

Phân tích biến đổi gen của chủng vi rút gây bệnh tai xanh (PRRSV) qua quá trình tiếp truyền trên tế bào từ chủng vi rút thực địa

Bùi Anh Thy^{1,2,*}, Lê Thanh Hoà³, Trần Xuân Hạnh¹, Trần Linh Thuớc²



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

³Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ 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

Email: anhthy.bui@gmail.com

Lịch sử

- Ngày nhận: 19-5-2020
- Ngày chấp nhận: 24-11-2020
- Ngày đăng: 02-12-2020

DOI: 10.32508/stdjns.v4i4.914



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

Nghiên cứu này nhằm phân tích, so sánh sự biến đổi về hệ gen và độc lực ở các chủng vi rút gây bệnh tai xanh PRRS được gây nhược độc qua 95 lần tiếp truyền trên dòng tế bào MARC-145 (kí hiệu BG895) so với chủng cường độc gốc (kí hiệu BG81) được phân lập từ heo thực địa tại phía Bắc Việt Nam. Kết quả cho thấy, đã có sự thay đổi rõ rệt về độc lực: heo bị tiêm chủng gốc BG81 có thân nhiệt tăng cao, sốt trên 41°C, thời gian sốt kéo dài 12 ngày, kèm theo những biểu hiện bệnh lý của hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản, như biếng ăn, bỏ ăn, lười vận động, mí mắt sưng, nổi chấm đỏ ở vành tai và toàn thân; trong khi đó, heo được tiêm chủng vi rút đã qua 95 lần tiếp truyền BG895 có thân nhiệt ổn định trung bình 39,5°C, không quá 39,9°C, ăn uống, hoạt động bình thường. Hệ gen của các chủng vi rút qua nhiều đời tiếp truyền có sai khác đáng kể nhưng độ dài luôn được bảo tồn là 15.321 bp. Ở chủng nhược độc vào đời tiếp truyền thứ 95 (BG895) đã xảy ra 38 đột biến thay thế nucleotide dẫn đến thay đổi 14 amino acid. Hầu hết các đột biến (khoảng 65%) đã xảy ra trước đời tiếp truyền thứ 50. Sự thay đổi 14 amino acid được phân bố trên các protein không cấu trúc Nsp1, Nsp4, Nsp9, Nsp10, và các protein cấu trúc GP2, E, GP3, GP4, GP5 và N. Đặc biệt, có hai đột biến thay thế trong cùng một bộ mã đã xảy ra trên ORF3, dẫn đến đột biến phenylalanine thành leucine (F₁₄₃L). Protein cấu trúc M và 8 protein không cấu trúc Nsp2, Nsp3, Nsp5, Nsp6, Nsp7, Nsp8, Nsp11 và Nsp12 trong số 19 protein của vi rút PRRS được bảo tồn, không xảy ra đột biến, nên được xem là không liên quan với quá trình nhược độc của vi rút. Vùng gen biểu hiện protein cấu trúc nhỏ nhất E có mức độ đột biến cao nhất trong các protein đã phân tích và được xem là đối tượng có tính biến đổi cao. Những biến đổi này được xem là cơ sở phân tử của tính nhược độc của các chủng vi rút PRRS gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp trên heo. Kết quả phân tích so sánh gen giữa chủng vi rút nhược độc BG895 và chủng gốc cường độc BG81 này cung cấp dữ liệu phân tử làm cơ sở cho việc kiểm tra giám sát đặc điểm phân tử của giống nhược độc gốc dùng trong chế tạo vắc-xin phòng bệnh tai xanh PRRS tại Việt Nam.

Từ khoá: bệnh tai xanh, hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp, PRRS, vắc-xin, vi rút nhược độc

MỞ ĐẦU

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở heo (PRRS, porcine reproductive and respiratory syndrome) là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, với các đặc điểm rối loạn sinh sản, như sảy thai ở heo nái và suy giảm đường hô hấp, đặc biệt ở heo bú sữa; ngoài ra, xuất hiện các nốt chấm đỏ trên tai ở mọi lứa tuổi, nên còn được gọi là "bệnh tai xanh". Bệnh xảy ra chủ yếu ở những vùng đồng bằng có mật độ chăn nuôi cao, trung bình cứ hai năm một lần tái bùng phát trên diện rộng. Cho đến nay, bệnh vẫn đang tiếp tục xảy ra và gây thiệt hại lớn đối với các nước có ngành chăn nuôi heo phát triển. Tác nhân gây bệnh là một loại vi rút thuộc nhóm *Arterivirus*, họ *Arteriviridae*, bộ *Nidovirales*. Dựa vào kiểu gen (genotype), vi rút PRRS được chia làm hai loại: kiểu gen châu Âu (type I) và Bắc Mỹ (type II). Tuy bố trí sắp xếp trật tự gen giống nhau, nhưng đặc tính của bộ gen, độ dài các gen và đặc tính

sinh học (tính gây bệnh, tính sinh miễn dịch) của các chủng thuộc 2 dòng vi rút PRRS này là khác nhau¹⁻⁴. Các vi rút thuộc cùng một dòng cũng có sự khác nhau về các chuỗi nucleotide, nhất là dòng Bắc Mỹ. Bộ gen của vi rút PRRS là phân tử RNA sợi đơn, mạch dương, có vỏ bọc bên ngoài, dài khoảng 15,3 – 15,5 kb tùy theo dòng virút, gồm 10 khung đọc mở (ORF): ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF5a, ORF6 và ORF7⁵. Trong đó, ORF1a và ORF1b (ORF1a,b) nằm gần đầu 5', mã hoá cho phức RNA- dependent RNA polymerase, chiếm khoảng 75% trình tự của bộ gen. Phía đầu 3' chứa những vùng gen mã hoá cho các protein cấu trúc (ORF2-7) của vi rút, trong đó, ORF2-3-4 là các gen mã hoá protein chức năng GP2-3-4, được glycosyl hoá; ORF5 mã hóa glycoprotein vỏ ngoài (GP5) mang tính kháng nguyên. Tiếp theo là ORF6 mã hóa cho protein màng M và ORF7 cho protein nucleocapsid N, là 2 protein nội màng không được glycosyl hóa, nhưng có tính kháng

Trích dẫn bài báo này: Thy B A, Hoà L T, Hạnh T X, Thuớc T L. **Phân tích biến đổi gen của chủng vi rút gây bệnh tai xanh (PRRSV) qua quá trình tiếp truyền trên tế bào từ chủng vi rút thực địa.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(4):857-867.

nguyên và có mức độ bảo tồn cao. Các gen có đặc điểm gối đầu một phần 3' của gen trước với phần 5' của gen sau, gen sau tận dụng một phần cuối chuỗi nucleotide của gen trước làm promoter hoạt động^{1,2}. Trong quá trình tiếp truyền vi rút PRRS trên tế bào MARC-145, ở các đời tiếp truyền nhất định xảy ra các biến đổi nucleotide, dẫn đến thay đổi amino acid ở một số protein^{3,6,7}. Việc nghiên cứu so sánh biến đổi hệ gen giữa các chủng thu được từ quá trình tiếp truyền chủng gốc cường độc qua nhiều đời cho đến lúc thu hoạch làm giống gốc vắc-xin thông qua việc giải trình tự của toàn bộ gen, từ đó phân tích sai khác thành phần nucleotide và amino acid của từng gen và cả bộ gen để xem xét mối tương quan giữa giảm độc lực và tăng độc lực trong quá trình sử dụng vắc-xin, là cần thiết.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả đánh giá độc lực các chủng vi rút PRRS thu được qua 95 lần tiếp truyền trên dòng tế bào MARC-145 từ chủng cường độc gốc được phân lập từ heo thực địa tại Việt Nam và phân tích các biến đổi trong bộ gen nhằm cung cấp dữ liệu phân tử làm cơ sở cho việc kiểm tra giám sát đặc điểm phân tử của giống nhược độc gốc dùng trong chế tạo vắc-xin phòng bệnh PRRS ở nước ta.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu thí nghiệm

Chủng vi rút BG8 cường độc được phân lập trên tế bào MARC-145 từ heo thực địa tại Việt Nam, kí hiệu là BG81. Các chủng thu được từ việc tiếp truyền chủng gốc BG81 trên tế bào MARC-145 được ký hiệu theo số lần tiếp truyền bắt đầu từ BG81 đến BG895 (tiếp truyền đời thứ 95).

Chủng TG34 dùng công thử thách là chủng cường độc phân lập từ heo thực địa ở Tiền Giang, được tiếp truyền 4 đời trên tế bào MARC-145, và đã được đánh giá độc lực trên heo thí nghiệm ở lần tiếp truyền thứ 1.

Dòng tế bào MARC-145 do AAHL cung cấp; môi trường nuôi cấy tế bào EMEM (Minimum essential medium with Earle's salts); huyết thanh bào thai bê; lactalbumin hydrolysate 25%; sodium pyruvate 100 mM; L-glutamine 200 mM; N – 2 – hydroxyethylpiperazine – N – 2 – ethanesulphonic acid (HEPES) 1 M; sodium hydrogen carbonate.

Động vật thí nghiệm: heo 35 ngày tuổi, khỏe mạnh, không có kháng thể kháng vi rút PRRS và kháng nguyên vi rút PRRS (được kiểm tra bằng phương pháp ELISA và RT – PCR).

Tiếp truyền vi rút nhiều đời trên tế bào MARC-145

Tiến hành tiếp truyền vi rút PRRS nhiều đời trên tế bào MARC-145 được nuôi cấy trong bình T25. Bổ sung 1 mL huyền dịch vi rút vào mỗi T25. Ủ tế bào đã nhiễm vi rút trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂. Thay môi trường mới sau 24 giờ nuôi cấy. Theo dõi và thu hoạch huyền dịch vi rút khi bệnh tích tế bào đạt 80%.

Xác định hiệu giá vi rút trên tế bào MARC-145

Tế bào MARC-145 được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng. Huyền dịch vi rút cần xác định hiệu giá được pha loãng bậc 10; cho 100 µL dịch vi rút vào mỗi giếng có chứa tế bào theo từng độ pha loãng, mỗi độ pha loãng thực hiện 4 lần. Ủ đĩa tế bào đã nhiễm vi rút trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂. Theo dõi tế bào hàng ngày, trong vòng 7 ngày. Sau đó, ghi nhận kết quả, và tính toán hiệu giá vi rút (TCID₅₀/mL) theo công thức Reed và Muench.

Gây bệnh PRRS thực nghiệm nhằm đánh giá độc lực của các chủng vi rút qua quá trình nhược độc hóa

Thực hiện 5 lô thí nghiệm, mỗi lô gồm 3 heo 35 ngày tuổi. Tất cả các heo thí nghiệm đều được kiểm tra kháng nguyên, và kháng thể kháng bệnh tai xanh nhằm đảm bảo tính chính xác của thí nghiệm, chỉ giữ lại những heo âm tính. Trong 5 lô thí nghiệm, 4 lô được tiêm 4 chủng vi rút lần lượt là BG81, BG850, BG875 và BG895 và 1 lô đối chứng tiêm dung dịch sinh lý (PBS), với liều tiêm 10^{5,0}TCID₅₀/mL. Sau 28 ngày tiêm vi rút, tiến hành công thử thách với chủng vi rút cường độc TG34, liều tiêm là 10^{5,0}TCID₅₀/mL. Huyết thanh heo được thu vào các thời điểm 0, 14, 21, 28, 42 và 49 ngày sau nhiễm, và đánh giá tình trạng đáp ứng kháng thể bằng phương pháp ELISA (LSIVET) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thu toàn bộ gen của vi rút và giải trình tự

Hệ gen của vi rút PRRS được thu nhận theo bộ kit QI-AampViral RNA kit của QIAGEN (Đức) dựa vào khả năng kết hợp RNA trên màng silicagel. Tiếp đến, RNA được chuyển đổi thành cDNA, bằng môi ngẫu nhiên (random hexamer), sử dụng bộ kit của hãng Thermo-Scientific. Thành phần 20 µL dung tích phản ứng gồm: 5 µL RNA tổng số mỗi chủng (10-20 ng/µL), 1 µL mỗi hexamer (100 pmol/µL), 1 µL dNTP (10 mM), 8 µL nước không có nuclease, 4 µL đệm 5X, 1 µL enzym MaximaTM Reverse Transcriptase (20 U/µL). Phản ứng chuyển đổi cDNA được tiến hành

ở 50°C/60 phút và vô hoạt ở 85°C/5 phút. Sản phẩm cDNA được bảo quản ở -20°C.

Phản ứng PCR thực hiện từ khuôn cDNA trong dung tích 50 µL gồm: 25 µL PCR mastermix (Thermo Scientific), 2 µL mỗi loại mỗi (10 pmol/µL), 4 µL khuôn cDNA, 2 µL DMSO (dimethyl sulfoxide) và 17 µL nước không có nuclease. Chu trình nhiệt PCR bao gồm 1 chu kỳ ở 98°C/30 giây, 35 chu kỳ ở [98°C/10 giây, 60-64°C/30 giây, 72°C/3 phút (điều chỉnh tùy phản ứng)], 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 (Mỹ).

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit *GeneAll Combo GP* theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tạo dòng vào plasmid pCR-XL-2-TOPO để lưu trữ toàn bộ chuỗi gen và gửi đi giải trình tự tại 1stBase theo phương pháp “lao mồi” từng đoạn (primer walking). Trình tự nucleotide các chuỗi được sắp xếp lồng vào nhau để có trình tự đầy đủ toàn bộ gen.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hiệu giá vi rút qua 95 đời tiếp truyền chủng cường độc

Chủng cường độc gốc được tiếp truyền trên tế bào MARC-145 để thu nhận các chủng vi rút nhược độc. Kết quả xác định hiệu giá vi rút qua các đời tiếp truyền được trình bày trên Bảng 1. Chủng vi rút PRRSV BG81 có khả năng nhân bản tốt trong tế bào MARC-145. Ở các đời tiếp truyền đầu tiên (đến đời 10, P10), khả năng thích ứng của vi rút còn kém, biểu hiện qua thời gian gây bệnh tích CPE và hiệu giá vi rút, không quá 10^{6,0} TCID₅₀/mL. Sau đời thứ 10, thời gian xuất hiện bệnh tích sớm hơn, hiệu giá vi rút cũng cao hơn từ 10^{6,2} TCID₅₀/mL trở lên. Sau 95 đời tiếp truyền liên tục, chủng BG8 càng ngày càng thích ứng tốt trên tế bào so với chủng gốc ban đầu.

Đánh giá độc lực của các chủng vi rút qua quá trình tiếp truyền

Độc lực của các chủng vi rút thu hoạch qua các đời tiếp truyền được đánh giá thông qua các dấu hiệu lâm sàng như diễn biến thân nhiệt, khả năng vận động, hô hấp, tình trạng ăn uống, đường ruột, tỉ lệ tử vong, chỉ tiêu huyết học, lượng kháng thể trong huyết thanh...

Do điều kiện thực nghiệm giới hạn, chúng tôi chỉ kiểm tra độc lực của 4 chủng vi rút thu được ở 3 đời tiếp truyền là chủng BG850 (đời thứ 50), BG875 (đời thứ 75), BG895 (đời thứ 95) và chủng gốc BG81. Sau khi gây nhiễm vi rút, thân nhiệt các heo thí nghiệm có sự biến động rõ rệt, tăng giảm không ngừng, biểu hiện sốt không kéo dài liên tục, mà có sự ngắt quãng, biểu

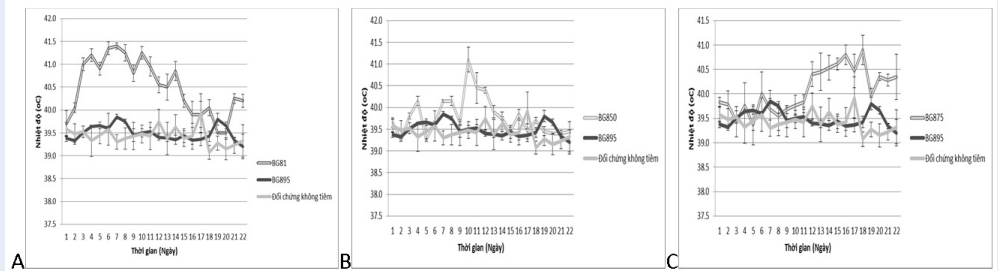
hiện rõ ở các lô bị gây nhiễm BG81, BG850 và BG875 (Bảng 2). Sau 2 ngày nhiễm, nhiệt độ cơ thể của heo trong lô BG81, BG850 và BG875 tăng lên trên 40°C; trong khi đó lô BG895 vẫn ổn định từ 39°C đến 40°C. Đỉnh sốt và thân nhiệt trung bình ở giai đoạn sốt của các heo khác nhau, trong đó ở lô BG81 có nhiệt độ trung bình là 40,5°C; với đỉnh sốt là 41,4°C cao nhất trong số 5 lô thí nghiệm. Trong vòng 21 ngày khảo sát, 100% các heo thí nghiệm trong 3 lô BG81, BG850, BG875 sau khi nhiễm đều sốt cao trên 40°C, cùng thời gian sốt kéo dài với đỉnh sốt khác nhau như Hình 1. Cùng với việc kiểm tra thân nhiệt heo thí nghiệm, các biểu hiện lâm sàng cũng được theo dõi hằng ngày. Bảng 2 cho thấy tất cả các heo ở lô BG81, BG850 đều ít vận động; về tình trạng ăn uống, có heo biếng ăn, nhưng có heo lại bỏ ăn hoàn toàn; đa số các heo có biểu hiện hô hấp yếu (thở khó, thở dốc). Trong khi đó, các heo trong lô BG875, BG895 và đối chứng hoạt động bình thường, mặc dù các heo trong lô BG875 có sốt nhẹ, nhưng chỉ kéo dài khoảng 3 ngày sau tiêm.

Sau 28 ngày tiêm vi rút, chúng tôi tiến hành công thử thách heo trong các lô thí nghiệm nêu trên với chủng cường độc TG34. Kết quả trên Bảng 2 và Hình 2 cho thấy, các heo được tiêm chủng BG895 có thân nhiệt ổn định, dao động trong khoảng 39,5-39,9°C. Trong khi đó, các heo trong 3 lô được tiêm chủng BG81, BG850, BG875 và lô đối chứng tiêm PBS có thân nhiệt đều tăng trên 40°C, cao nhất ở lô đối chứng (40,7°C). Mặc dù vậy, ở tất cả các lô thí nghiệm cũng như đối chứng, không có heo nào chết; kết quả này cũng tương đương với kết quả nghiên cứu của Tô Long Thành (2008)⁸.

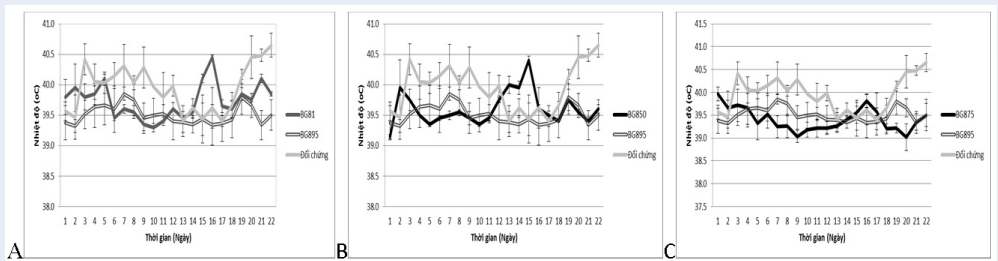
Để đảm bảo tính chính xác của thí nghiệm, trước khi gây nhiễm vi rút, chúng tôi tiến hành kiểm tra kháng thể bằng phương pháp ELISA từ các mẫu huyết thanh heo thí nghiệm, chỉ dùng những heo có kết quả kiểm tra âm tính. Sau khi gây nhiễm, tiến hành thu mẫu huyết thanh vào các thời điểm 14, 21, 28, 42 và 49 ngày sau nhiễm để đánh giá tình trạng đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể. Kết quả trên Hình 3 cho thấy, từ ngày thứ 14 sau tiêm vi rút, kháng thể kháng thể kháng vi rút PRRS mới được phát hiện trong huyết thanh ở heo thuộc lô BG875 với chỉ số IRPC ở mức thấp (29,89). Đến ngày thứ 21 sau tiêm, các heo ở lô BG875 và BG895 đều có kháng thể, lần lượt là 56,84 và 29,61. Đến ngày 28 sau tiêm, ngoại trừ lô đối chứng, các heo trong tất cả các lô thí nghiệm đều có kháng thể, cao nhất là lô BG81. Tuy nhiên, ở các lô BG81, BG850 và BG875, tình trạng đáp ứng kháng thể mặc dù tăng cao nhưng không ổn định, bị suy giảm sau 21 ngày được công cường độc. Trong khi đó, ở lô BG895, đáp ứng kháng thể được duy trì ổn định sau 21 ngày công cường độc (93,19 – 96,46).

Bảng 1: Hiệu giá vi rút của chủng BG81 qua quá trình tiếp truyền đến đời 95 (P95)

STT	Đời tiếp truyền	Thời gian	Hiệu giá vi rút	STT	Đời tiếp truyền	Thời gian	Hiệu giá vi rút
		thu hoạch	TCID₅₀/mL			thu hoạch	TCID₅₀/mL
1	P1	96 giờ	10 ^{5,2}	11	P50	72 giờ	10 ^{7,0}
2	P5	96 giờ	10 ^{5,0}	12	P55	72 giờ	10 ^{7,0}
3	P10	96 giờ	10 ^{6,0}	13	P60	72 giờ	10 ^{7,0}
4	P15	72 giờ	10 ^{5,8}	14	P65	72 giờ	10 ^{7,5}
5	P20	72 giờ	10 ^{6,0}	15	P70	72 giờ	10 ^{7,0}
6	P25	72 giờ	10 ^{6,5}	16	P75	72 giờ	10 ^{6,5}
7	P30	72 giờ	10 ^{7,0}	17	P80	72 giờ	10 ^{6,5}
8	P35	72 giờ	10 ^{7,0}	18	P85	72 giờ	10 ^{6,2}
9	P40	72 giờ	10 ^{7,0}	19	P90	72 giờ	10 ^{6,8}
10	P45	72 giờ	10 ^{7,0}	20	P95	72 giờ	10 ^{7,0}



Hình 1: Biểu đồ thân nhiệt heo sau khi tiêm vi rút ở lô thí nghiệm BG81 (A), BG850 (B), BG875 (C) so với lô thí nghiệm BG895 và lô đối chứng



Hình 2: Biểu đồ thân nhiệt heo sau khi công cường điện ở lô thí nghiệm BG81 (A), BG850 (B), BG875 (C) so với lô thí nghiệm BG895 và lô đối chứng

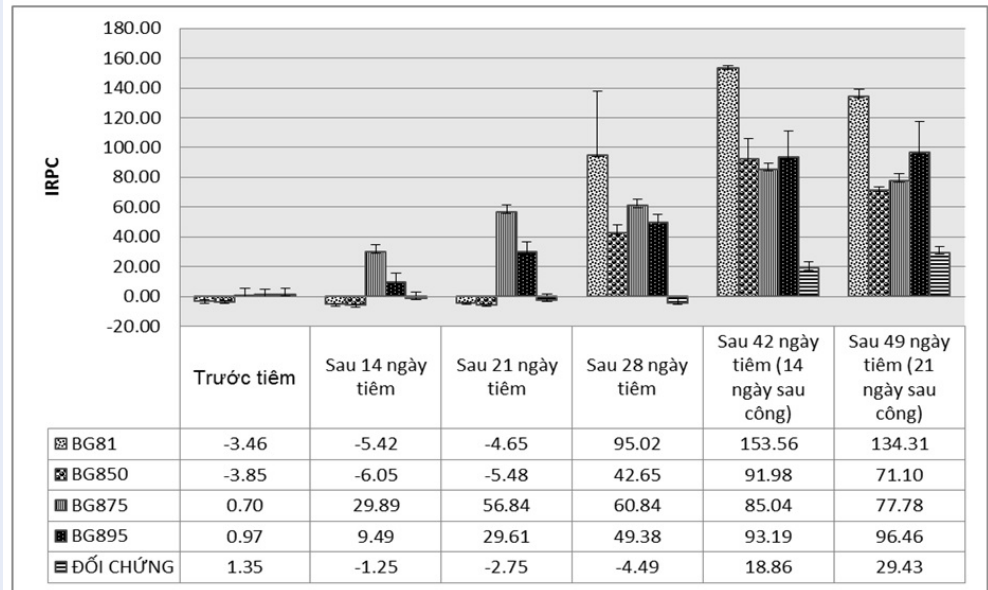
Bảng 2: Kết quả khảo sát độc lực các chủng vi rút PRRSV thông qua các triệu chứng lâm sàng khi gây nhiễm PRRS thực nghiệm

Chủng	Thân nhiệt heo sau khi tiêm	Các biểu hiện lâm sàng sau khi tiêm	Thân nhiệt heo sau khi công thử thách	Các biểu hiện lâm sàng sau khi công cường độc
BG81	Sốt cao kéo dài 2 – 12 ngày Đỉnh 41,4°C Trung bình 40,5°C	Đến ngày thứ 2, tất cả heo đều sốt cao trên 41°C, kéo dài 2 tuần. Sau đó thân nhiệt hạ, nhưng vẫn duy trì ở 40,5°C đến 3 tuần. Sau nhiễm, heo sốt cao nên ăn uống ít, vận động hạn chế.	Đỉnh 40,5°C Trung bình 39,7°C	Sau công, heo biếng ăn, vận động chậm chạp, và có xuất hiện đốm đỏ ở vành tai, thờ khỏ, mí mắt sưng.
BG850	Sốt cao kéo dài từ ngày thứ 2 – 14 Đỉnh 41,1°C Trung bình 39,8°C	Sau 3 ngày nhiễm, cả 3 heo đều sốt trên 40°C. Đỉnh điểm là ngày thứ 10 sau nhiễm. Sau 12 ngày, thân nhiệt trở lại bình thường. Heo ăn ít, vận động kém sau nhiễm.	Đỉnh 40,4°C Trung bình 39,6°C	Heo ăn uống, vận động bình thường sau công.
BG875	Đỉnh 40,9°C Trung bình 40,1°C	Các heo có biểu hiện sốt nhẹ trên 40°C trong 1-3 ngày sau nhiễm, sau đó thân nhiệt trở lại bình thường. Heo ăn uống, hoạt động bình thường	Đỉnh 40,1°C Trung bình 39,4°C	Sau công, heo vẫn ăn uống, vận động bình thường
BG895	Đỉnh 39,9°C Trung bình 39,5°C	Sau 7 ngày tiêm, thân nhiệt các heo đều ổn định từ 39 đến 39,9°C. Tất cả các heo đều ăn uống, hoạt động bình thường	Đỉnh 39,9°C Trung bình 39,5°C	Tất cả các heo đều ăn uống mạnh khỏe, hoạt động bình thường
Đối chứng	Đỉnh 39,9°C Trung bình 39,4°C	Tất cả các heo đều ăn uống, hoạt động bình thường	Sốt cao kéo dài, từ ngày 2 – 11 Đỉnh 40,7°C Trung bình 39,9°C	Ngày thứ 3 sau công, heo bắt đầu có biểu hiện sốt, đến ngày thứ 4, heo bỏ ăn, kém vận động. Ngày thứ 7 thì toàn thân nổi đỏ, mí mắt sưng, hô hấp khó, cơ quan sinh dục sưng to.

Phân tích biến đổi nucleotide và amino acid của các chủng vi rút qua quá trình tiếp truyền

Hệ gen của 5 chủng BG81, BG825, BG850, BG875 và BG895 đều có độ dài 15.321 bp (không tính số lượng adenine trong chuỗi poly-A). Như vậy, trong quá trình tiếp truyền đến 95 đời, chủng BG81 không có đột biến thêm vào hay bớt đi làm ảnh hưởng đến độ dài toàn bộ hệ gen của vi rút. Trong khi đó, ở một số chủng cường độc của Trung Quốc, trong quá trình tiếp truyền trở thành nhược độc làm vắc-xin,

đã có sự đột biến xóa đi 32 amino acid trong phân đoạn protein Nsp2⁷. Tuy nhiên, về thành phần nucleotide và amino acid, giữa các đời tiếp truyền BG81, BG25, BG50, BG875 và BG895 đã có các biến đổi ở một số vị trí trong đó có một số làm thay đổi amino acid. Biến đổi cụ thể về nucleotide và amino acid của 9 khung đọc mở (ORF) ở các chủng tiếp truyền được trình bày trên Bảng 3. Ở ORF1a, đến đời tiếp truyền 50 (chủng BG850) đã có 8 vị trí đột biến, duy trì tiếp đến đời thứ 95 (chủng BG895), nhưng không làm thay đổi amino acid. Tuy nhiên, sau đời 50, đã có thêm 4 vị trí xảy ra đột biến trong khoảng đời tiếp



Hình 3: Biểu đồ đáp ứng kháng thể heo sau khi tiêm vi rút và công cường độc

truyền 50-95. Trong đó, đột biến C>A ở vị trí nucleotide 502/ORF1a làm thay đổi amino acid ở vị trí 168 (P₁₆₈T, proline thành threonine) và đột biến T>C ở vị trí nucleotide 5611/ORF1a đã làm thay đổi amino acid ở vị trí 1871 (Y₁₈₇₁H, tyrosine thành histidine). Ở ORF1b, có 3 vị trí xảy ra đột biến sớm (trước đời 50) và 2 vị trí đột biến muộn (trong đời 50-95). Tuy xuất hiện sớm, nhưng hai đột biến sớm đều làm thay đổi amino acid, cụ thể G>A ở vị trí nucleotide 953/ORF1b làm thay đổi amino acid ở vị trí 318 (R₃₁₈Q, arginine thành glutamine) và C>A (3092/ORF1b) làm thay đổi amino acid ở vị trí 1031 (T₁₀₃₁N, threonine thành asparagine).

Vùng gen mã hóa protein cấu trúc từ ORF2 đến ORF7 đã được giải mã ở tất cả 5 chủng tiếp truyền từ chủng gốc BG81 (BG81-BG825-BG850-BG875-BG895), nên chúng tôi có điều kiện để xem xét cụ thể diễn biến đột biến xảy ra từng giai đoạn của 20-25 đời truyền kế tiếp nhau. ORF2a có tất cả 4 đột biến nucleotide, trong đó 1 đột biến muộn sau đời 75, 1 đột biến sau đời 50 và 2 đột biến sớm, trước đời 25. Trong số đó, chỉ duy nhất một đột biến làm thay đổi amino acid ở vị trí 56 (A₅₆S/(GP2), alanine thành serine) trước đời thứ 25. ORF2b có tất cả 3 đột biến nucleotide làm thay đổi 2 amino acid. Đó là một đột biến A>T (144/ORF2b) sau đời 50 làm thay đổi amino acid ở vị trí 48 (L₄₈F, leucine thành phenylalanine) và một đột biến sớm G>T (161/ORF2b) trước đời 25 làm thay đổi amino acid ở vị trí 54 (C₅₄F, cysteine thành phenylalanine). Thay đổi L₄₈F cũng

được tìm thấy ở trong các chủng vắc-xin nhược độc thương mại của Trung Quốc, đó là vắc-xin chủng JXA1R và HuN4-F112⁶. Ngoài đột biến A₅₆S trên GP2 trước đời 25, ta còn thấy xảy ra các đột biến: C₅₄F/(E), H₇₉Y/(GP3), F₁₄₃L/(GP3), T₂₂₅A/(GP3); D₄₃G/(GP4); Y₁₀₆C/(GP5). Tuy nhiên, sau đời 75, chỉ có 3 đột biến xảy ra muộn, gồm L₄₈F/(E), Q₁₉₆R/(GP5) và K₂₈N/(N). Trái lại, trên protein M do ORF6 mã hóa không xảy ra đột biến amino acid mặc dù cũng có 1 đột biến nucleotide.

Một số đột biến amino acid có thể có mức độ ảnh hưởng nhất định đến chức năng của polypeptide, đó là các thay đổi tạo thành các amino acid như arginine (R), cysteine (C), chẳng hạn Y₁₀₆C/(GP5) và Q₁₉₆R/(GP5), sẽ tạo nên điểm cắt của protease giải phóng oligopeptide siêu kháng nguyên về phương diện miễn dịch, hoặc các amino acid có hoạt tính cao (N: asparagine; D: aspartic acid; K: lysine), như K₂₈N/(N) được tạo ra có thể có vai trò quan trọng chịu trách nhiệm về đặc tính protein (ưa nước, kỵ nước, ái lực liên kết, cấu trúc bậc 3...) ^{4,7,9,10}. Những thay đổi thành phần amino acid trong polypeptide có thể tăng cường hoặc giảm bớt chức năng sinh học của chúng.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã xác định độ dài toàn bộ của bộ gen ở các chủng BG81, BG850 và BG895 là 15.321bp không sai khác giữa các chủng tiếp truyền. Độ dài bộ gen như nhau qua các chủng tiếp truyền đến đời 95 chứng tỏ trong hệ gen không xảy ra đột biến mất đoạn.

Độ dài của 5'UTR, 3'UTR, của từng gen (ORF1ab, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6 và ORF7) và các gen mã hóa Nsp1-12 trong ORF1ab cũng không thay đổi so với đại đa số các chủng vi rút PRRS thường gặp. Giống như qui luật đột biến ở các chủng tiếp truyền ở Trung Quốc và Mỹ, vùng gen không cấu trúc (ORF1ab) và vùng gen nền (ORF6-7) có đột biến ít hơn so với vùng gen cấu trúc chứa các gen kháng nguyên và độc lực (ORF2, ORF3, 4, 5). Đột biến nhiều nhất và quan trọng nhất xảy ra ở GP3 và GP5, còn ít nhất vẫn là ở protein M và N. Vị trí amino acid thay đổi trong các polypeptide của vi rút PRRS (từ chủng BG81 đến chủng BG895) có khả năng ảnh hưởng đến đặc điểm sinh học và tính sinh miễn dịch ở các chủng. Đó là các thay đổi tạo thành các amino acid như arginine (R), cysteine (C) sẽ tạo nên điểm cắt của protease giải phóng oligopeptide siêu kháng nguyên về phương diện miễn dịch, hoặc các amino acid có hoạt tính cao quyết định đặc tính protein. Với kết quả phân tích đặc điểm sinh học phân tử của các chủng qua các đời tiếp truyền, chúng tôi nhận thấy chủng nhược độc BG895 vẫn giữ nguyên tính kháng nguyên nên có thể gây đáp ứng miễn dịch trên heo, mặc dù không còn khả năng gây bệnh, phù hợp để thử nghiệm làm vắc-xin gây miễn dịch chống bệnh tai xanh tại Việt Nam.

Bảng 3: Vị trí nucleotide và amino acid thay đổi trong các polypeptide của vi rút PRRS (từ BG81 đến BG895)

Khung đọc mở	Tổng số (nt) aa	Vị trí nt thay đổi trong ORF	BG 81	BG 825	BG 850	BG 875	BG 895	Vị trí amino acid thay đổi BG81>(825)>850 >(875)>895	Ghi chú
ORF1a	7422 nt 2473aa	447	C		T		T		12 vị trí thay đổi nt; 02 thay đổi aa
		502	C		C		A	168: P>P>T	
		723	C		T		T		
		1381	A		C		C		
		1624	G		G		C		
		1704	T		T		A		
		1830	C		T		T		
		2187	T		C		C		
		4830	C		T		T		
		5611	T		T		C	1871: Y>Y>H	
		5871	T		C		C		
ORF1b	4383 nt 1460 aa	7302	G		T		T		05 vị trí thay đổi nt; 02 thay đổi aa
		57	T		T		C		
		953	G		A		A	318: R>Q>Q	
		2211	A		A		G		
ORF2a	771 nt	3092	C		A		A	1031: T>N>N	04 vị trí thay đổi nt; 01 thay đổi aa
		3567	C		T		T		
		30	G	G	G	G	A		
		149	A	A	A	T	T		
ORF2b	222 nt 73 aa	166	G	T	T	T	T	56: A>S>S>S>S	03 vị trí thay đổi nt; 02 thay đổi aa
		352	A	G	G	G	G		
		25	G	G	G	G	A		
		144	A	A	A	T	T	48: L>L>L>F>F	
ORF3	765 nt 254 aa	161	G	T	T	T	T	54: C>F>F>F>F	06 vị trí thay đổi nt; 03 thay đổi aa
		235	C	T	T	T	T	79: H>Y>Y>Y>Y	
		277	A	G	G	G	G		

Continued on next page

Table 3 continued

		427	T	C	C	C	C	143: F>L>L>L>L	
		429	C	T	T	T	T		
		494	T	T	A	A	A		
		673	A	G	G	G	G	225: T>A>A>A>A	
ORF4	537 nt	128	A	G	G	G	G	43: D>G>G>G>G	03 vị trí thay đổi nt; 01 thay đổi aa
	178 aa	271	C	C	C	T	T		
		528	G	T	T	T	T		
ORF5	603 nt	144	T	T	C	C	C		03 vị trí thay đổi nt; 02 thay đổi aa
	300 aa	317	A	G	G	G	G	106: Y>C>C>C>C	
		587	A	A	A	A	G	196: Q>Q>Q>Q>R	
ORF6	525 nt	19	A	G	G	G	G		01 vị trí thay đổi nt; không thay đổi aa
	174 aa								
ORF7	372 nt	84	G	G	G	G	T	28: K>K>K>K>N	01 vị trí thay đổi nt; 01 thay đổi aa
	123 aa								
Tổng số							38 nt	14 aa	38 vị trí thay đổi nt; 14 thay đổi aa

VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU TRÊN ĐỘNG VẬT

Đề tài được cấp giấy chấp thuận (cho phép) của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu trên động vật của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM (ACUCUS)

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

aa: amino acid (A: Alanine, C: Cysteine, D: aspartic acid, F: phenylalanine, G: glycine, H: Histidine, K: Lysine, L: Leucine, N: asparagine, P: Proline, Q: Glutamine, R: Arginine, S: Serine, T: Threonine, Y: Tyrosine)

AAHL: Australian Animal Health Laboratory

cDNA: complement Deoxyribonucleic acid

dNTP: Deoxyribonucleotide triphosphate

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay

GP: Glycoprotein

MARC: African green monkey kidney cell line

M: Membrane

N: Nucleocapsid

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

ORF: Open reading frame

P: Passage (P95: Passage 95)

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Polymerase chain reaction

PRRS: Porcine reproductive and respiratory syndrome

RNA: Ribonucleic acid

RT – PCR: Reverse transcription – polymerase chain reaction

T25: Tissue culture flask 25 cm².

TCID₅₀: 50% tissue culture infectious dose.

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.

Lê Thanh Hòa hỗ trợ xử lý các dữ liệu trình tự.

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

1. Meng XJ. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol.* 2000;74(4):309–329. Available from: [doi:10.1016/S0378-1135\(00\)00196-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00196-6).
2. Meulenber JJ, Petersen den Besten A, Kluyver E, van Nieuwstadt A, Wensvoort G, Moormann RJ. Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol.* 1997;55(1-4):197–202. Available from: [doi:10.1016/S0378-1135\(96\)01335-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01335-1).
3. 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. PMID: 19339125. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.003>.
4. 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. PMID: 23408525. Available from: <https://doi.org/10.1128/CVI.00672-12>.
5. Kappes M, Faaberg K. PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virol.* 2015;p. 479–480–475–486. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.012>.
6. An TQ, Tian ZJ, Zhou YJ, Xiao Y, Peng JM, Chend 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. PMID: 21111544. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.001>.
7. 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;2014:810523. PMID: 25009824. Available from: <https://doi.org/10.1155/2014/810523>.
8. Thành TL, Long NV, et al. Kết quả chẩn đoán và nghiên cứu virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp (PRRS) trên lợn ở Việt Nam từ tháng 3/2007 đến tháng 5/2008. *Khoa học kỹ thuật thú y.* 2008;XV(5):6–13.
9. Balka G, Wang X, Olasz F, Bálint Á, Kiss I, Bányai K, Rusvai M, Stádejek T, Marthaler D, Murtaugh MP, Zádori Z. Full genome sequence analysis of a wild, non-MLV-related type 2 Hungarian PRRSV variant isolated in Europe. *Virus Res.* 2015;200:1–8. PMID: 25616050. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.014>.
10. 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 vi rút isolated in Vietnam. *Microbiol Immunol.* 2013;57(7):518–526. PMID: 23650891. Available from: <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12067>.

Analyzing genetic mutations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains by serial passages in cell line from field wild strain

Bui Anh Thy^{1,2,*}, Le Thanh Hoa³, Tran Xuan Hanh¹, Tran Linh Thuoc²



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

ABSTRACT

In this study, we compared the genetic mutation and virulence of the attenuated PRRSV strains obtained by 95 serial passages in Marc-145 cells with the parental virulent strain (designated as BG81) isolated in Vietnam. Results showed that there were marked changes in virulence: pigs inoculated with BG81 exhibited high fever ($\geq 41^{\circ}\text{C}$), which lasted for 12 days, and presented typical clinical symptoms of PRRSV; otherwise, pigs inoculated with BG895 (from passage 95), maintained mean rectal temperature from $39,5^{\circ}\text{C}$ to $39,9^{\circ}\text{C}$, did not develop any significant clinical symptoms. Whole genomes of the attenuated strains were significantly different, but their sequence lengths were conserved, i.e., 15,321 nucleotides. The attenuated strain from passage 95 (BG895) contained 38 nucleotide substitutions that resulted in 14 amino acid changes. Most of these changes (about 65%) occurred before passage 50. The 14 amino acid changes were distributed in Nsp1, Nsp4, Nsp9, Nsp10, GP2, E, GP3, GP4, GP5 and N. Specially, there were two single substitutes within a codon in ORF3, corresponding to parallel mutation at position F143L. However, structural protein (M) and eight non-structural proteins (Nsp2, Nsp3, Nsp5, Nsp6, Nsp7, Nsp8, Nsp11 and Nsp12) among the 19 PRRSV proteins, remained conserved, without any mutations and supposed for consideration as irrelative to the attenuation process. It is interesting that in the gene coding for the smallest structural protein (E protein), there was the highest mutation rate among all of the structural genes analyzed, and genetically, seemed to be a highly variable region. These changes may provide the molecular bases for the observation of the attenuated phenotype in pigs. Thus, our variation results obtained between the attenuated BG895 and the parental virulent BG81 strains provide appropriate molecular data for potential use to test and control the masterseed strain in production of a PRRSV vaccine in Vietnam.

Key words: attenuated strain, blue ear disease, PRRS, porcine reproductive and respiratory syndrome, vaccine

¹Veterinary Research Centre – NAVETCO National Veterinary Joint Stock Company

²University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

³Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

Correspondence

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

University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

Email: anhty.bui@gmail.com

History

- Received: 19-5-2020
- Accepted: 24-11-2020
- Published: 02-12-2020

DOI : 10.32508/stdjns.v4i4.914



Copyright

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



Cite this article : Thy B A, Hoa L T, Hanh T X, Thuoc T L. Analyzing genetic mutations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains by serial passages in cell line from field wild strain. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(4):857-867.