việt Nam (Hình 3 và Bảng 4) đã ghi nhận được như sau: (i) So với chủng TG34, có 3 sự sai khác ở các vị trí amino acid lần lượt là 10, 106 và 196; (ii) So với chủng DN42, có 3 sự sai khác ở các vị trí amino acid lần lượt là 104, 106 và 196; (iii) So với chủng HCM.CC3, có 7 sự sai khác ở các vị trí amino acid lần lượt là 10, 24, 29, 35, 106, 196 và 200; (iv) So với chủng CT.C1, có 2 sự sai khác ở các vị trí amino acid lần lượt là 106 và 196; (v) So với chủng HUA/HP30, có 6 sự sai khác ở các vị trí amino acid 15, 29, 34, 106, 164 và 196. Khi so sánh chủng BG895 với chủng HANVET1.VN, có 6 sai khác ở các vị trí amino acid 29, 34, 59, 106, 164 và 196; so với chủng JXA1-R có 7 sai khác ở các vị trí amino acid 29, 34, 59, 89, 106, 164 và 196.

Tóm lại, kết quả phân tích trình tự gene ORF5 cho thấy chủng BG81 có sự sai khác về trình tự nucleotide qua 95 đời tiếp truyền. Cụ thể ở chủng BG895 có 3 vị trí biến đổi nucleotide là T>C ở vị trí 144, A>G ở vị trí 317 và A>G ở vị trí 587, nhưng chỉ xảy ra 2 vị trí biến đổi amino acid Y106C và Q196R so với các chủng tiếp truyền trước và sau đời 95.

Mức độ tương đồng về trình tự nucleotide của ORF5 và trình tự amino acid của GP5

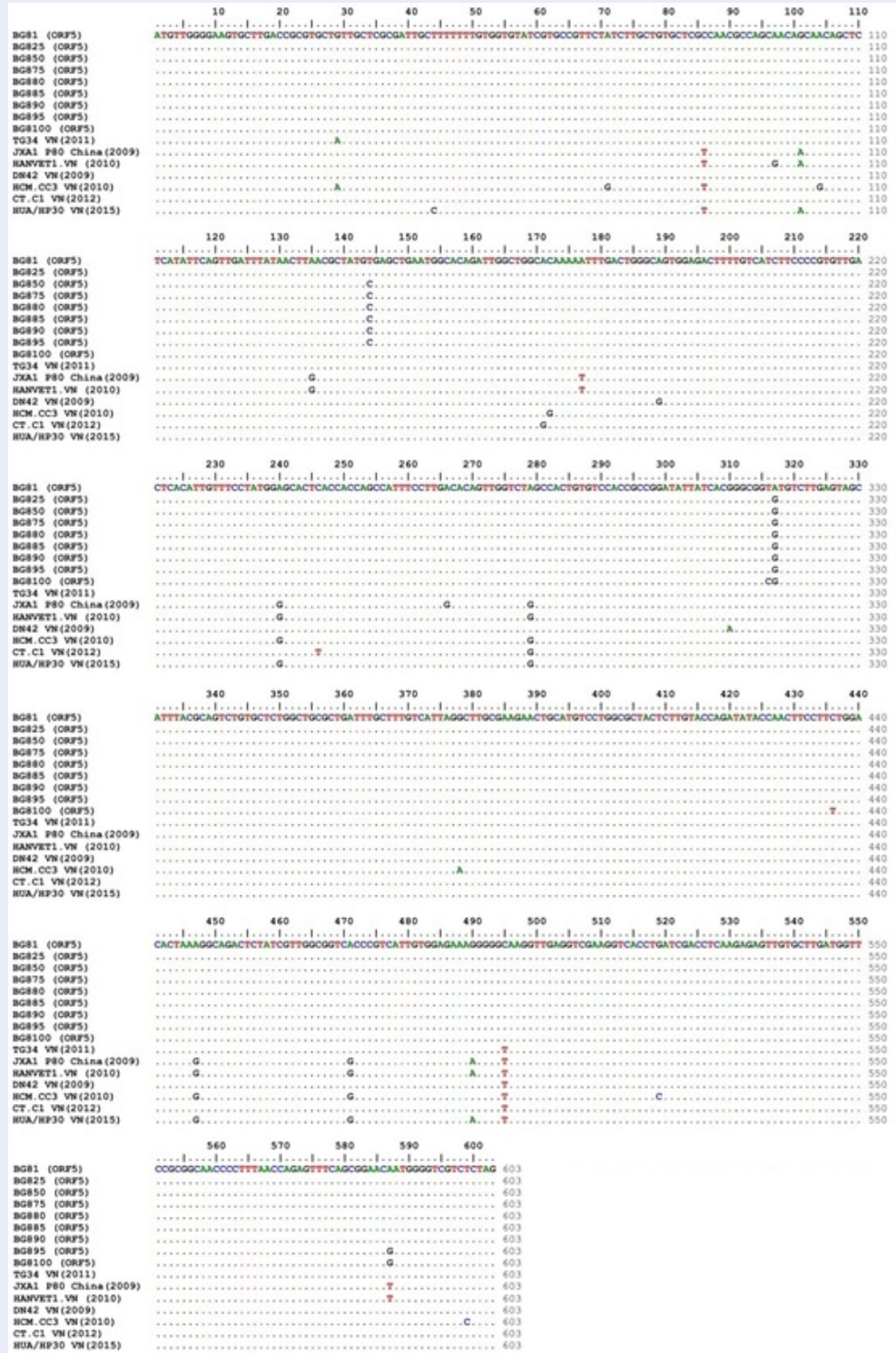
Kết quả phân tích cho thấy mặc dù có những thay đổi về nucleotide trên ORF5 dẫn đến một số thay đổi về amino acid trên GP5 xảy ra trong quá trình nuôi tiếp truyền chủng PRRSV từ chủng gốc BG81, nhưng chủng BG895 vẫn tương đồng 99,5% về trình tự nucleotide trên ORF5, và tương đồng 99% về trình tự amino acid trên GP5 so với BG81. Chủng BG895 có 99,8% tương đồng về trình tự nucleotide với các chủng được nuôi tiếp truyền từ đời 50 trở đi và 99,5% tương đồng về trình tự amino acid với các chủng được nuôi tiếp truyền từ đời thứ 25 trở đi. Tuy nhiên, chủng BG895 tương đồng 99,5% cả về trình tự nucleotide và amino acid với chủng BG8100 (Bảng 5). Phải chăng nếu tiếp truyền quá 95 đời, các chủng sau đó có khả năng thay đổi lớn về cấu trúc amino acid, và ảnh hưởng đến tính sinh miễn dịch.

Độ tương đồng về trình tự của chủng BG895 so với 5 chủng PRRSV cường độc khác đã được phân lập tại Việt Nam (TG34 VN2011, DN42 VN2009, HCM.CC3 VN2010, CT.C1 VN2012, HUA/HP30 VN2015) lần lượt là 99,1%; 99%; 97,3%; 98,8%; 98% về trình tự nucleotide của ORF5 và 98,5%; 98,5%; 96%; 99%; 97% về trình tự amino acid của GP5 (Bảng 5). Kết quả so sánh về trình tự này cho thấy chủng virus BG895 có sự tương đồng cao về trình tự nucleotide cũng như amino acid so với các chủng lưu hành tại Việt Nam, là cơ sở để chủng này được chọn làm giống kháng nguyên để sản xuất vaccine thử nghiệm phòng bệnh PRRS, với hy vọng vaccine thử nghiệm này có khả năng tạo miễn dịch bảo hộ chống lại các chủng gây bệnh PRRS đang lưu hành ở Việt Nam.

Đặc điểm biến đổi đầu C của GP5 ở chủng nhược độc BG985

Để phân tích đặc điểm biến đổi đầu C của GP5 trong quá trình nuôi tiếp truyền tạo chủng nhược độc, chủng BG895 được so sánh với các chủng vaccine nhược độc thuộc kiểu gene Bắc Mỹ trên thế giới, bao gồm các chủng RespPRRS-MLVvac, Ingelvac ATP, CH-1R, JXA1-R, HuN4-F122, TJM và XHGD-P122 cũng được nhược độc hóa bằng phương pháp tiếp truyền nhiều đời trên tế bào từ các chủng cường độc gốc lần lượt là VR2332, JA142, CH-1a, JXA1, HuN4, TJ và XHGD^{16,17,20,25}. Theo ghi nhận ở trên, chủng nhược độc BG895 có 2 đột biến amino acid ở đầu C của GP5: một đột biến Y106C xuất hiện sớm, trước đời 25 và một đột biến muợn Q196R ở đầu C của GP5 xuất hiện sau đời 90, duy trì từ đời 95 (BG895) đến đời 100 (BG8100) (Hình 4). Motif GP5Q¹⁹⁶WGRL²⁰⁰ đột biến đã tạo nên motif mới là GP5R¹⁹⁶WGRL²⁰⁰, và motif này cũng xuất hiện trong các chủng HuN4-F122, TJM và XHGD-P122 ở Trung Quốc^{12,16,17,25}.

Một số nghiên cứu chỉ ra rằng, ở đầu C của GP5, motif GP5Q¹⁹⁶WGRL/P²⁰⁰ bảo tồn trong tất cả chủng PRRSV thuộc kiểu gene Bắc Mỹ được biết cho đến nay^{11,12}. Đột biến tạo nên ở motif GP5R¹⁹⁶WGRL²⁰⁰ trong các chủng nhược độc/vaccine nói trên và kể cả chủng BG895, có ảnh hưởng đến tính sinh miễn dịch của protein này hay không là vấn đề cần xem xét cụ thể¹². Mặc dù vậy, motif GP5R¹⁹⁶WGRL²⁰⁰ có ở hầu hết các chủng vaccine PRRS nhược độc của Trung Quốc và Việt Nam chứng minh nguyên lý biến đổi amino acid vị trí 196 (Q196R) ở GP5 trong quá trình tiếp truyền các chủng PRRSV có độc lực cao (HP-PRRSV) này.



Hình 2: So sánh trình tự gene ORF5 của các chủng PRRSV. BG81, BG825, BG850, BG875, BG880, BG885, BG890, BG895, BG8100 lần lượt là các chủng độc gốc BG81 và các chủng ở đời tiếp truyền thứ 25, 50, 75, 80, 85, 90, 95, 100; TG34, DN42, HCM.CC3, CT.C1, HUA/HP30 lần lượt là các chủng gây bệnh được phân lập tại Tiền Giang năm 2011, Đồng Nai 2009, TP.HCM 2010, Cần Thơ 2012, Bắc Ninh 2015; JXA1-R là vaccine nhược độc của Trung Quốc; HANVET1.VN là vaccine nhược độc của Việt Nam.

Bảng 4: Các vị trí amino acid thay đổi trên ORF5 của các chủng PRRSV

Vị trí amino acid thay đổi	BG81	BG825	BG850	BG875	BG880	BG885	BG890	BG895	BG8	TG34	JXAI-R	HANVET1\ DN42	HCM.CC3	CT.C1	HUA/HP30
10	C	C	C	C	C	C	C	C	C	Y	C	C	Y	C	C
15	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	P
24	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	C	Y	Y
29	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	V	V	V	A	V
34	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	N	S	S	N
35	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S	N
59	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	N	N	K	K	K
89	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	G	D	D	D	D
104	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
106	Y	C	C	C	C	C	C	C	R	Y	Y	Y	Y	Y	Y
164	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	R	R	G	G	R
196	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	R	R	Q	L	L	Q	Q	Q
200	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	P	L	L

	20	40	60		
	MLGKcLTaccCSRLlflWCIVPFylAVLaNaensnSShiQLIYNLTlCELNGTDWLaqkFDWAVETf				
BG81	:			: 67	
BG825	:			: 67	
BG850	:			: 67	
BG875	:			: 67	
BG880	:			: 67	
BG885	:			: 67	
BG890	:			: 67	
BG895	:			: 67	
BG8100	:			: 67	
TG34	:	Y		: 67	
JXA1R	:		V N	: 67	
HANVET1.VN	:		V N	: 67	
DN42	:			: 67	
HCM.CC3	:	Y	C V S	: 67	
CT.C1	:			: 67	
HUA/HP30	:	P	V N	: 67	
		80	100	120	
	VIFPVLTHIVSYGALTTSHFLdTVGLaTVSTAG5YHgRyVLSSiYAVCALAALICFVIRLAKNCMSW				
BG81	:			: 134	
BG825	:		C	: 134	
BG850	:		C	: 134	
BG875	:		C	: 134	
BG880	:		C	: 134	
BG885	:		C	: 134	
BG890	:		C	: 134	
BG895	:		C	: 134	
BG8100	:		R	: 134	
TG34	:			: 134	
JXA1R	:		G	: 134	
HANVET1.VN	:			: 134	
DN42	:		R	: 134	
HCM.CC3	:			: 134	
CT.C1	:			: 134	
HUA/HP30	:			: 134	
		140	160	180	200
	RYSCTRYTNFLlDTKGRlyRWRSPVIVERgGKVEVEGHlIDLKRVVLDGsaATPLTRVSAEqWGRl				
BG81	:				: 200
BG825	:				: 200
BG850	:				: 200
BG875	:				: 200
BG880	:				: 200
BG885	:				: 200
BG890	:				: 200
BG895	:			R	: 200
BG8100	:			R	: 200
TG34	:				: 200
JXA1R	:		R	L	: 200
HANVET1.VN	:		R	L	: 200
DN42	:				: 200
HCM.CC3	:			P	: 200
CT.C1	:				: 200
HUA/HP30	:		R		: 200

Hình 3: So sánh trình tự amino acid trên GP5 của các chủng PRRSV. BG81, BG825, BG850, BG875, BG880, BG885, BG890, BG895, BG8100 lần lượt là các chủng độc gốc và các chủng ở đời tiếp truyền thứ 25, 50, 75, 80, 85, 90, 95, 100; TG34, DN42, HCM.CC3, CT.C1, HUA/HP30 lần lượt là các chủng gây bệnh được phân lập tại Tiền Giang năm 2011, Đồng Nai 2009, TP.HCM 2010, Cần Thơ 2012, Bắc Ninh 2015; JXA1-R là vaccine nhược độc của Trung Quốc; HANVET1.VN là vaccine nhược độc của Việt Nam.

Cây phả hệ dựa trên trình tự amino acid của GP5 ở các chủng BG8 qua các đời nuôi tiếp truyền

Trình tự amino acid của GP5 (200 amino acid) của các chủng BG8 qua các đời nuôi tiếp truyền và trên 92 chủng PRRSV được dùng để phân tích phả hệ (Hình 5). Trên cây phả hệ tại Hình 5, tất cả 101 trình tự GP5 của 101 chủng được sắp xếp trong 2 nhánh là kiểu gene Bắc Mỹ (North American genotype) và kiểu gene châu Âu (European genotype). Kiểu gene Bắc Mỹ phân thành 4 dòng (lineage) chính, gồm: dòng 1-4, dòng 2, dòng 3 và dòng 5-9 và các phân dòng

(sublineage) của chúng. Trong đó, các chủng PRRSV độc lực cao xuất hiện tại châu Á thuộc phân dòng 8.7²² và các chủng PRRSV xuất hiện tại Âu Mỹ thuộc dòng 5, 7, 9 và phân dòng 8.9. Các chủng PRRSV cường độc (HP-PRRSV) được phân lập sau những năm 2005-2006 được nhóm lại bên trong dòng 8.7²². Chủng gốc BG81 và các chủng qua các đời nuôi tiếp truyền trong nghiên cứu này (BG825, BG850, BG875, BG880, BG885, BG890, BG895 và BG8100) đều thuộc kiểu gene Bắc Mỹ và nằm chung trong phân dòng 8.7 cùng với các chủng PRRSV cường độc phân lập ở Việt Nam từ năm 2009 đến nay và các chủng Trung Quốc phân lập sau 2007.

Bảng 5: Mức độ tương đồng trình tự nucleotide của ORF5 và trình tự amino acid của GP5 giữa các chủng PRRSV

Tên chủng PRRSV	Tỉ lệ tương đồng nucleotide (%) trên ORF5			Tỉ lệ tương đồng amino acid (%) trên GP5		
	BG895	JXA1R China (2009)	HANVET1.VN (2016)	BG895	JXA1R China (2009)	HANVET1.VN (2016)
BG81	99,5	98,0	98,0	99,0	97,0	97,0
BG825	99,6	97,8	97,8	99,5	96,5	96,5
BG850	99,8	97,6	97,6	99,5	96,5	96,5
BG875	99,8	97,6	97,6	99,5	96,5	96,5
BG880	99,8	97,6	97,6	99,5	96,5	96,5
BG885	99,8	97,6	97,6	99,5	96,5	96,5
BG890	99,8	97,6	97,6	99,5	96,5	96,5
BG895	ID	97,6	97,6	ID	96,5	96,5
BG8100	99,5	97,5	97,5	99,5	96,5	96,5
TG34 VN (2011)	99,1	98,0	98,0	98,5	96,5	96,5
JXA1-R China (2009)	97,6	ID	99,6	96,5	ID	99,0
HANVET1.VN (2016)	97,6	99,6	ID	96,5	99,0	ID
DN42 VN (2009)	99,0	97,8	97,8	98,5	96,5	96,5
HCM.CC3 VN (2010)	97,3	97,8	97,8	96,0	95,0	95,0
CT.C1 VN (2012)	98,8	98,0	98,0	99,0	97,0	97,0
HUA/HP30 VN (2015)	98,0	99,1	99,1	97,0	98,0	98,0

Ngoài ra, cây phả hệ cho thấy nhóm các chủng vaccine thương mại RespPRRS-MLVvac, MLVvac-RespPRRSrepro, BCL PS 100 đều tập trung trong dòng 5, Prime Pac, SPvac nằm trong dòng 7, còn In-gelVacATP thuộc phân dòng 8.9, hoàn toàn riêng biệt với phân dòng 8.7 xuất hiện tại châu Á, ngoại trừ 2 vaccine JXA1-R của (Trung Quốc) và HANVET1.VN (Việt Nam) nằm trong phân dòng 8.7. Điều này nhắc nhở mối tương quan amino acid ở GP5 giữa vaccine có nguồn gốc Bắc Mỹ (vaccine cổ điển) phản ánh mức độ sai lệch nhất định trong sự tương quan kháng nguyên-miễn dịch và đòi hỏi cần có vaccine có nguồn gốc chủng từ phân dòng 8.7 đáp ứng sự phù hợp miễn dịch phòng chống các chủng mới xuất hiện (HP-PRRSV) đang lưu hành²².

THẢO LUẬN

Bộ gene PRRSV gồm 10 khung đọc mở gồm ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF5a, ORF6 và ORF7. Trong đó, GP5 do ORF5 mã hóa, là một trong những protein cấu trúc màng, có tính kháng nguyên đa dạng nhất, đóng vai trò quan trọng trong sự xâm nhiễm virus vào tế bào chủ và có domain chứa các epitope tạo kháng thể trung hòa nên nó liên quan chặt chẽ hoặc rất quan trọng đối với khả năng trung hòa virus của hệ thống miễn dịch của vật chủ^{2,8}. Do vậy, GP5 được chọn làm kháng nguyên để nghiên cứu các motif peptide/protein, chẳng hạn peptide tín hiệu, vùng xuyên màng, vùng kháng nguyên và vị trí glycosyl hóa... có vai trò trong hoạt động sống, nhân bản và sự tương tác của PRRSV với vật chủ. Sự biến đổi của GP5 là một trong những nguyên nhân làm gia tăng khả năng lây nhiễm và gây bệnh

	120	*	140	*	160	*	180	*	200																																																														
1. VR2322-USA_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	R	G	K	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	V	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	P	'
2. RespPRRS-MLVvac_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	R	G	K	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	V	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	P	'
3. JA142_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	V	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'		
4. Inge1vac_ATP_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	V	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'		
5. CH-1a_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	V	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'		
6. CH-1R_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	V	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'		
7. JXA1_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	V	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'		
8. JXA1-R_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	R	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
9. HuN4_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
10. HuN4-F112_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
11. TJ_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
12. TJM_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
13. XH-GD_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
14. XH-GD-P122_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
15. TG34_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
16. BG81_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
17. BG825_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
18. BG850_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
19. BG875_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
20. BG880_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
21. BG885_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
22. BG890_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
23. BG895_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			
24. BG8100_(GP5)	AA	LT	CF	VI	RL	AK	NC	MS	WR	Y	A	C	T	R	Y	T	N	F	L	D	T	K	G	R	L	Y	R	W	S	P	V	I	E	K	G	G	'	E	'	E	G	H	L	I	D	K	R	V	L	D	G	S	A	T	P	L	T	R	'	S	A	E	'	Q	W	G	R	'			

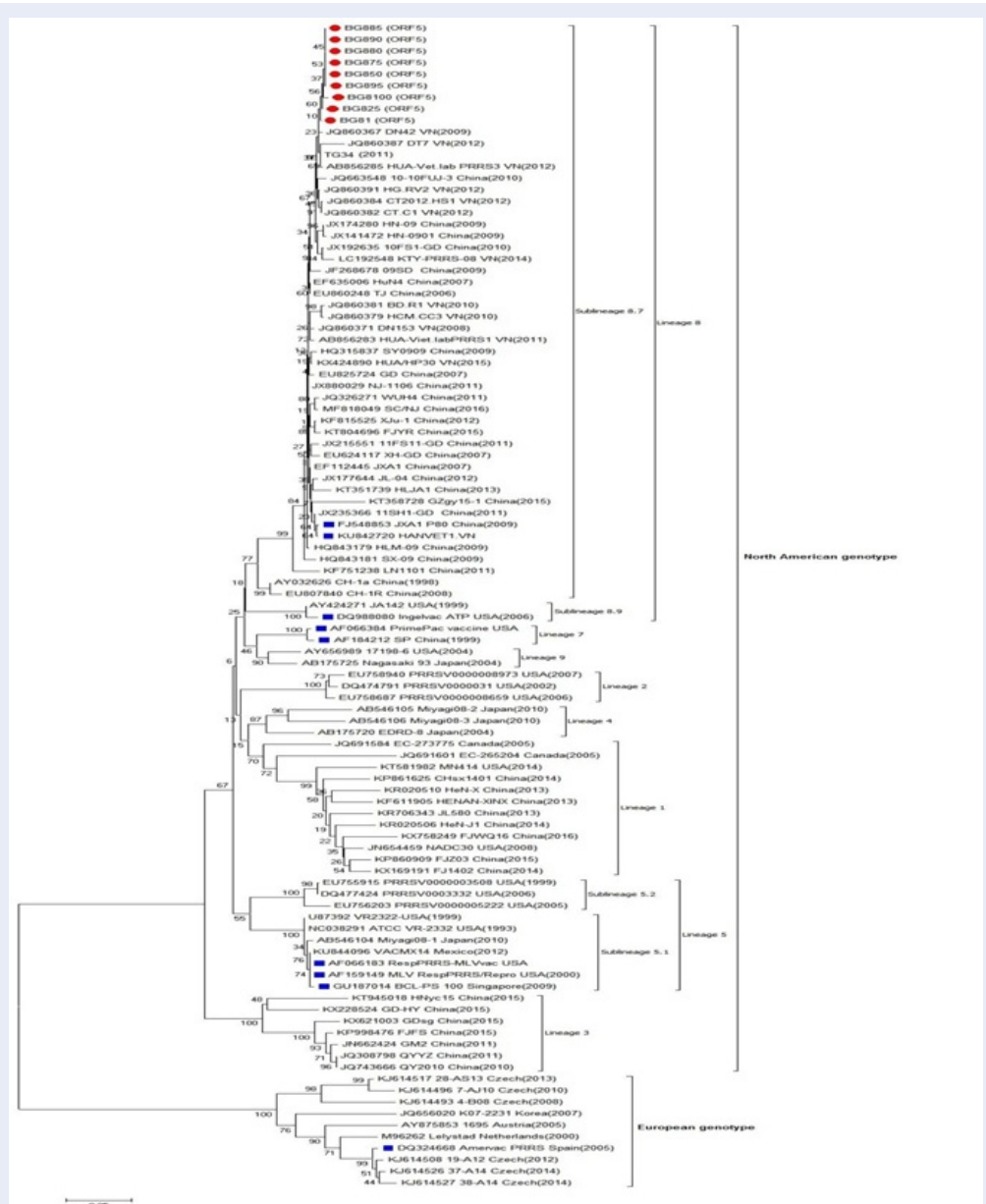
Hình 4: So sánh trình tự amino acid của GP5 ở các chủng PRRSV nghiên cứu và một số chủng PRRSV trên thế giới

của PRRSV, khiến cho bệnh tai xanh ngày càng phức tạp, do làm giảm hiệu quả phòng bệnh của các vaccine hiện đang lưu hành⁵. Đầu C của GP5 (từ amino acid 164 đến 200) chứa motif GP5Q¹⁹⁶WGRL/P²⁰⁰ được bảo tồn ở hầu hết các chủng PRRSV thuộc kiểu gene Bắc Mỹ^{11,12}. Nếu xảy ra đột biến amino acid tại vị trí này, sẽ ảnh hưởng đến độc lực của virus^{10,11}.

Chủng PRRSV BG895 trong nghiên cứu này được tạo ra bằng cách nuôi tiếp truyền chủng gốc BG81 nhiều đời trên tế bào MARC-145 nhằm thu nhận được chủng nhược độc làm chủng gốc để thử nghiệm sản xuất vaccine PRRS tiêm phòng trên đàn heo tại Việt Nam. Chủng BG895 đã được chứng minh không còn độc lực gây bệnh trên heo nhưng vẫn có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể kháng PRRSV ổn định¹⁵. Chủng BG895 có bộ gene kích thước 15.321 bp tương tự như chủng gốc BG81 nhưng mang 38 đột biến thay thế nucleotide làm thay đổi 14 amino acid. Đột biến nhiều nhất và quan trọng nhất xảy ra ở protein GP3 và GP5. Như vậy, chủng nhược độc BG895 tuy xuất hiện một số đột biến làm giảm độc lực virus nhưng vẫn giữ nguyên tính sinh miễn dịch tạo kháng thể đặc hiệu trên heo. Do đó, chủng BG895 có tiềm năng được dùng để làm kháng nguyên vaccine. Trong bài báo này, dựa trên phân tích trình tự GP5, chúng tôi đánh giá tính ổn định kháng nguyên GP5 và mối quan hệ di truyền của chủng BG895 so với chủng gốc BG81 và các chủng PRRSV đang lưu hành tại Việt Nam làm cơ sở cho việc dùng chủng BG895 làm kháng nguyên trong vaccine thử nghiệm để đánh giá tính an toàn và hiệu quả phòng bệnh PRRS.

Kết quả phân tích trình tự amino acid GP5 và xác lập cây phả hệ cho thấy GP5 của chủng nhược độc BG895

vẫn ổn định qua các lần tiếp truyền và thuộc kiểu gene Bắc Mỹ nằm trong phân dòng 8.7 cùng với các chủng PRRSV đang lưu hành tại Việt Nam, có mức độ tương đồng cao hơn so với các chủng vaccine JXA1-R và HANVET1.VN. Từ chủng BG81 đến chủng BG895, có 3 vị trí biến đổi nucleotide, T>C ở vị trí 144, A>G ở vị trí 317, và A>G ở vị trí 587 dẫn đến thay đổi 2 vị trí amino acid Y106C, Q196R. Hai vị trí biến đổi amino acid này không liên quan đến vùng domain ngoại bào, nơi được xem là vùng chứa epitope trung hòa chính trên GP5 (nằm tại vị trí amino acid 36-52)⁸, nên không ảnh hưởng đến tính sinh miễn dịch của virus. Theo kết quả về những biến đổi amino acid trên GP5, khảo sát cho thấy đột biến Y106C bắt đầu sau đời 25 được duy trì đến đời 95, còn đột biến Q196R xuất hiện muộn sau đời 90, duy trì từ đời 95 đến đời 100 nên phải chăng đến đời 95, chủng BG895 mất khả năng gây độc lực nhưng vẫn giữ tính sinh miễn dịch tạo kháng thể đặc hiệu. Tuy nhiên, nếu tiếp truyền quá 100 đời, thì có thể có khả năng xảy ra thêm đột biến amino acid trên GP5, thí dụ như đột biến C106R được ghi nhận ở BG8100. Những đột biến này có ảnh hưởng đến chức năng sinh học của virus hay không, cần có thêm các khảo sát. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng một số đột biến amino acid có thể có mức độ ảnh hưởng nhất định đến chức năng của protein kháng nguyên, thí dụ như các thay đổi tạo thành arginine (R), cysteine (C) dẫn đến sự hình thành điểm cắt của protease tạo ra các oligopeptide miễn dịch; hoặc sự tạo thành asparagine (N), aspartic acid (D), lysine (K) có vai trò trong sự gấp cuộn của protein dẫn đến sự tăng cường hoặc giảm bớt chức năng sinh học của protein kháng nguyên^{12,22,26}. Đột biến Q196R



Hình 5: Cây phả hệ xây dựng dựa trên trình tự amino acid GP5 của 101 chủng PRRSV. Phân tích phả hệ được thực hiện bằng phần mềm MEGA6.06 sử dụng phương pháp “kết nối liền kề” (NJ, Neighbor-joining) với hệ số tin tưởng (bootstrap) 1.000 lần lặp lại. Trong đó, ○ chỉ chủng BG81 qua các lần tiếp truyền □ chỉ các chủng vaccine đang lưu hành.

tại đầu C của GP5 cũng xảy ra ở các chủng vaccine nhược độc HuN4-F112, TJM, XH-GDP122, tạo nên motif mới GP5R¹⁹⁶WGRL²⁰⁰^{12,16,17,25}. Motif này bắt đầu xuất hiện trên GP5 từ đời 95 (BG895) được duy trì đến đời 100 (BG8100). Điều này gợi ra rằng, đột biến trên GP5 có ảnh hưởng đến độc lực của chủng gốc, nhưng không làm thay đổi tính sinh miễn dịch tạo kháng thể; đồng thời, không nên tiếp truyền quá đời 95 vì việc tiếp truyền quá mức cần thiết có thể ảnh hưởng đến biến đổi phản chiếu trong hệ gene của chủng PRRSV như nghiên cứu của Yu và cộng sự²⁶, cụ thể trong nghiên cứu này, ở lần tiếp truyền 100, tại vị trí amino acid 106 đã xảy ra thêm 1 đột biến C106R.

KẾT LUẬN

Nhằm mục đích tạo ra chủng virus nhược độc dùng làm kháng nguyên vaccine phòng bệnh tai xanh ở heo, việc nuôi cấy tiếp truyền chủng PRRSV cường độc gốc BG81 trên tế bào MARC-145 đã được thực hiện và thu được chủng nhược độc BG895 có tiềm năng sử dụng làm kháng nguyên vaccine. Dựa trên phân tích trình tự ORF5 và GP5, tính ổn định của kháng nguyên đã được phân tích và khảo sát mối quan hệ tương đồng của chủng BG895 so với chủng gốc BG81 và một số chủng PRRSV gây bệnh khác được phân lập tại Việt Nam. Kết quả phân tích cho thấy qua quá trình tiếp truyền từ chủng gốc BG81 đến chủng BG895 đã xảy ra đột biến điểm thay thế nucleotide tại các vị trí 144, 317, 587 trên ORF5 và 2 đột biến thay đổi amino acid ở đầu C của GP5 là Y106C xuất hiện sớm trước đời 25 và Q196R xuất hiện muộn sau đời 90. Khi so sánh với BG81, chủng BG895 có 99,5% tương đồng về trình tự nucleotide trên ORF5, và 99% tương đồng về trình tự amino acid trên GP5. GP5 của chủng BG895 có độ tương đồng 97,3-99,1% về trình tự nucleotide và 96-99% về trình tự amino acid so với 5 chủng PRRSV cường độc khác đã được phân lập tại Việt Nam. Tại đầu C của GP5 ghi nhận đột biến Q196R góp phần hình thành motif GP5R¹⁹⁶WGRL²⁰⁰ là motif thường xuất hiện trên kháng nguyên GP5 của các chủng PRRSV nhược độc thuộc kiểu gene Bắc Mỹ. Phân tích cây phả hệ dựa trên trình tự amino acid của GP5 cho thấy các chủng BG81-BG895 thuộc kiểu gene Bắc Mỹ, nằm trong phân dòng 8.7 thường xuất hiện ở châu Á và chủng BG895 có 96-99,5% tương đồng với các chủng đang lưu hành Việt Nam. Các kết quả này xác nhận tính ổn định kháng nguyên của chủng BG895 và mối quan hệ

chặt chẽ với các chủng PRRSV tại Việt Nam. Trên cơ sở này, trong các nghiên cứu tiếp theo, chủng BG895 sẽ được sử dụng làm kháng nguyên tạo vaccine để đánh giá tính an toàn và khả năng bảo hộ đối với PRRSV gây bệnh tai xanh trên heo nuôi thực nghiệm và nuôi trong thực tế sản xuất.

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

aa: amino acid (A, alanine; R, arginine; N, asparagine; D, aspartic acid; C, cysteine; E, glutamic acid; Q, glutamine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; L, leucine; K, lysine; M, methionine; F, phenylalanine; P, proline; S, serine; T, threonine; W, tryptophan; Y, tyrosine; V, valine).

bp: base pair

cDNA: complement Deoxyribonucleic acid

dNTP: Deoxyribonucleotide triphosphate

DMSO: Dimethyl sulfoxide

GP: Glycoprotein

HP-PRRSV: Highly pathogenic - Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

kb: kilobase

kDa: kiloDalton

M: Membrane

N: Nucleocapsid

nt: nucleotide (A: Adenine, C: Cytosine, G: Guanine, T: Thymine)

ORF: Open reading frame

PCR: Polymerase chain reaction

PRRS: Porcine reproductive and respiratory syndrome

PRRSV: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

RNA: Ribonucleic acid.

RNase: Ribonuclease

RT – PCR: Reverse transcription – polymerase chain reaction

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả đồng ý không có bất kỳ xung đột lợi ích nào liên quan đến các kết quả đã công bố.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Bùi Anh Thy thực hiện các thí nghiệm, thu thập, xử lý các dữ liệu và viết bản thảo.

Trần Xuân Hạnh đóng vai trò định hướng, lên kế hoạch nghiên cứu.

Trần Linh Thuộc góp phần thảo luận các kết quả nghiên cứu, hoàn chỉnh bản thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- De Vries AAF, Horzinek MC, Rottier PJM, and de Groot RJ. The genome organization of the nidovirales: Similarities and differences between arteri-, toro-, and coronaviruses. *Seminars in Virology*. 1997; 8:33-47; Available from: <https://doi.org/10.1006/smvy.1997.0104>.
- Kappes M, Faaberg K. PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology*. 2015; 479-480:475-486; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.012>.
- Dokland T. The structural biology of PRRSV. *Virus Research*. 2010; 154:86-97; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.029>.
- Ansari IH, Kwon B, Osorio FA, Pattnaik AK. Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *Journal of Virology*. 2006; 80(8):3994-4004; Available from: <https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.3994-4004.2006>.
- Dea S, Gagnon C, Mardassi H, Pirzadeh B, & Rogan D. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch. Virol.* 2000; 145:659-688; Available from: <https://doi.org/10.1007/s007050050662>.
- Allende R, Lewis TL, Lu Z, Rock DL, Kutish GF, Ali A, Doster AR and Osorio FA. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *Journal of General Virology*. 1999; 80:307-315; Available from: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-307>.
- Chi NQH, Son NH, Thao PPN, Chung CD, Mai TPN, Trinh HL, Hoai TTN, Long TL. The ORF5 variation of Vietnamese porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains. *Slov. Vet. Res.* 2017; 54(3):125-132; Available from: <http://www.dlib.si/?URN=URN:NBN:SI:DOC-J56ZC3Z7>.
- Music N, Gagnon CA. The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Animal Health Research Reviews*. 2010; 11(2):135-163; Available from: <https://doi.org/10.1017/S1466252310000034>.
- Tian H, Cheng Y, Wu J-y, He J-h, Shang Y-j, & Liu X-t. Application of GP5 protein to develop monoclonal antibody against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virologica Sinica*. 2011; 26(4):267-272; Available from: <https://doi.org/10.1007/s12250-011-3198-5>.
- Opiessnig T, Halbur PG, Yoon K-J, Pogranichniy RM, Harmon KM, Evans R, Key KF, Pallares FJ, Thomas P, and Meng XJ. Comparison of molecular and biological characteristics of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (Ingelvac PRRS MLV), the parent strain of the vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and two recent field isolates of PRRSV. *Journal of Virology*. 2002; 76(23):11837-11844; Available from: <https://doi.org/10.1128/JVI.76.23.11837-11844.2002>.
- Tian ZJ, An TQ, Zhou YJ, Peng JM, Hu SP, Wei TC, Jiang YF, Xiao Y, Tong GZ. An attenuated live vaccine based on highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) protects piglets against HP-PRRS. *Vet Microbiol.* 2009; 138(1-2):34-40; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.003>.
- Lu W, Sun B, Mo J, Zeng X, Zhang G, Wang L, Zhou Q, Zhu L, Li Z, Xie Q, Bi Y, Ma J. Attenuation and immunogenicity of a live high pathogenic PRRSV vaccine candidate with a 32-amino acid deletion in the nsp2 protein. *J. Immunol Res.* 2014; 810523; Available from: <http://doi.org/10.1155/2014/810523>.
- Hải NN, và Hưng VK. Tính đa dạng của kiểu gene virus PRRS nhiễm trên một số đàn heo nuôi. *Khoa học kỹ thuật Thú y*. 2012; XIX (1):20-26;.
- Cầm NV, Hiến TH, Cường NT, và Tùng N. Khảo nghiệm vaccine vô hoạt của Trung Quốc và vaccine nhược độc của Đức phòng PRRS ở Việt Nam. *Khoa học kỹ thuật Thú y*. 2011; XVIII (1):31-40;.
- Thy BA, Hòa LT, Hạnh TX, Thuốc TL. Phân tích biến đổi gene của các chủng virus gây bệnh tai xanh (PRRSV) qua tiếp truyền trên tế bào từ chủng virus thực địa. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2020; 4(4):857-867; Available from: <https://doi.org/10.32508/stdjns.v4i4.914>.
- An TQ, Tian ZJ, Zhou YJ, Xiao Y, Peng JM, Chen J, Jiang YF, Hao XF, Tong GZ. Comparative genomic analysis of five pairs of virulent parental/ attenuated vaccine strains of PRRSV. *Vet Microbiol.* 2011; 149(1-2):104-112; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.001>.
- Leng X, Li Z, Xia M, Li X, Wang F, Wang W, Zhang X, Wu H. Mutations in genome of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus potentially related to attenuation. *Vet Microbiol.* 2012; 157:50-60; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.012>.
- Thy BA, Hòa LT, Hạnh TX, Thuốc TL. So sánh đột biến amino acid ở 8 cặp chủng virus PRRS cường độc gốc/ vaccine nhược độc. *Báo cáo khoa học trong Hội nghị Công nghệ sinh học. NXB Đại học Huế.* 2020; 630-636;.
- Le VP, Do HQ, Nguyen VG, Le DQ, Vu TTH, Than DD, Nguyen VT, Tran TN and Lo TV. Genetic characterization of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolated in Vietnam. *NCBI*. 2016;.
- Han W, Wu JJ, Deng XY, Cao Z, Yu XL, Wang CB, Zhao TZ, Chen NH, Hu HH, Bin W, Hou LL, Wang LL, Tian KG, Zhang ZQ. Molecular mutations associated with the in vitro passage of virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Genes*. 2009; 38(2):276-284; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0322-1>.
- Nga NT, Thu HT, Hoa NT, Hiến TTT, Khánh TV, Ba NT, Vũ NH, Quyển ĐV, Thành TL, Khang DD. Giải trình tự và phân tích toàn bộ hệ gene chủng virus nhược độc HANVET1.VN sử dụng trong sản xuất vaccine phòng hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2018; 16(1):51-57;.
- Thuy NT, Thu NT, Son NG, Ha Le TT, Hung VK, Nguyen NT, Khoa Do VA. Genetic analysis of ORF5 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in Vietnam. *Microbiol Immunol.* 2013; 57(7):518-526; Available from: <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12067>.
- Li J, Yin Y, Guo B, Zhou S, Zhang Y, Liu X, Sun T. Sequence analysis of the NSP2, ORF5, and ORF7 genes of 11 PRRS virus isolates from China. *Virus Genes*. 2012; 45:256-264; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0763-4>.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kuma S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30(12):2725-2729; Available from: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst1197>.
- Chen Y, He S, Sun L, Luo Y, Sun Y, Xie J, Zhou P, Su S, Zhang G. Genetic variation, pathogenicity, and immunogenicity of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain XH-GD at different passage levels. *Arch. Virol.* 2016; 161(1):77-86; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2597-6>.
- Yu X, Chen N, Deng X, Cao Z, Han W, Hu D, Wu J, Zhang S, Wang B, Gu X, Tian K. Genomic sequencing reveals mutations potentially related to the overattenuation of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Vaccine Immunol.* 2013; 20(4):613-619; Available from: <https://doi.org/10.1128/CVI.00672-12>.

Stability of the GP5 antigen on the attenuated PRRSV BG895 strain

Bui Anh Thy^{1,2,*}, Tran Xuan Hanh¹, Tran Linh Thuoc^{2,*}



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

¹Veterinary Research Centre – NAVETCO National Veterinary Joint Stock Company

²University of Science, VNU-HCM, Vietnam

Correspondence

Bui Anh Thy, Veterinary Research Centre – NAVETCO National Veterinary Joint Stock Company

University of Science, VNU-HCM, Vietnam

Email: anhthy.bui@gmail.com

Correspondence

Tran Linh Thuoc, University of Science, VNU-HCM, Vietnam

Email: tlthuoc@hcmus.edu.vn

History

- Received: 24/5/2021
- Accepted: 18/8/2021
- Published: 28/8/2021

DOI : 10.32508/stdjns.v5i3.1077



Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



ABSTRACT

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is one of the most dangerous infectious disease of the swine industry, caused by PRRSV, a single-stranded, positive-sense RNA virus. The viral envelope contains 6 structural proteins; among these, GP5 is the highly mutation-sensitive antigenic protein which plays important role in viral infection capacity and possesses important immunological domains with neutralizing epitopes. From the virulent PRRS BG8 strain isolated from PRRSV infected pig, using serial passage method in MARC-145 cell line, an attenuated strain in 95th passage, named as BG895, with high potential to be a vaccine candidate was successfully obtained. In this study, based on the sequence analysis of ORF5 and GP5 in comparison with those from the BG8 parental strain, several other PRRSV strains isolated in Vietnam and two attenuated strains currently being used as PRRSV vaccines, the GP5 antigenic stability and genetic relationship of the attenuated BG895 strain were analyzed. The results showed that although there were a few mutations occurred in the ORF5 nucleotide sequence and GP5 amino acid sequence during serial passage from the BG8 parental strain, the BG895 strain had 99.5% homology in ORF5 nucleotide sequence and 99% homology in GP5 amino acid sequence with those of BG8, respectively. BG895 strain had 99.8% homology in ORF5 nucleotide sequence with the strains harvested on the 50th and onward passages, and 99.5% homology in GP5 amino acid sequence with the strains harvested on the 25th and onward passages, respectively. Comparing with those from other virulent Vietnam strains such as DN42 VN2009, HCM.CC3 VN2010, TG34 VN2011, CT.C1 VN2012, HUA/HP30 VN2015; BG895 had 97.3-99,1% homology in nucleotide sequence and 96-99% homology in amino acid sequence. In GP5 C-terminal end, the Q196R mutation was observed on the strains harvested on the 95th to 100th passages, resulted in the GP5R¹⁹⁶WGRL²⁰⁰ motif, which is often appeared on GP5 of type II attenuated PRRSV strains. The phylogenetic analysis of GP5 amino acid sequence revealed that BG81-BG895 strains were grouped into sublineage 8.7 frequently found in Asia and BG895 had 96-99.5% homology to other virulent strains in Vietnam. These results confirmed the GP5 antigenic stability of BG895 strain and its close genetic relationship with virulent PRRSV strains in the country. Based on these results, the BG895 strain will be used as the antigen in a trial vaccine formulation to evaluate its safety and protectivity against PRRSV on experimental and farming pigs.

Key words: Porcine reproductive and respiratory syndrome, attenuated PRRSV strain, BG895, ORF5, GP5

Cite this article : Thy B A, Hanh T X, Thuoc T L. **Stability of the GP5 antigen on the attenuated PRRSV BG895 strain** . *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 5(3):1539-1554.