

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lưu Minh Đức

**NGHIÊN CỨU GIẢI MÃ VÀ PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ
VIRUS PEDV GÂY BỆNH TIÊU CHẢY CẤP Ở LỢN
NĂM 2023 TẠI TỈNH HƯNG YÊN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2024

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lưu Minh Đức

**NGHIÊN CỨU GIẢI MÃ VÀ PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ
VIRUS PEDV GÂY BỆNH TIÊU CHẢY CẤP Ở LỢN
NĂM 2023 TẠI TỈNH HƯNG YÊN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC
Ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

TS. Đoàn Thị Thanh Hương

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả



Lưu Minh Đức

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới TS. Đoàn Thị Thanh Hương – Trưởng phòng Miễn dịch học, Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Nhờ sự chỉ dẫn tận tình, hỗ trợ quý báu và khích lệ của cô trong suốt quá trình thực hiện luận án, tôi đã có thể hoàn thành nghiên cứu này.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành tới toàn thể cán bộ Phòng Miễn dịch học – Viện Công nghệ sinh học. Sự giúp đỡ nhiệt tình và hướng dẫn cụ thể của các anh chị trong suốt thời gian qua đã góp phần quan trọng vào thành công của luận án này.

Xin được bày tỏ lòng biết ơn tới Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ cùng Ban Chủ nhiệm Khoa Công nghệ Sinh học, đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu tại trường.

Cuối cùng, tôi xin chân thành cảm ơn gia đình, đặc biệt là bố mẹ, cùng những người thân yêu và bạn bè, những người luôn đồng hành, động viên tôi trong suốt hành trình học tập và thực hiện khóa luận này.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 11 tháng 11 năm 2024



Lưu Minh Đức

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT	vii
DANH MỤC HÌNH	viii
DANH MỤC BẢNG	ix
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. Tổng quan về bệnh tiêu chảy cấp ở lợn và virus gây bệnh	4
1.1.1. Phân loại virus gây bệnh	5
1.1.2. Hình thái cấu trúc và bộ gen của virus PEDV	5
1.1.3. Tính ổn định của virus	8
1.1.4. Lây truyền PEDV	8
1.1.5. Cơ chế nhân lên của virus	9
1.1.6. Triệu chứng, bệnh tích	9
1.1.6.1 Triệu chứng	9
1.1.6.2. Bệnh tích	9
1.2 Chẩn đoán và phòng bệnh do PEDV	10
1.2.1. Chẩn đoán lâm sàng	10
1.2.2. Chẩn đoán phòng thí nghiệm	10
1.2.3. Vệ sinh phòng bệnh	11
1.2.4. Phòng bệnh bằng vaccine	11
1.3. Tình hình nghiên cứu PEDV trên thế giới và Việt Nam	12
1.3.1. Tình hình nghiên cứu PEDV trên thế giới	12
1.3.2. Tình hình nghiên cứu PEDV tại Việt Nam	13
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
2.1. Đối tượng, vật liệu và phạm vi và thời gian nghiên cứu	15
2.1.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu	15
2.1.2. Phạm vi nghiên cứu	15
2.1.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	15
2.1.4. Các dụng cụ và thiết bị	15
2.1.5. Hóa chất	15
2.2. Phương pháp nghiên cứu	16
2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu	16

2.2.2. Phương pháp thu thập mẫu bệnh phẩm	16
2.2.3. Phương pháp tách chiết RNA tổng số	17
2.2.4. Phương pháp chuyển đổi cDNA	17
2.2.5. Phương pháp PCR	17
2.3.6. Phương pháp điện di kiểm tra sản phẩm PCR	19
2.3.7. Phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR	19
2.3.8. Dòng hóa DNA sản phẩm PCR	20
2.3.9. Phương pháp giải trình tự	23
2.3.10. Phương pháp xử lý số liệu	23
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	24
3.1. Kết quả sàng lọc mẫu bệnh phẩm có chứa PEDV	24
3.2. Kết quả thu nhận và giải trình tự gen S1	25
3.3. Kết quả phân tích phát sinh loài dựa trên gen S1	27
3.4. Kết quả thu nhận toàn bộ hệ gen	30
3.5. Kết quả phân tích đặc điểm phân tử gen S1	32
3.6. Kết quả so sánh về mức độ đồng nhất về nucleotide và amino acid gen S	42
3.7. Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc dựa trên gen S hoàn chỉnh và toàn bộ hệ gen	44
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	48
TÀI LIỆU THAM KHẢO	49
PHỤ LỤC	56

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
PED	Porcine Epidemic Diarrhea	Bệnh tiêu chảy trên lợn
PEDV	Porcine Epidemic Diarrhea Virus	Virus gây bệnh tiêu chảy trên lợn
E	Envelope	Vỏ
M	Membrane	Màng
N	Nucleocapsid	Nucleocapsid
S	Spike	Gai
ORF	Open Reading Frame	Khung đọc mở
ORF3	Open Reading Frame 3	Khung đọc mở thứ 3
IFN - β	interferon- β	interferon- β
RIG-I	retinoic acid-inducible gene-I	gen có thể cảm ứng axit retinoic I
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Dimethyl Sulfoxide
RBD	receptor binding domain	Miền liên kết thụ thể
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic acid	Ethylene Diamine Tetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay	Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome	Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn
NTD	N-terminal domain	Miền đầu N
CTD	C-terminal domain	Miền đầu C
COE	CO26K-equivalent	Vùng CO26K tương đương
pAPN	Porcine aminopeptidase N	aminopeptidase N ở lợn
PBS	Phosphate Buffer Saline	Phosphate Buffer Saline
ERGI	ER-Golgi	Lưới nội chất – Bộ máy Golgi
RNP	Ribonucleoprotein	Ribonucleoprotein
RNA	Ribonucleic Acid	Acid Ribonucleic
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction	Phản ứng sao chép chuỗi polymerase ngược
IHC	Immunohistochemistry	Hóa mô miễn dịch
TGE	Transmissible Gastroenteritis	Bệnh viêm dạ dày ruột truyền nhiễm trên lợn
nt	Nucleotide	Nucleotide

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Sơ đồ cấu trúc và tổ chức bộ gen của PEDV	7
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu.....	17
Hình 2.2. Cấu trúc vector pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen)	23
Hình 3.1. Kết quả điện di phát hiện PEDV bằng mồi chẩn đoán PEDVF-PEDVR	27
Hình 3.2. Kết quả điện di sản phẩm PCR thu toàn bộ gen S1 của 2 chủng PEDV nghiên cứu	28
Hình 3.3. Kết quả BLAST dựa trên gen S1 của chủng PEDVHY1.....	30
Hình 3.4. Cây phả hệ xác định mối quan hệ nguồn gốc của các chủng PEDV dựa trên trình tự nucleotide của tiểu phần gen S1	33
Hình 3.5. Cây phả hệ xác định mối quan hệ nguồn gốc của các chủng PEDV dựa trên trình tự nucleotide của gen S.....	49
Hình 3.6. Cây phả hệ xác định mối quan hệ nguồn gốc của các chủng PEDV dựa trên trình tự toàn bộ hệ gen.....	50

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Bộ mồi dùng cho phản ứng PCR.....	16
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR.....	18
Bảng 2.3. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR	19
Bảng 2.4. Danh sách các mồi được sử dụng trong phản ứng giải trình tự.....	21
Bảng 2.5. Thành phần của phản ứng nối sản phẩm PCR vào vector pCR® 2.1- TOPO	23
Bảng 2.6. Thành phần của phản ứng cắt DNA tái tổ hợp bằng enzyme giới hạn <i>EcoRI</i>	26
Bảng 3.1. Hệ gen chủng PEDVHY1	30
Bảng 3.2. Danh sách các chủng PEDV của Việt Nam và thế giới sử dụng trong nghiên cứu.....	34
Bảng 3.3. Vị trí sai khác amino acid thuộc protein S1 giữa các chủng PEDV đại diện các genotype chủng nghiên cứu	37
Bảng 3.4. Tỷ lệ (%) đồng nhất về thành phần nucleotide và amino acid toàn bộ gen S của PEDVHY1 với các chủng tham khảo khác của Việt Nam và thế giới.....	35

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Chăn nuôi lợn ở Việt Nam đóng vai trò hết sức quan trọng trong hệ thống chăn nuôi. Ngành này góp phần tạo ra nguồn thực phẩm phục vụ cả đời sống nhân dân lẫn xuất khẩu ra thị trường thế giới. Tuy nhiên, sự tăng trưởng trong chăn nuôi lợn ở nước ta còn thấp, hiệu quả kinh tế chưa cao so với các quốc gia lớn trên thế giới như Trung Quốc, Mỹ... Kết quả này một phần do quy trình kỹ thuật chăn nuôi còn hạn chế. Ngoài ra, lợn cũng có một nhược điểm quan trọng là chúng rất dễ mắc bệnh, làm ảnh hưởng lớn đến năng suất chăn nuôi. Một trong số những tác nhân phổ biến, gây bệnh nghiêm trọng trên lợn được biết đến là virus PEDV.

Virus tiêu chảy cấp ở lợn PEDV (Porcine Epidemic Diarrhea Virus) là tác nhân gây bệnh tiêu chảy cấp trên lợn (PED – Porcine Epidemic Diarrhea). Đây là bệnh đường ruột phổ biến ở lợn với tốc độ lây lan nhanh, lợn mắc bệnh thường có các biểu hiện nôn mửa, tiêu chảy cấp tính, mất nước nghiêm trọng dẫn đến tử vong. Bệnh PED xuất hiện ở các trang trại lợn trên toàn thế giới với tỷ lệ tử vong của lợn dưới một tuần tuổi đặc biệt cao, tỷ lệ tử vong của lợn trưởng thành thấp hơn [1]. PEDV lần đầu tiên được phát hiện ở Châu Âu, chủng virus đầu tiên được đặt tên là CV777 phân lập vào năm 1976 từ lợn trong một đợt bùng phát ở Bỉ [2]. Hiện nay, PEDV đã trở thành mối đe dọa lớn đối với ngành chăn nuôi heo trên toàn thế giới. Sự bùng phát của PEDV không chỉ gây tổn thất kinh tế nghiêm trọng mà còn đe dọa đến an ninh lương thực và sức khỏe cộng đồng.

PEDV là một loại RNA virus chuỗi đơn dương, thuộc phân chi *Pedecovirus*, chi *Alphacoronavirus* trong họ *Coronaviridae* thuộc bộ *Nidovirales* [3]. Bộ gen virus có chiều dài khoảng 28 kb và chứa bảy khung đọc mở (ORF), được sắp xếp theo thứ tự 5'UTR-ORF1a-ORF1b-S-ORF3-E-M-N-3'UTR và đuôi poly (A) [4, 5]. Trong số các protein của virus, protein S là glycoprotein trên bề mặt virus, có vai trò quan trọng trong việc tạo ra các kháng thể trung hòa và tương tác với các thụ thể tế bào trong vật chủ. Protein S này liên tục biến đổi để giúp PEDV lẩn trốn khỏi hệ miễn dịch, thích nghi với những thay đổi của môi trường; và các biến thể thường xuyên của nó dẫn đến sự xuất hiện của nhiều chủng độc lực khác nhau. Hiện tại, các nhà nghiên cứu đã phân loại PEDV thành nhóm gen cổ điển G1 và nhóm gen độc lực G2 [6]. Nhóm gen G1 và G2 tiếp tục tiến hóa riêng biệt và cuối cùng hình thành năm phân nhóm (G1a, G1b, G2a, G2b và G2c). Phân nhóm G1a chủ yếu bao gồm CV777, DR13, SM98 cổ điển và các chủng xuất hiện sớm khác, phân bố ở Châu Âu và Châu Á [7]. Các chủng G1b chủ yếu có nguồn gốc từ các nước Châu Á, đặc biệt là Trung Quốc [8], và các chủng vaccine giảm độc lực thích nghi trên tế bào. So với nhóm G1a có độc lực nhất định, các chủng G1b ít độc lực hơn và nhiều chủng giảm độc lực đã được xác định là

chủng dành cho sản xuất vaccine giảm độc lực, còn gọi là "các chủng vaccine S-Indel". Các chủng điển hình nhất trong phân nhóm G1 bao gồm chủng xuất hiện sớm JS-2004-2 và các chủng vaccine, chẳng hạn như CV777 giảm độc lực, DR13 giảm độc lực, chủng SD-M và chủng AH-M hiện đang lưu hành ở Trung Quốc [9-12]. Kể từ năm 2010, các chủng nhóm gen G2 đã chiếm ưu thế trên toàn cầu, đặc biệt là ở Trung Quốc. Điều này đã làm phức tạp thêm việc kiểm soát PEDV trên thực địa ở nhiều nước.

PED được ghi nhận lần đầu tiên tại Việt Nam vào năm 2008. Bệnh này khởi phát ở các tỉnh phía Nam mà không rõ nguồn gốc lây nhiễm. Ngay sau khi xuất hiện, PED nhanh chóng lan rộng ra các khu vực chăn nuôi lợn trọng điểm trên khắp cả nước, bao gồm miền Bắc, miền Trung và miền Nam. Hiện nay, bệnh đã trở thành một vấn đề lưu hành, gây ra các đợt bùng phát rải rác. Các chủng PEDV được phân lập tại Việt Nam trong khoảng thời gian từ 2009 đến 2010 từ các trang trại ở các tỉnh phía Nam cho thấy sự tương đồng cao với các chủng được phát hiện ở Trung Quốc [13]. Trong khi các chủng PEDV phân lập từ năm 2012-2017 đã có nhiều biến đổi, tạo ra các biến chủng mới, chủ yếu thuộc genotype G2. Mặc dù đã được tiêm vaccine nhưng dịch bệnh vẫn xảy ra.

Trong bối cảnh dịch PEDV vẫn đang tiếp diễn và có nguy cơ lan rộng, việc nghiên cứu dịch tễ học phân tử của PEDV là cần thiết để phát triển các chiến lược phòng chống hiệu quả. Để phòng chống bệnh hiệu quả việc cấp thiết cần là phải nghiên cứu và sử dụng loại vaccine hiệu quả, phù hợp với chủng virus đang lưu hành. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu trước đây chỉ thực hiện trên một đoạn gen S và gen M, chỉ có một công bố giải trình tự toàn bộ hệ gen năm 2015. Do đó, cần có dữ liệu giải trình tự bộ gen hoàn chỉnh của PEDV tại Việt Nam tại thời điểm hiện tại để xác định được chủng virus đang lưu hành, sự đa dạng di truyền, đồng thời thiết lập bộ gen tham chiếu cho các phân lập PEDV tại Việt Nam. Nghiên cứu này không chỉ nhằm mục đích hiểu rõ hơn về sự tiến hóa và di truyền của virus, mà còn đóng góp vào việc phát triển các biện pháp kiểm soát dịch bệnh, giảm thiểu tổn thất kinh tế cho ngành chăn nuôi heo.

Xuất phát từ thực tế đó, tôi đã thực hiện đề tài "**Nghiên cứu giải mã và phân tích đặc điểm phân tử virus PEDV gây bệnh tiêu chảy cấp ở lợn năm 2023 tại tỉnh Hưng Yên**" nhằm mục tiêu xác định được chủng virus gây bệnh thuộc genotype nào, đồng thời làm rõ các đặc điểm phân tử của chủng virus PEDV đang lưu hành, cung cấp cơ sở khoa học cho các biện pháp phòng ngừa và kiểm soát dịch bệnh hiệu quả.

2. Mục đích nghiên cứu

- Giải trình tự được toàn bộ hệ gen chủng virus PEDV thu nhận năm 2023 tại tỉnh Hưng Yên.
- Phân tích, ghi nhận lại các đặc điểm phân tử, vị trí đột biến trên gen S/S1 của virus.
- Phân tích phả nguồn gốc của chủng PEDV nghiên cứu.

3. Nội dung nghiên cứu

- Giải trình tự gen S1 của chủng virus PEDV nghiên cứu.
- Giải trình tự hệ gen hoàn chỉnh của chủng virus PEDV nghiên cứu.
- Phân tích đặc điểm phân tử vùng gen S, đặc biệt là vùng gen S1.
- Phân tích phả hệ nguồn gốc của chủng PEDV nghiên cứu với các chủng PEDV của Việt Nam và thế giới dựa trên dữ liệu nucleotide của gen S1, gen S và toàn bộ hệ gen.

4. Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài

PEDV là một loại virus thuộc họ *Coronaviridae*, gây ra bệnh tiêu chảy cấp ở lợn với tỷ lệ tử vong cao, đặc biệt ở lợn con. PEDV đã có mặt tại nhiều quốc gia trên thế giới và tiếp tục tiến hóa với nhiều chủng khác nhau. Việc hiểu rõ hơn về các biến thể của virus, đặc biệt là gene S (spike protein), giúp phát hiện sự xuất hiện của các biến chủng mới và đề xuất biện pháp phòng chống hiệu quả.

Phân tích đặc tính phân tử, nghiên cứu phát sinh chủng loại, đặc biệt là phân tích hệ gene hoặc các phần của hệ gene (ví dụ như gene S), giúp xác định mối quan hệ phát sinh loài giữa các chủng virus từ các vùng địa lý khác nhau, từ đó theo dõi được sự lây lan và tiến hóa của virus. Các phương pháp như RT-PCR và giải trình tự gene đã được ứng dụng rộng rãi để phát hiện và phân loại PEDV.

Ngoài ra, việc hiểu rõ sự phân bố và biến đổi di truyền của các chủng PEDV còn giúp xây dựng chiến lược vaccine phòng bệnh phù hợp, đặc biệt ở các khu vực có nguy cơ cao như Việt Nam. Việc nghiên cứu và kiểm soát PEDV không chỉ bảo vệ sức khỏe đàn lợn mà còn giảm thiểu thiệt hại kinh tế cho người chăn nuôi.

5. Những đóng góp của luận văn

Kết quả nghiên cứu sẽ cung cấp dữ liệu khoa học về toàn bộ hệ gen virus PEDV lưu hành tại Việt Nam năm 2023, đặc điểm phân tử gen S1 và phả hệ nguồn gốc của virus PEDV làm cơ sở khoa học để có thể lựa chọn vaccine phòng bệnh PED đạt hiệu quả nhất. Ngoài ra, dữ liệu thu được trong quá trình thực hiện đề tài góp phần cung cấp nguồn gen và thông tin cho những nghiên cứu tiếp theo giúp cho việc chẩn đoán, theo dõi, đánh giá mức độ gây bệnh của PEDV. Từ đó có thể lựa chọn các chủng vaccine phù hợp và có hiệu quả hơn trong công tác phòng bệnh.

NỘI DUNG

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về bệnh tiêu chảy cấp ở lợn và virus gây bệnh

Bệnh tiêu chảy cấp ở lợn (Porcine Epidemic Diarrhea - PED) là một bệnh lý đường ruột có tốc độ lây lan nhanh chóng. Lợn bị nhiễm bệnh thường có các triệu chứng như nôn mửa, tiêu chảy cấp tính, mất nước nghiêm trọng, và trong nhiều trường hợp, bệnh có thể dẫn đến tử vong. Tỷ lệ tử vong ở lợn con dưới một tuần tuổi đặc biệt cao, trong khi tỷ lệ tử vong ở lợn trưởng thành thấp hơn đáng kể [1].

Bệnh PED lần đầu tiên xuất hiện tại Anh vào năm 1971, sau đó nhanh chóng lan ra các khu vực châu Âu bao gồm Thụy Sĩ, Đức, Pháp, Hà Lan và Bulgaria [2, 14]. Chủng PEDV đầu tiên được đặt tên là CV777 phân lập vào năm 1976 từ lợn trong một đợt bùng phát ở Bỉ [1]. Tại châu Á, PED lần đầu tiên được ghi nhận ở Nhật Bản vào năm 1982 [15] sau đó là hàng loạt các quốc gia lớn như Trung Quốc năm 1986 [16], Ấn Độ năm 2003 và Thái Lan năm 2007 [17]. Do tỷ lệ tử vong thấp nên ban đầu PEDV không nhận được sự chú ý trên toàn cầu. Tuy nhiên với sự bùng phát của các chủng PEDV độc lực cao tại Bắc Mỹ vào năm 2013 đã đưa virus PEDV trở thành một trong những mối đe dọa nghiêm trọng nhất đối với ngành chăn nuôi lợn trên toàn cầu. Vào mùa xuân năm 2013, virus này bắt đầu bùng phát tại Hoa Kỳ khiến 8 triệu con lợn mới sinh tử vong chỉ trong vòng một năm [18]. Chủng gây bệnh này, được gọi là "US-like strain", nhanh chóng lan sang các quốc gia lân cận như Canada, Mexico và Colombia. Với khả năng lây lan mạnh mẽ, các chủng PEDV thuộc nhóm "US-like strain" đã nhanh chóng xuất hiện tại Hàn Quốc vào cuối năm 2013 [19], tại Đức vào tháng 5 năm 2014 [20], tại Đài Loan vào cuối năm 2013 [21], và tại Nhật Bản vào tháng 10 năm 2013 cũng như trong suốt giai đoạn 2013-2014 [22]. Những chủng này nhanh chóng gây ra làn sóng dịch bệnh tại nhiều quốc gia châu Á, bao gồm Nhật Bản, Trung Quốc, Việt Nam và Thái Lan [17, 22-24]. Các chủng PEDV mới nổi, cùng với những biến thể di truyền của chúng, đã kích hoạt một làn sóng dịch tễ học PED thứ hai trên toàn cầu [23, 25]. Kết quả là, PEDV được chia thành hai dòng chính: dòng "cổ điển" (classic) xuất hiện từ những năm 1970 và dòng "độc lực" (virulent) nổi lên sau năm 2010. Những dòng này có sự thay đổi đáng kể trong vùng S và các khu vực khác của bộ gen [23].

PEDV được báo cáo tại Việt Nam lần đầu tiên vào năm 2008, các nghiên cứu chỉ ra rằng chủng PEDV gây nên đợt bùng phát dịch bệnh có mối quan hệ họ hàng với các chủng PEDV có nguồn gốc Trung Quốc [13]. Cho đến nay, hầu hết các khu vực chăn nuôi lợn tại cả nước đều ghi nhận sự có mặt của PEDV. Các nghiên cứu về trình tự gen S của các chủng PEDV được phân lập trong giai đoạn 2012–2016 cho

thấy các chủng này đã trải qua những thay đổi đáng kể [26, 27], và điều này có thể giải thích cho sự suy giảm hiệu quả của vaccine. Hơn nữa, PEDV vẫn tiếp tục chiếm ưu thế trong các quần thể lợn, ngay cả trong các đàn đã được tiêm vaccine và đã trở thành một loại bệnh đặc hữu dai dẳng trên toàn quốc [28, 29].

Bệnh tiêu chảy do virus PEDV có thể ảnh hưởng đến lợn ở mọi độ tuổi, và trong nhiều trường hợp, tỷ lệ lợn nhiễm bệnh có thể đạt tới 100%. Các động vật bị ảnh hưởng biểu hiện tình trạng tiêu chảy cấp tính và cuối cùng đã hồi phục chủ yếu ở những con trưởng thành. Tỷ lệ tử vong trung bình ở lợn con là khoảng 50%, tuy nhiên, trong một số trường hợp nghiêm trọng, tỷ lệ này có thể lên đến 100% [30]. Cụ thể, nếu lợn con nhiễm bệnh trong khoảng 0 - 5 ngày tuổi, tỷ lệ tử vong có thể đạt 100%. Đối với lợn con từ 6 - 7 ngày tuổi, tỷ lệ tử vong giảm xuống còn khoảng 50%, và nếu mắc bệnh sau 7 ngày tuổi, tỷ lệ tử vong ước tính là khoảng 30%.

1.1.1. Phân loại virus gây bệnh

Order (Bộ): *Nidovirales*

Family (Họ): *Coronaviridae*

Subfamilies (Phân họ): *Coronaviridae*

Genus (Chi): *Alphacoronavirus*

Subgenus (Phân chi): *Pedecovirus*

Species (Loài): *Porcine Epidemic Diarrhea Virus* [3].

Để xác định mối quan hệ giữa các chủng PEDV, các phân tích về cây phả hệ (phylogenetic tree) và đặc điểm di truyền được tiến hành dựa trên các trình tự gen S, M, và ORF3 đôi khi cả gen E. Mặc dù chỉ có 1 serotype duy nhất, nhưng các nhà nghiên cứu đã phân loại PEDV thành các genotype khác nhau. Nhóm G1 (G1, classical) và nhóm độc lực/ biến thể G2 (field epidemic/ pandemic)[6]. Các nhóm G1 và G2 tiếp tục tiến hóa riêng biệt và cuối cùng hình thành năm genotype gồm G1a, G1b, G2a, G2b và G2c.

1.1.2. Hình thái cấu trúc và bộ gen của virus PEDV

PEDV là một loại virus RNA sợi đơn, có vỏ bọc, có hình cầu hoặc đa hình với đường kính 95–190 nm, bao gồm các phần nhô ra hình gậy, hình tam giác có chiều dài 18–23 nm [2]. Bộ gen PEDV dài khoảng 28 kb, bao gồm 7 khung đọc mở (ORF), được sắp xếp theo thứ tự 5'UTR-ORF1a-ORF1b-S-ORF3-E-M-N-3'UTR và đuôi poly (A) [4, 5, 30].

ORF1a, ORF1b chiếm khoảng 2/3 bộ gen, ở vị trí gần 5' và mã hóa 16 protein phi cấu trúc (NSPs). Protein S và ORF3 đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh bệnh của bệnh.

Gen ORF3 nằm giữa gen S và E có vai trò mã hóa các protein phụ có chức năng ít được biết đến. Các nghiên cứu về gen ORF3 ghi nhận việc xóa 17 axit amin trong ORF3 của các chủng vaccine PEDV, gen ORF3 có thể được sử dụng như một dấu hiệu phân tử để phân biệt giữa các chủng vaccine PEDV và các chủng không phải vaccine và để phân tích dịch tễ học phân tử của PEDV [10]. Ngoài ra, việc biến đổi gen ORF3 thông qua việc trong quá trình cấy chuyển nhiều lần trên tế bào sẽ khiến độc lực virus giảm [10].

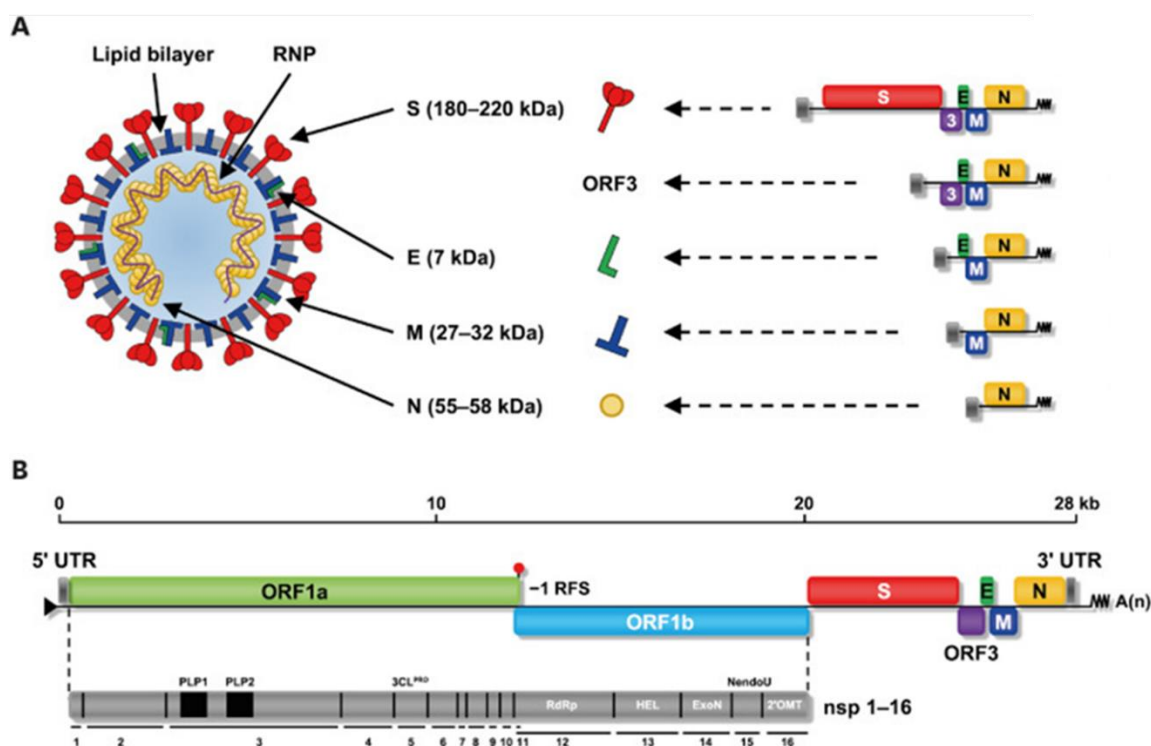
Gen E mã hóa cho protein E giúp hình thành và giải phóng vỏ virus [5]. Protein E chủ yếu nằm ở lưới nội chất, với một lượng nhỏ trong nhân có cấu trúc phân tử được chia thành ba vùng, bao gồm một vùng ưa nước đầu amin ngắn, một miền xuyên màng xoắn alpha dài khoảng 25 aa và một vùng đầu carboxyl dài. Bên cạnh đó, protein E cũng có thể giúp trốn tránh khả năng miễn dịch bẩm sinh của vật chủ bằng cách ức chế tín hiệu trung gian qua RIG-I [31].

Gen M góp phần vào quá trình lắp ráp nucleocapsid của virus và màng của cấu trúc bên trong cũng như kích thích tiết interferon [32]. Gen M của Coronavirus có khả năng bảo tồn hơn gen S [33]. Protein M là thành phần vỏ lớn nhất của virus PEDV, glycoprotein cấu trúc màng với một đầu tận cùng gắn amin ngắn phía ngoài virus và một đầu tận cùng gắn carboxy ở bên trong [34]. Protein M cũng có thể tương tác với ORF3 và cùng với protein N, tham gia vào quá trình lắp ráp và nảy chồi của các hạt vi-rút [35]. Ngoài ra, protein M ức chế phản ứng miễn dịch của vật chủ bằng cách tạo ra kháng thể trung hòa hoặc ức chế hoạt động của interferon- β (IFN- β) [36], đồng thời gây ra sự ngừng chu kỳ tế bào ở pha S thông qua con đường cyclin A trong quá trình nhiễm vi-rút [37].

Protein N tương tác với RNA bộ gen của virus và sau đó hình thành nucleocapsid xoắn ốc trong quá trình lắp ráp hạt virus [38]. Ngoài ra, protein N tham gia phiên mã bộ gen virus, hình thành lõi virus và đóng gói RNA virus [35]. Trong quá trình nhiễm vi-rút, protein N có thể điều chỉnh chu kỳ tế bào và ức chế phản ứng miễn dịch bằng yếu tố điều hòa IFN 3 [39]. Đáng chú ý, một nghiên cứu chỉ ra rằng protein N của PEDV có thể giúp tăng cường sự sao chép của các loại vi-rút có liên quan chặt chẽ với PEDV, chẳng hạn như vi-rút gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV), trong khi nó không có tác dụng đối với các loại vi-rút không liên quan [40].

Gen S mã hóa glycoprotein, được chia thành miền S1 và S2, protein S1 rất cần thiết để nhận biết các thụ thể tế bào, liên kết và độc lực, trong khi protein S2 chủ yếu làm trung gian cho sự hợp nhất màng trong quá trình nhiễm virus [41] [42]. Protein S có 1.383–1.386 axit amin (aa) và dựa trên tính đồng nhất của nó với protein S của

các loại coronavirus khác, bao gồm hai tiểu đơn vị: S1 từ aa 1–789 và S2 từ aa 790–1383. S1 có thể được chia nhỏ hơn nữa thành năm miền cấu trúc: S10 (aa 1–219), S1A (aa 435–485), S1B (aa 510–640), S1C và S1D (aa 638–789) [41, 43, 44]. Vùng S1 chịu trách nhiệm nhận diện virus-vật chủ và liên kết thụ thể, trong khi vùng S2 chịu trách nhiệm hợp nhất màng và nội hóa. Các đột biến xảy ra ở gen S có thể dẫn đến những thay đổi axit amin ảnh hưởng đến khả năng gây bệnh, khả năng lây truyền, đặc tính kháng nguyên và phản ứng với kháng thể trung hòa [45]. Vùng S1 hoạt động như một miền liên kết thụ thể (RBD) và có khả năng nhận diện nhiều loại thụ thể vật chủ, bao gồm protein và đường, có thể kích hoạt phản ứng dịch thể và tế bào. Trong khi đó, tiểu đơn vị S2 làm trung gian cho quá trình hợp nhất màng, dẫn đến việc giải phóng RNA virus vào tế bào vật chủ [22, 45].



Hình 1.1. Sơ đồ cấu trúc và tổ chức bộ gen của PEDV [46]

S1 chứa hai miền chính: miền đầu N (S1-NTD) và miền đầu C (S1-CTD) [41]. Protein S1 chứa vùng CO26K-equivalent (COE) được bảo tồn cao (aa 499–638) [47] bên trong S1-CTD, có thể gây ra sản xuất kháng thể trung hòa và có khả năng đóng vai trò là chất sinh miễn dịch trong vaccine chống lại PEDV [48]. Do đó, tiểu đơn vị S1 rất quan trọng trong việc bảo vệ vật chủ chống lại PEDV.

Một nghiên cứu đã chỉ ra rằng, trong vùng COE của protein S, có một chèn đoạn axit amin 4-aa 612QQSI615. Sự thay đổi này đã tạo nên một xoắn alpha bổ

sung, từ đó làm thay đổi các đặc điểm tương tác của kháng thể trung hòa, ảnh hưởng đến khả năng bảo vệ của hệ miễn dịch đối với các biến thể mới của virus PEDV [45].

1.1.3. Tính ổn định của virus

PEDV tồn tại ổn định ở môi trường có pH từ 5 đến 9 khi ở nhiệt độ 4°C và trong khoảng pH 6,5 – 7,5 ở nhiệt độ 37°C. Nếu môi trường có pH nhỏ hơn 4 hoặc lớn hơn 9, virus sẽ bị bất hoạt. Trong môi trường nuôi cấy, PEDV sẽ mất khả năng lây nhiễm khi tiếp xúc với nhiệt độ 60°C trong 30 phút, nhưng lại ổn định ở nhiệt độ 50°C. Virus này nhạy cảm với các chất như ether và chloroform, đồng thời không có khả năng ngưng kết hồng cầu của các loài. Ngoài ra, PEDV có thể bị vô hiệu hóa bởi nhiều loại chất khử trùng như cresol, NaOH 2%, formol 1%, natri cacbonat (4% ở dạng khan hoặc 10% ở dạng tinh thể với 0,1% chất tẩy rửa), các chất tẩy rửa ion và không ion, iodophor mạnh (1%) trong môi trường acid phosphoric và chloroform [49]. Về sức đề kháng với nhiệt độ, PEDV được ghi nhận không bền với nhiệt độ, nhanh chóng bị bất hoạt tại nhiệt độ phòng sau 2 ngày. Tuy nhiên, virus tồn tại trong khoảng 2 tuần ở nhiệt độ 4°C [50].

1.1.4. Lây truyền PEDV

Lây truyền qua tiếp xúc trực tiếp và gián tiếp là con đường lây truyền chính của PEDV giữa lợn. PEDV lây truyền giữa lợn ở các độ tuổi khác nhau và thường lây nhiễm đầu tiên cho lợn thịt, sau đó virus lây lan sang lợn nái mang thai trong chuồng đẻ, và lợn nái bị nhiễm cận lâm sàng sau đó lây truyền PEDV cho lợn con bú, cuối cùng gây ra dịch bệnh tử vong cao ở lợn con.

PEDV lây lan theo một số cách khác nhau trong quá trình nhiễm trùng, và một trong những cách phổ biến nhất là đường phân-miệng, tức là lây truyền trực tiếp hoặc gián tiếp qua phân lợn, chất nôn và các chất gây ô nhiễm khác do quá trình chăn nuôi tạo ra [51]. PEDV có thể bị nhiễm thông qua con đường lây truyền từ phân lợn vào khoang mũi, được gọi là đường phân-mũi [52]. Ngoài ra, PEDV cũng có thể được truyền theo chiều dọc sang lợn con thông qua sữa lợn nái [53]. Nghiên cứu trước đó từng ghi nhận sự hiện diện của PEDV có thể được phát hiện trong tinh dịch của lợn đực bị nhiễm PEDV và có thể quan sát thấy sự phát tán vi-rút kéo dài trong phần giàu tinh trùng, chứng tỏ rằng PEDV có thể lây truyền qua đường tinh dịch qua tinh dịch lợn đực [54]. Một nghiên cứu gần đây cho thấy PEDV bị nhiễm biểu mô mũi có thể được truyền đến tế bào lympho T CD3+ thông qua các khớp thần kinh, và cuối cùng đến niêm mạc ruột thông qua tuần hoàn máu, dẫn đến nhiễm trùng đường ruột [55], đây là cơ chế lây nhiễm PEDV từ khoang mũi đến biểu mô ruột, và cũng là bằng chứng quan trọng cho sự lây truyền qua khí dung. Ngoài lây nhiễm từ lợn sang lợn, sự lây truyền PEDV cũng có thể xảy ra thông qua tiếp xúc với thiết bị bị ô nhiễm

[56], phương tiện bị ô nhiễm được sử dụng để vận chuyển động vật [57] hoặc nhân viên trại [55, 56].

1.1.5. Cơ chế nhân lên của virus

PEDV nhân lên hiệu quả trong các tế bào biểu mô nhung mao ruột non hoặc tế bào ruột non ở lợn. Aminopeptidase N ở lợn (pAPN) chủ yếu được biểu hiện trên bề mặt các tế bào biểu mô của ruột non đã được xác định là thụ thể tế bào của PEDV [58, 59]. Sự thâm nhập và tháo vỏ xảy ra sau khi protein S trung gian hợp nhất lớp vỏ virus với màng huyết tương. Sau khi tháo rời, bộ gen virus được giải phóng vào tế bào chất và được dịch mã để tạo ra các bản sao ppla và pplab. Các polyprotein này được cắt bằng phương pháp thủy phân protein thành 16 nsps bao gồm phức hợp sao chép và phiên mã (RTC) đầu tiên tham gia vào quá trình tổng hợp RNA sợi âm bằng cách sử dụng RNA bộ gen. Cả sợi âm có độ dài đầy đủ và sợi âm có độ dài sg đều được sản xuất và sử dụng để tổng hợp RNA bộ gen có độ dài đầy đủ và mRNA sg. Mỗi mRNA sg được dịch mã để chỉ tạo ra protein được mã hóa bởi ORF 5'-most của mRNA sg. Các protein S, E và M của lớp vỏ được đưa vào lưới nội chất và neo trong bộ máy Golgi. Protein N tương tác với RNA bộ gen mới được tổng hợp để tạo thành phức hợp RNP xoắn ốc. Virus con được lắp ráp bằng cách nảy chồi của RNP đã hình thành trước tại khoang trung gian ER-Golgi (ERGIC) và sau đó được giải phóng bằng sự hợp nhất giống như xuất bào của các túi chứa virion có thành nhân với màng tế bào chất [32].

1.1.6. Triệu chứng, bệnh tích

1.1.6.1 Triệu chứng

Triệu chứng lâm sàng chính được quan sát thấy ở tất cả lợn bị mắc tiêu chảy cấp do virus PEDV bao gồm tiêu chảy với phân lỏng, có màu vàng hoặc xám, kèm theo tình trạng lợn mệt mỏi, nằm tụ lại thành nhóm hoặc áp bụng vào mẹ (100%). Tỷ lệ cao các trường hợp ghi nhận thấy lợn gầy sút nhanh, một số con có biểu hiện uống nhiều nước và thân nhiệt hạ thấp. Ngoài ra, triệu chứng nôn mửa cũng xuất hiện ở nhiều trường hợp. Sự tiêu chảy do PEDV dẫn đến là hậu quả của việc giảm hấp thu và tiêu hóa, do tế bào biểu mô ruột bị tổn thương nặng nề, làm rối loạn chức năng và giảm khả năng sản xuất các enzyme tiêu hóa trên bề mặt vi nhung mao [60, 61].

1.1.6.2. Bệnh tích

Các bệnh tích đại thể quan sát được ở lợn mắc tiêu chảy cấp do virus PEDV bao gồm nhiều dấu hiệu rõ ràng và đặc trưng. Cơ thể lợn chết thường có biểu hiện gầy khô, da nhăn nheo, và phân màu vàng dính tại vùng hậu môn (100%). Dạ dày lợn có xu hướng căng phồng, chứa sữa chưa tiêu hóa cùng với chất lợn cợn màu vàng và

hiều bọt (100%). Thành ruột mỏng hơn bình thường, trong khi một số cơ quan nội tạng như hạch màng treo ruột có dấu hiệu xuất huyết (73,91%), gan phình to (58,69%), túi mật căng (65,21%), và phổi sung tụ huyết (71,74%). Ngoài ra, hiện tượng nhung mao ruột non ngắn lại và hợp nhất khi kiểm tra bằng kính hiển vi cũng được ghi nhận. Bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch (IHC), kháng nguyên PEDV đã được phát hiện trong các tế bào biểu mô ở hồng tràng của những nhung mao bị teo [61].

1.2 Chẩn đoán và phòng bệnh do PEDV

Để chẩn đoán chính xác bệnh tiêu chảy cấp tính trên lợn do virus PEDV gây ra, cần thực hiện các phương pháp chẩn đoán chuyên sâu nhằm kiểm soát và ngăn chặn dịch bệnh. Các phương pháp chẩn đoán PEDV được chia thành hai nhóm chính: lâm sàng và phòng thí nghiệm.

1.2.1. Chẩn đoán lâm sàng

Chẩn đoán lâm sàng chủ yếu dựa trên việc quan sát các triệu chứng tiêu biểu của bệnh tiêu chảy cấp tính trên lợn, chẳng hạn như tiêu chảy nước, nôn mửa, mất nước, và giảm cân nhanh chóng. Đối với lợn con dưới một tuần tuổi, tỷ lệ tử vong có thể lên tới 100%. Tuy nhiên, vì các triệu chứng của PEDV có thể giống với những bệnh đường ruột khác như Transmissible Gastroenteritis (TGE), nên việc chẩn đoán lâm sàng chỉ là bước sơ bộ và cần được xác minh thông qua các xét nghiệm trong phòng thí nghiệm [60].

1.2.2. Chẩn đoán phòng thí nghiệm

Các phương pháp xét nghiệm trong phòng thí nghiệm được áp dụng để xác định sự hiện diện của PEDV trong các mẫu bệnh phẩm như phân, mô ruột, hoặc dịch tiết. Những phương pháp thường được sử dụng bao gồm:

RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) RT-PCR là phương pháp hàng đầu để chẩn đoán PEDV, nhờ khả năng khuếch đại các đoạn gen đặc hiệu của virus từ các mẫu bệnh phẩm. Phương pháp này rất nhạy và chính xác, cho phép phát hiện PEDV ngay cả khi lượng virus trong mẫu rất thấp. Đây là phương pháp tiêu chuẩn trong việc xác nhận các trường hợp nhiễm PEDV.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ELISA được sử dụng để phát hiện kháng thể chống lại PEDV trong huyết thanh của lợn, giúp theo dõi quá trình nhiễm virus hoặc đáp ứng sau tiêm vaccine. Dù ELISA là công cụ hỗ trợ quan trọng, nó thường được sử dụng như một phương pháp bổ sung trong chẩn đoán, đặc biệt khi xác định bệnh ở giai đoạn cấp tính.

Miễn dịch huỳnh quang (Immunofluorescence Assay - IFA) IFA là phương pháp sử dụng kháng thể gắn huỳnh quang để phát hiện sự hiện diện của PEDV trong tế bào nhiễm. Khi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, tế bào nhiễm sẽ phát sáng

nếu có sự hiện diện của virus. Dù có giá trị trong việc xác định vị trí của virus trong mô, phương pháp này yêu cầu kỹ thuật cao và ít được sử dụng rộng rãi như RT-PCR.

Phân lập virus Phương pháp phân lập virus từ mẫu bệnh phẩm trên các dòng tế bào nhạy cảm là một kỹ thuật truyền thống và quan trọng trong việc chẩn đoán và nghiên cứu PEDV. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi nhiều thời gian và điều kiện nuôi cấy đặc biệt, nên thường không được sử dụng phổ biến trong chẩn đoán lâm sàng hàng ngày [60].

1.2.3. Vệ sinh phòng bệnh

Cần áp dụng các biện pháp an toàn sinh học như kiểm soát ra vào trang trại, hạn chế việc ra vào trang trại của người và phương tiện, đồng thời đảm bảo tất cả đều tuân thủ nghiêm ngặt các biện pháp khử trùng. Phương tiện vận chuyển thức ăn, lợn hoặc chất thải phải được làm sạch và khử trùng trước khi vào khu vực chăn nuôi. PEDV được biết là vẫn tồn tại trên các phương tiện vận chuyển lợn, đặc biệt là nếu không được khử trùng sau khi sử dụng để vận chuyển [57]. Duy trì chuồng trại sạch sẽ, khô thoáng và vệ sinh thường xuyên. Việc thay lót chuồng và khử trùng bằng các hóa chất phù hợp là cần thiết để loại bỏ mầm bệnh. Sử dụng nguồn thức ăn và nước uống đảm bảo vệ sinh, không bị nhiễm bẩn. Tránh sử dụng nguồn thức ăn không rõ ràng hoặc có nguy cơ bị nhiễm PEDV. Các báo cáo trước đây ghi nhận có sự lây nhiễm chéo giữa các phương tiện vận chuyển của trang trại tại các lò mổ [57, 62].

Việc tiêm vaccine cho lợn nái mang thai và lợn con theo lịch trình khuyến cáo là quan trọng để tạo miễn dịch chống lại virus PEDV, từ đó tăng cường khả năng phòng bệnh cho đàn lợn. Trong trường hợp có nguy cơ dịch bùng phát hoặc khi phát hiện lợn nhiễm bệnh, cần tiến hành tiêm phòng bổ sung để tăng cường khả năng bảo vệ cho đàn lợn [60].

Lợn mới đưa vào trại phải được cách ly và theo dõi sức khỏe trong ít nhất 2 tuần trước khi nhập đàn chính thức, nhằm ngăn ngừa nguy cơ mang mầm bệnh vào trang trại. Lợn bị nhiễm hoặc nghi ngờ nhiễm PEDV cần được cách ly và điều trị riêng biệt để ngăn chặn sự lây lan. Phải thường xuyên kiểm tra và giám sát sức khỏe của đàn lợn để kịp thời phát hiện và xử lý các triệu chứng của PEDV, đồng thời tiến hành các xét nghiệm định kỳ để phát hiện sự hiện diện của virus PEDV, kể cả khi chưa có biểu hiện lâm sàng rõ ràng, nhằm đảm bảo kiểm soát dịch bệnh hiệu quả. Nếu có lợn chết, cần xử lý xác lợn theo quy trình khử trùng nghiêm ngặt để tránh phát tán virus ra môi trường [60].

1.2.4. Phòng bệnh bằng vaccine

Để kiểm soát hiệu quả PEDV, việc cho lợn nái tiếp xúc có chủ ý với nội tạng xay nhuyễn từ lợn bị nhiễm PEDV đã được đề xuất từ lâu. Tuy nhiên, những tác dụng

phụ của phương pháp này, bao gồm tỷ lệ thai bị khô tăng cao và nguy cơ lây nhiễm các mầm bệnh khác, đã được ghi nhận [63].

Tại Việt Nam, một số loại vaccine đã được sử dụng để phòng chống virus tiêu chảy cấp ở lợn (PEDV), bao gồm cả vaccine giảm độc lực và vaccine bất hoạt. Những vaccine này được tiêm cho lợn nái và lợn con nhằm giảm thiểu sự lây lan và tác động của dịch bệnh. Bao gồm vaccine “Avac PED live” nhập khẩu (công ty AVAC, Việt Nam) và vaccine “PED Pig VAC” nhược độc nhập khẩu từ Daesung Microbiological Labs (Hàn Quốc), cả hai đều được sản xuất bằng chủng G1a-SM98 của Hàn Quốc (GU937797/ KOR/SM98/2010). Ngoài ra, vaccine bất hoạt cũng đã được sử dụng, bao gồm cả “Provac TP” kết hợp, được sản xuất bằng chủng SM98P gây bệnh tiêu chảy dịch ở lợn và chủng 175L gây bệnh viêm dạ dày ruột truyền nhiễm, nhập khẩu từ KOMIPHARM International Co., Ltd (Hàn Quốc), cũng như vaccine PED trong nước do công ty HANVET sản xuất tại Việt Nam (<http://hanvet.com.vn/vn/Scripts/default.asp> chủng vaccine giảm độc lực CV777 (JN599150), AJ1102 (MK584552) và Korea/SM98-5P/1998 (KJ857455), được sử dụng trên toàn cầu để tiêm chủng, ngoài những thay đổi aa được tìm thấy trong các nghiên cứu trước đây [22, 26]. Tuy nhiên, các chủng phân lập gây ra dịch bệnh ở Việt Nam hiện nay là các biến thể thuộc genotype G2 mới trong khi các loại vaccine hiện có được sản xuất từ các chủng phân lập thuộc nhóm các biến thể cổ điển (G1a), khác biệt về mặt di truyền so với các biến thể mới. Do đó, vaccine được sản xuất từ các biến thể cổ điển có thể không cung cấp giải pháp đầy đủ để kiểm soát thành công PEDV tại Việt Nam. Một loại vaccine được sản xuất từ PEDV biến thể mới kết hợp với đường dùng thích hợp có thể được sử dụng để kiểm soát thành công PED tại Việt Nam.

1.3. Tình hình nghiên cứu PEDV trên thế giới và Việt Nam

1.3.1. Tình hình nghiên cứu PEDV trên thế giới

Trên thế giới, do bệnh tiêu chảy trên lợn gây thiệt hại kinh tế đáng kể nên các nghiên cứu về PEDV được quan tâm nghiên cứu tại nhiều quốc gia. Tại Trung Quốc, nghiên cứu của Wang và cộng sự năm 2021, đã phân tích 186 trình tự gen S và trình tự toàn bộ hệ gen của các chủng PEDV phân lập trong giai đoạn 2007–2019. Kết quả ghi nhận các biến thể của protein G2 S có thể làm tổn hại hoặc thậm chí loại bỏ hoạt động trung hòa của kháng thể do protein GI S tạo ra trong các chủng vaccine truyền thống được sử dụng ở Trung Quốc. Đáng chú ý, kết quả nghiên cứu đã ghi nhận được các hiện tượng tái tổ hợp gen tiềm năng ở 28 vị trí trong gen S, dẫn đến sự xuất hiện của nhánh tiến hóa mới là phân nhóm G1c tại Trung Quốc [64].

Tại Thái Lan, Cheun-Arom và cộng sự năm 2016 đã phân lập được hai chủng PEDV là CBR1/2014 và EAS1/2014. Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc dựa trên dữ liệu hệ gen hoàn chỉnh cho thấy chủng CBR1/2014 thuộc cùng nhóm với các biến thể đại dịch; và chủng EAS1/2014 thuộc cùng nhóm với các chủng CV777, LZC và SM98 là biến thể cổ điển [17].

Kết quả của Huang và cộng sự (2013) khi phân tích so sánh vùng NTD của nhóm G1 và G2 ngta phát hiện ra có nhiều sự thay đổi axit amin, đồng thời vùng xóa thứ hai (DR2-deletion region 2) có mức độ thay đổi kháng nguyên cao hơn vùng xóa thứ nhất DR1 (deletion region 1) và có vị trí glycosyl hóa liên kết N riêng biệt, mặc dù DR1 có độ biến thiên trình tự cao hơn. Chính vì vậy, vaccine PEDV giảm độc lực dựa trên các chủng G1a có nguồn gốc từ CV777 hoặc các chủng G1b có nguồn gốc từ DR13 có thể ít liên quan về mặt kháng nguyên hơn với các chủng PEDV G2 mới xuất hiện có biến thể kháng nguyên trong NTD [65].

1.3.2. Tình hình nghiên cứu PEDV tại Việt Nam

Tại Việt Nam, các báo cáo trong những năm gần đây tập trung vào chẩn đoán, phân lập, nghiên cứu tình hình dịch tễ, triệu chứng và đặc điểm phân tử của các chủng PEDV đang lưu hành.

Nghiên cứu của Lương Trọng Thắng và cộng sự năm 2020 ghi lại các triệu chứng đặc trưng của PEDV gồm lợn tiêu chảy, phân chuyển sang màu vàng hoặc xám, ủ rũ mệt mỏi, nằm dòn đống hoặc nằm trên bụng mẹ (100%); 82,6% cho thấy cân nặng giảm nhanh, lợn tiêu thụ nhiều nước được quan sát thấy khoảng 60,86%, thân nhiệt giảm và nôn mửa đều quan sát thấy ở 54,34% lợn bệnh. Các bệnh tích đại thể được ghi lại gồm xác lợn chết khô gầy, da nhẵn nheo, lớp phân màu vàng dính kết ở hậu môn được quan sát thấy ở 100% trường hợp, kiểm tra dạ dày phát hiện sữa mẹ chưa tiêu hoá, chất chứa màu vàng lợn cợn và nhiều bọt, đồng thời ghi nhận ruột có thành ruột mỏng (100%), các cơ quan lân cận như phổi, túi mật, gan đều có biểu hiện sưng và tụ huyết [61]

Mai Thị Ngân và cộng sự 2020 đã nghiên cứu và xác định các nguyên nhân chính dẫn đến sự bùng phát PEDV bao gồm: hình thức chăn nuôi lợn đẻ đến khi cai sữa khiến nguy cơ lây nhiễm PEDV cao gấp 3,35 lần so với các hệ thống chăn nuôi khác, sự xuất hiện của gà hoặc các động vật khác trong trang trại làm phương tiện lây nhiễm virus và khoảng cách từ trang trại đến lò mổ càng ngắn thì tỷ lệ lây nhiễm PEDV càng cao[28].

Văn Thị Thân và cộng sự 2020 đã thu thập tổng cộng 30 chủng PEDV từ cả ba miền bắc, trung, nam của Việt Nam. Nghiên cứu đã cung cấp thông tin về sự lưu

hành và phân bố di truyền của virus khi kết quả thu được có 28 chủng tại miền bắc và miền trung thuộc phân nhóm G2a và G2b, trong khi hai chủng còn lại từ miền nam thuộc phân nhóm G1b, các vị trí N-glycosyl hóa và đột biến quan trọng ở vùng gen kháng nguyên virus cũng được ghi nhận [26].

Trần Xuân Thạch và cộng sự (2021) đã giải trình tự toàn bộ hệ gen của chủng IBT/VN/2018 phân lập tại tỉnh Hưng Yên, đồng thời phân tích các đột biến ở gen S, N và ORF3 có thể ảnh hưởng đến tính đặc hiệu của thụ thể, tính gây bệnh của virus và khả năng trốn tránh hệ thống miễn dịch của vật chủ [66].

Gần đây nhất là nghiên cứu của Bùi Thị Thùy Dương và cộng sự (2022) đã thu thập các chủng thực địa ở các tỉnh phía Bắc gồm: Thanh Hóa, Vĩnh Phúc, Nam Định, Hưng Yên và Hải Dương. Kết quả cho thấy trong 26 chủng PEDV của Việt Nam có 16 chủng thuộc genotype G2b ($19/26 = 73,1\%$) Chúng được xếp vào một nhóm với chủng tham chiếu MK584552/CN/AJ1102(F12)/2011 và sáu chủng G2b của Việt Nam và ba chủng G2b của Trung Quốc đã được báo cáo trước đó. Chín trong số các chủng này thuộc cùng một nhánh G2b với chủng vaccine AJ1102 cổ điển, trong khi 10 chủng thuộc một cụm khác bao gồm các chủng G2b của Việt Nam phân lập từ năm 2014 đến năm 2016. Bảy chủng còn lại tập hợp thành một nhóm phụ riêng biệt ($7/26 = 26,9\%$). Không có chủng nào trong số 26 chủng từ nghiên cứu hiện tại được xếp vào cụm G2a hoặc G1c (hoặc tái tổ hợp)[67].

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu và phạm vi và thời gian nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là chủng virus PEDV phân lập từ phân và niêm mạc ruột non của lợn con bị mắc bệnh tại tỉnh Hưng Yên năm 2023.

Mẫu bệnh phẩm được mổ khám tại trang trại, thu mẫu và bảo quản lạnh trước khi chuyển đến phòng Miễn dịch học - Viện Công nghệ Sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Tại phòng thí nghiệm, mẫu bệnh phẩm được xử lý và bảo quản ở -20°C.

2.1.2. Phạm vi nghiên cứu

Thu nhận và giải trình tự toàn bộ hệ gen của chủng virus PEDV thu nhận tại tỉnh Hưng Yên.

2.1.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm thu mẫu: trang trại chăn nuôi lợn tại Hưng Yên
- Địa điểm phân tích mẫu: Phòng Miễn dịch học - Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- Thời gian thực hiện: từ tháng 2/2024 đến tháng 9/2024.

2.1.4. Các dụng cụ và thiết bị

Máy móc, dụng cụ và thiết bị dùng trong sinh học phân tử của phòng thí nghiệm của phòng Miễn dịch học - Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam bao gồm: Eppendorf các thể tích, đầu tip các loại, kẹp, phanh, kéo cắt mẫu, ống falcol, đĩa petri, cối, chày sứ... Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu bao gồm : Máy PCR (Astec (Mỹ)); Nồi hấp khử trùng (Nhật Bản); Tủ an toàn sinh học (Esco (Đức)); Máy soi gel Dolphin – DOC (Wealtec (Mỹ)); Máy vortex (Wisteg (Hàn quốc)); Máy ly tâm (Eppendorf (Đức)); Máy spin (Bio - rad (Mỹ)); Cân điện tử (Shimadzu (Nhật Bản)); Bể ổn nhiệt (Bio - rad (Mỹ)); Tủ đông lạnh sâu - 20°C, -50°C, -80°C (Sanyo (Nhật Bản)); Bể điện di (Bio - rad (Mỹ)); Lò vi sóng (Samsung (Hàn Quốc))

2.1.5. Hóa chất

Các loại hóa chất sử dụng trong nghiên cứu bao gồm : dimethyl sulfoxide (Thermo Scientific); agarose (Invitrogen (Mỹ)); TAE (BioTech (Mỹ)); ethanol 96% (Trung Quốc); 6X Loading Dye (Thermo Scientific (Mỹ)); λ DNA/HindIII (Thermo Scientific (Mỹ)); DreamTaq PCR master mix 2X; non - nuclease water (Thermo Scientific (Mỹ)); DEPC water (Ambion (Mỹ)); Ethidium bromide (Promega (Mỹ));

GeneJET gel extraction kit, GeneJET genomic DNA purification Kit, GeneJET PCR purification Kit (Thermo) Scientific).

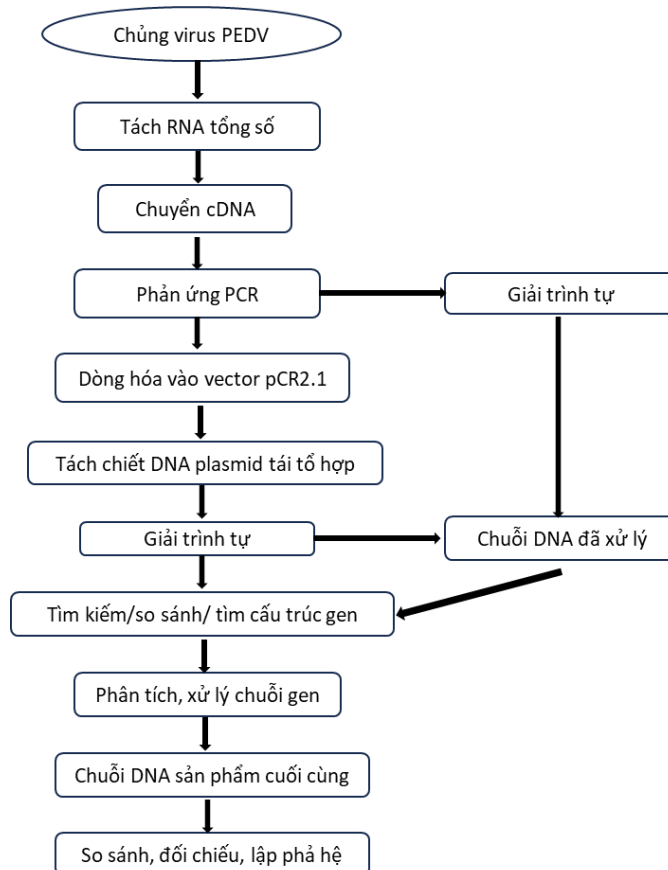
Bảng 2.1. Bộ môi tự thiết kế dùng cho phản ứng PCR

Tên môi	Trình tự (5'....3')	Độ dài (nt)	Kích thước	Chú thích
PEDVF	TTCTGAGTCACGAACAGCCA	20	651 bp	Môi chẩn đoán
PEDVR	CATATGCAGCCTGCTCTGAA	20	651 bp	Môi chẩn đoán
PEDVS1F	GCTAGTGCGTAATAATGACGCCA	23	2,4 kb	Môi thu nhận gen S1
PEDVS1R	ACAGAGCCTGTGTTGGTGTA	20	2,4 kb	Môi thu nhận gen S1

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu

Để thu nhận toàn bộ hệ gen virus PEDV chúng tôi tiến hành các thí nghiệm theo sơ đồ sau đây:



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

2.2.2. Phương pháp thu thập mẫu bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm là phân và niêm mạc ruột của lợn bệnh khoảng 2 đến 3 tuần tuổi có triệu chứng nhiễm PEDV tại trang trại thuộc tỉnh Hưng Yên. Mẫu bệnh phẩm được thu thập thông qua quá trình mổ khám tại trang trại, sau đó bảo quản lạnh trước khi chuyển đến Phòng Miễn dịch học, Viện Công nghệ Sinh học. Tại phòng thí

nghiệm, mẫu bệnh phẩm được xử lý và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng để tách chiết RNA tổng số hoặc phân lập virus.

2.2.3. Phương pháp tách chiết RNA tổng số

Sử dụng bộ kit tách RNA tổng số QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Đức).

Quy trình tách RNA tổng số được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất:

Bước 1: Bổ sung 554,5 μl Buffer AVL vào ống carrier RNA

Bước 2: Bổ sung 150 μl mẫu vào ống carrier RNA đã chuẩn bị ở bước 1.

Bước 3: Ủ nhiệt độ phòng ($15 - 25^{\circ}\text{C}$) trong 10 phút. Ly tâm để dịch không dính nắp

Bước 4: Thêm 560 μl EtOH (abs) sau đó vortex nhẹ trong 15 giây.

Bước 5: Chuyển cột ly tâm 12000 vòng/ phút. Bỏ dịch phía dưới ống hứng

Bước 6: Thêm 500 μl Wash Buffer 1. Ly tâm 12000 vòng/phút. Bỏ dịch ở ống hứng.

Bước 7: Thêm 500 μl Wash Buffer 2. Ly tâm 12000 vòng/phút. Bỏ dịch ở ống hứng.

Bước 8: Ly tâm làm khô 2 phút, chuyển cột sang ống thu

Bước 9: Bổ sung 30 μl Buffer AVE, đọt 2 phút. Ly tâm 12000 vòng/ phút

Bước 10: Bảo quản -20°C

2.2.4. Phương pháp chuyển đổi cDNA

DNA bổ sung (cDNA) được tổng hợp theo phương pháp chuyển đổi từ RNA hệ gen của virus bằng bộ kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thành phần phản ứng với tổng dung tích 20 μl gồm có: 2 μl (100 ng/ μl) RNA tổng số; 1 μl (100 picromol/ μl) mỗi hexamer; 2 μl dNTP mix (10 mM); 4 μl 5X Reaction buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT); 2 μl M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/ μL) và 1 μl RiboLock Rnase Inhibitor (20 U/ μl), nước DEPC cho vừa đủ 20 μl ; Phản ứng chuyển đổi được thực hiện: $25^{\circ}\text{C}/5$ phút, $37^{\circ}\text{C}/60$ phút và kết thúc ở $70^{\circ}\text{C}/5$ phút. Sản phẩm cDNA được bảo quản ở điều kiện -20°C cho đến khi sử dụng để thực hiện phản ứng PCR.

2.2.5. Phương pháp PCR

Trong phương pháp này chúng tôi sử dụng bộ kit “DreamTaq PCR Master Mix (2X)” (hãng ThermoFisher, Mỹ).

Tiến hành: phản ứng PCR được thực hiện với các thành phần và chu trình nhiệt trong bảng 2.2 và 2.3.

Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích
Dream taq PCR Master Mix (2X)	25 μl
DMSO	2 μl
Forward primer (mỗi xuôi)	2 μl

Reverse primer (mồi ngược)	2 μ l
Khuôn cDNA	3 μ l
H ₂ O	16 μ l
Tổng thể tích	50μl

Bảng 2.3. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

Nhiệt độ - Thời gian	Số chu kì
95°C - 5 phút	1
95°C - 30 giây	35
55°C - 30 giây	
72°C - 3 phút	
72°C - 10 phút	1
4°C - ∞	Bảo quản

Khi phản ứng kết thúc lấy 10 μ L sản phẩm điện di gel agarose 1% kiểm tra

Ghi chú: trong nghiên cứu này chúng tôi thực hiện phản ứng PCR với mạch khuôn là cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số tách chiết từ các mẫu nghiên cứu.

Bảng 2.4. Danh sách các mồi được sử dụng trong phản ứng giải trình tự [68]

STT	Tên mồi	Trình tự	Độ dài
1	186-2055-F	5'-GCGTTCGTCGCCTTCTACATAC-3'	1870
2	186-2055-R	5'-TTATAAACAGGATGTTCAATGA-3'	
3	1960-4005-F	5'-CAGTTGTTGTTGATGGACTTGC-3'	2046
4	1960-4005-R	5'-CCACTATCATTGCCTATAAAAG-3'	
5	3925-5998-F	5'-TCGAGATACTACTGCTCTCTCC-3'	2074
6	3925-5998-R	5'-TCCATCATACACCATACCAGTG-3'	
7	5922-7969-F	5'-CATTCCTAGATAATGGTAACGG-3'	2048
8	5922-7969-R	5'-ATCATAATCGCTATCACTGCTA-3'	
9	7893-9941-F	5'-TGTTTCATAGTTGCTGTTTTCTT-3'	2049
10	7893-9941-R	5'-TAAGCCACCAAGTAGAACCATT-3'	
11	9869-11925-F	5'-AGTAGTCTGTTTACGGAGAATG-3'	2057
12	9869-11925-R	5'-ATGCCATCTCCTTCTGCCTTAA-3'	
13	11845-13885-F	5'-GCGTATTGTCAAGCTCCAGAAT-3'	2041
14	11845-13885-R	5'-AAGTAAGCTCAGAGCCCTCAGA-3'	
15	13808-15857-F	5'-AACCTGGCCATTTCAATAAGGA-3'	2050
16	13808-15857-R	5'-TCTTTAGGTCCTACAACCTCAT-3'	

17	15781-17829-F	5'-ACTATCAAGGCCAAGGAGGAGA-3'	2049
18	15781-17829-R	5'-CGTATGCAGCGCACTATTGTAA-3'	
19	17759-19825-F	5'-TCAAGATTGGACCAAGTAAGAG-3'	2067
20	17759-19825-R	5'-CAGCACCATAGTTATAGAGATT-3'	
21	19750-21810-F	5'-GGTTATTCCATGCCTTCTATTT-3'	2061
22	19750-21810-R	5'-GAGGTAAAACAGCCAAGAATTT-3'	
23	21729-23770-F	5'-GCTATCCAAGTACCCTATTATTG-3'	2042
24	21729-23770-R	5'-CCCTGCGAATTAACAACCTCTT-3'	
25	23707-25755-F	5'-CTAAGGGTTTGAACACTGTGGC-3'	2049
26	23707-25755-R	5'-GATATTCCATGTGAAATTCCAG-3'	
27	25688-27848-F	5'-ATGTCTAACGGTCTATTCCCG-3'	2161
28	25688-27848-R	5'-CCACTGGCTTACCGTTGTGTGC-3'	

2.3.6. Phương pháp điện di kiểm tra sản phẩm PCR

Bước 1: Chuẩn bị gel điện di: Cân 1g agarose để chuẩn bị gel agarose 1%, sau đó thêm 100 ml dung dịch TAE 1X vào. Đun nóng hỗn hợp trong lò vi sóng cho đến khi agarose tan hoàn toàn và dung dịch trở nên trong suốt. Để dung dịch nguội đến khoảng 50°C, sau đó đổ vào khuôn gel đã chuẩn bị sẵn.

Bước 2: Đặt gel vào bể điện di: Đổ đệm TAE 1X vào bể điện di ngập bản gel.

Bước 3: Chuẩn bị mẫu: Trộn 2 µl dung dịch loading dye 6X với 10 µl mẫu. Chuyển hỗn hợp mẫu đã trộn vào giếng trên gel điện di, sử dụng 1 giếng cho marker (5 µl). Marker Lambda DNA/HindIII từ Thermo Scientific được sử dụng trong thí nghiệm.

Bước 4: Tiến hành điện di ở hiệu điện thế 110V trong khoảng 25-30 phút.

Bước 5: Nhuộm và đọc kết quả: Sau khi điện di xong, bản gel được nhuộm trong dung dịch Ethidium Bromide khoảng 10 phút, sau đó kết quả được đọc bằng máy soi gel. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%, sử dụng Lambda DNA/HindIII Marker từ Thermo để dự đoán kích thước của đoạn DNA trong khoảng từ 125 bp đến 23.130 bp.

2.3.7. Phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR

Đối với các sản phẩm PCR đơn băng: Sử dụng bộ kit "GeneJET PCR Purification" của ThermoFisher (Mỹ) để tinh sạch sản phẩm PCR:

Bước 1: Thêm đệm Binding vào sản phẩm PCR theo tỉ lệ 1:1 và trộn đều. Kiểm tra màu sắc của dung dịch, nếu dung dịch có màu vàng tức là đạt pH tối ưu. Nếu dung dịch có màu cam hoặc tím, thêm 10 µl dung dịch acetate 3M để điều chỉnh.

Bước 2: Chuyển tối đa 800 µl dung dịch từ bước 1 (hoặc bước 2) vào cột tinh sạch GeneJET và ly tâm từ 30 đến 60 giây. Loại bỏ dung dịch chảy ra từ ống thu.

Bước 3: Thêm 700 μ l đệm rửa vào cột và ly tâm từ 30 đến 60 giây. Loại bỏ dịch chảy xuống và đặt cột lại vào ống thu.

Bước 4: Ly tâm cột thêm 1 phút để loại bỏ hoàn toàn đệm rửa còn sót lại

Bước 5: Chuyển cột sang một ống thu sạch, mới (ống 1,5 ml). Thêm 50 μ l đệm Elution vào tâm màng của cột tinh sạch GeneJET và ly tâm khoảng 1 phút.

Bước 6: Bỏ cột và bảo quản ống thu chứa sản phẩm PCR đã tinh sạch ở -20°C .

Với sản phẩm PCR đa băng, sử dụng bộ GeneJET Gel Extraction kit:

Bước 1: Cắt phần gel chứa mảnh DNA bằng dao mổ sạch hoặc lưỡi dao cạo, cắt càng gần DNA càng tốt để giảm thiểu thể tích gel. Đặt miếng gel cắt được vào ống eppendorf 1,5 ml đã được cân trước và cân lại để xác định khối lượng miếng gel.

Bước 2: Thêm 1:1 thể tích đệm Binding vào ống chứa miếng gel (thể tích : khối lượng) (ví dụ: thêm 100 μ l đệm Binding cho mỗi 100 g gel agarose).

Bước 3: Ủ hỗn hợp gel ở $50 - 60^{\circ}\text{C}$ đến khi miếng gel tan hoàn toàn. Đảo ống vài phút một lần để tạo điều kiện quá trình tan gel. Vortex hỗn hợp gel trước khi chuyển vào cột. Màu vàng biểu thị pH tối ưu để gắn DNA. Nếu dung dịch màu cam hoặc tím, thêm 10 μ l natri acetate 3M, dung dịch pH 5,2 và lắc đều để màu chuyển vàng.

Bước 4: Chuyển tối đa 800 μ l dung dịch gel đã hòa tan từ bước 3 vào cột tinh sạch GeneJET. Ly tâm trong 1 phút. Bỏ dịch chảy xuống ống thu và đặt cột trở lại ống thu

Bước 5: Thêm 100 μ l đệm Binding. Ly tâm 1 phút. Bỏ dịch chảy, đặt cột lại ống thu.

Bước 6: Thêm 700 μ l Wash Buffer. Ly tâm 1 phút, bỏ dịch chảy, đặt cột lại ống thu.

Bước 7: Ly tâm cột rỗng thêm 1 phút để loại bỏ đệm rửa còn sót lại.

Bước 8: Chuyển cột vào một ống eppendorf 1,5 ml sạch. Thêm 50 μ l đệm Elution vào tâm màng cột tinh sạch. Ly tâm 1 phút.

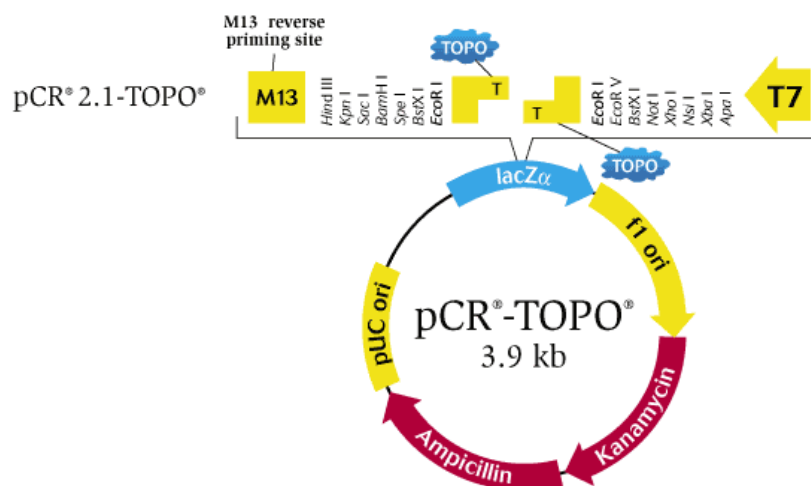
Bước 9: Bỏ cột và bảo quản DNA đã tinh sạch ở -20°C .

2.3.8. Dòng hóa DNA sản phẩm PCR

Nguyên lí của dòng hoá: là gắn nối (ligation) một đoạn DNA ngoại lai (thường là sản phẩm PCR/RT-PCR) vào trong hệ gen của một vòng DNA đã được thiết kế sẵn gọi là plasmid mang (hay vector dẫn truyền), tạo ra vector tái tổ hợp và được chuyển nạp (*transformation*) vào tế bào chủ thích ứng (thường là tế bào *E. coli* thuần chủng) tạo dòng tái tổ hợp. Sau khi chuyển nạp tiến hành nuôi cấy để nhân lên và chọn lọc vi khuẩn tái tổ hợp theo hai cơ chế: cơ chế X-gal và cơ chế kháng sinh loại trừ những vi khuẩn không tái tổ hợp, nhằm thu được số lượng lớn các bản sao DNA ngoại lai (*vector tái tổ hợp*). Tách chiết các khuẩn lạc đơn dòng để thu lượng DNA ngoại lai được nối vào vector bằng phản ứng cắt với enzyme giới hạn (restriction enzyme).

Nối sản phẩm PCR vào plasmid vector: Do sản phẩm PCR (sử dụng enzyme Taq DNA polymerase xúc tác tổng hợp) thông thường được gắn thêm Adenine (A) ở

đầu 3', nên khi nối với vector có đầu lồi là Thymine (T) đã được các hãng sinh phẩm thiết kế từ trước, thì hai nucleotide này sẽ gắn nối bổ sung cho nhau nhờ enzym nối T4-DNA ligase hoặc enzym topoisomerase. Các vector thường được sử dụng để nối ghép (ligation) sản phẩm PCR/RT-PCR vào vector là pCR2.1 hay pCR2.1[®]TOPO (Invitrogen) (Hình 2.2).



Hình 2.2. Cấu trúc vector pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen)

Vị trí để nối sản phẩm PCR vào được bố trí ở trong chuỗi gen *lacZ*, gen mã hóa và sản xuất enzym β -galactosidase, có tác dụng xúc tác thủy phân với X-gal để tạo dẫn chất có màu xanh. Vi khuẩn không mang plasmid tái tổ hợp sẽ tạo nên khuẩn lạc xanh. Khi sản phẩm được nối thành công, thì đoạn DNA ngoại lai làm bất hoạt gen *lacZ* không cho nó sản xuất ra enzym β -galactosidase, nên vi khuẩn mang plasmid tái tổ hợp sẽ không có enzym phân hủy cơ chất X-gal và khuẩn lạc sẽ màu trắng khi nuôi trên môi trường có chứa X-gal. Thành phần phản ứng nối sản phẩm PCR vào vector pCR[®] 2.1-TOPO ở bảng 2.5.

Bảng 2.5. Thành phần của phản ứng nối sản phẩm PCR vào vector pCR[®] 2.1-TOPO

Thành phần phản ứng	Thể tích
H ₂ O	2 μ l
Buffer ligation 10X	2 μ l
Sản phẩm PCR	1 μ l
Vector pCR 2.1-TOPO (25ng/ μ l)	1 μ l
Tổng	6 μl

*** Chuyển nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến:**

Bước 1: Lấy 5 μ l sản phẩm nối vào 50-100 μ l tế bào khả biến *E. coli* DH5 α (108 – 109 tế bào/ml), ủ trên đá trong 45 phút.

Bước 2: Sốc nhiệt ở 42 $^{\circ}$ C trong 45 giây, rồi ngay lập tức ủ vào trên đá trong 2 phút.

Bước 3: Bổ sung thêm 150 μ l môi trường dinh dưỡng SOC, lắc ống tế bào với tốc độ 200 vòng/phút trong 1 giờ ở 37 $^{\circ}$ C để các tế bào ổn định và nhân lên trong vài chu kỳ

Bước 4: Sản phẩm chuyển nạp được trải đều trên đĩa thạch LB-agar (Luria – Bertani) 1,5% có bổ sung 100µl kháng sinh Kanamycin (40mg/ml) và 200µl X-gal (40mg/ml), ủ các đĩa thạch ở tủ ấm 37°C ít nhất là 18 - 20 giờ.

Sau thời gian trên, tiến hành chọn lọc và nuôi cấy vi khuẩn tái tổ hợp.

*** Chọn lọc khuẩn lạc và nuôi cấy trong môi trường lỏng:**

- Khuẩn lạc màu trắng trên môi trường LB agar (Luria – Bertani) được lựa chọn nuôi cấy trong các ống chứa 5 ml môi trường LB lỏng.

- Bổ sung 5µl Kanamycin để chọn lọc dòng có mang gen kháng kháng sinh.

- Có thể bổ sung thêm X-gal vào môi trường để loại bỏ những ống môi trường có màu xanh (do đoạn gen chưa gài vào vector) mà khi chọn lọc khuẩn lạc bị lẫn tạp hoặc khi chọn lọc khuẩn lạc có nhân hơi xanh.

- Sau khi cấy khuẩn lạc, ống môi trường được lắc 200 vòng/phút trong 16 – 20 giờ ở 37°C cho vi khuẩn nhân lên.

*Tách DNA plasmid tái tổ hợp: Dùng DNA Plasmid Mini Extraction Kit (BIONEER)

Bước 1: Lắc đều lọ nuôi cấy, đổ vào ống Eppendorf loại 2 ml sạch, ly tâm 10000 vòng/phút trong 2 phút để thu tế bào. Sau ly tâm bỏ dịch bên trên, giữ cặn tế bào bên dưới (dùng pipet hút hết dịch trong giữ lại cặn tế bào).

Bước 2: Thêm 250µl dung dịch (1), dùng pipet hút nhẹ lên xuống vài lần cho đều.

Bước 3: Thêm 250µl dung dịch (2), đậy nắp, trộn bằng cách lắc xuôi ngược.

Bước 4: Thêm 350µl dung dịch (3), trộn nhẹ nhàng, sau đó đem ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 10 phút, nhiệt độ 4°C.

Bước 5: Chuyển toàn bộ phần dịch trong bên trên lên trên màng của cột lọc. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch dưới.

Bước 6: Thêm 500µl dung dịch (D) lên trên màng lọc, để ở nhiệt độ phòng 5 phút, sau đó ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch bên dưới.

Bước 7: Thêm 700µl dung dịch (4) lên màng lọc, ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch dưới. Ly tâm lại để làm khô cột.

Bước 8: Chuyển cột sang ống Eppendorf mới, thêm 50µl dung dịch (5) Elution buffer lên trên màng lọc, để nhiệt độ phòng 2 phút, ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút,

*** Kiểm tra DNA tái tổ hợp bằng enzym giới hạn *EcoRI*:**

Thành phần phản ứng cắt DNA plasmid tái tổ hợp (Bảng 2.6)

Bảng 2.6. Thành phần của phản ứng cắt DNA tái tổ hợp bằng enzym giới hạn

EcoRI

Thành phần phản ứng	Thể tích
Nước	16µl
Buffer for <i>EcoRI</i> (10X)	2µl

Enzym <i>EcoRI</i>	1 μ l
DNA plasmid	1 μ l
Tổng	20μl

Hỗn hợp phản ứng trên được trộn đều trong một ống Eppendorf và ủ ở 37°C trong 2 giờ cho phản ứng xảy ra. Điện di kiểm tra trên thạch agarose 1%, nếu sản phẩm cắt cho kết quả tương ứng với kích thước DNA sản phẩm PCR, thì DNA plasmid tái tổ hợp được thu nhận và được giải trình trình tự.

2.3.9. Phương pháp giải trình tự

Giải trình tự gen S1: Plasmid tái tổ hợp gen S1 được giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Chúng tôi thiết kế một môi bên trong gen S1 (PEDVS-F1: 5'-AATTGCATTGGTATGCTGC-3') để giải trình tự. Chuỗi nucleotide được xử lý bằng chương trình Seqed1.3, so sánh bằng chương trình AssemblyLIGN1.9 và MacVecter8.2 (Accelrys Inc). Các trình tự tương ứng với vùng gen S1 đăng ký tại Ngân hàng gen được sử dụng để so sánh đối chiếu với chuỗi gen nghiên cứu, sử dụng chương trình GENEDOC2.7 (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>).

Giải trình tự hệ gen chủng PEDVHY1: Hệ gen chủng được giải trình tự bằng hai phương pháp: Giải trình tự toàn bộ hệ gen bằng phương pháp Illumina (Công ty TNHH Khoa học KTEST). Đồng thời giải trình tự từng phân đoạn gen bằng phương pháp Sanger.

2.3.10. Phương pháp xử lý số liệu

GeneDoc 2.7 - Chương trình so sánh và phân tích chuỗi được phát triển cho máy tính PC chạy trên hệ điều hành Windows, giúp mở, đọc và phân tích các tệp định dạng .msf (multiple sequence file) [69]. Phần mềm này cho phép xác định trình tự amino acid của các gen nhân và gen ty thể, và thiết lập cấu hình của các chuỗi đã được so sánh để sử dụng trong phân tích phả hệ bằng MEGA.

MEGA7 - phân tích di truyền tiến hóa phân tử MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Phần mềm này hỗ trợ so sánh các chuỗi gen có cùng chức năng từ các chủng thuộc cùng loài hoặc từ các chủng khác loài nhưng thuộc cùng giống hoặc chi trong cùng một họ. Điều này giúp xác định mối quan hệ tiến hóa và phả hệ ở mức độ di truyền tiến hóa [70]. Trong nghiên cứu này, MEGA phiên bản 7 được sử dụng với tham số Kimura-2 để mô phỏng sự thay đổi nucleotide, cùng với bootstrap 1000 lần để tăng độ tin cậy của kết quả.

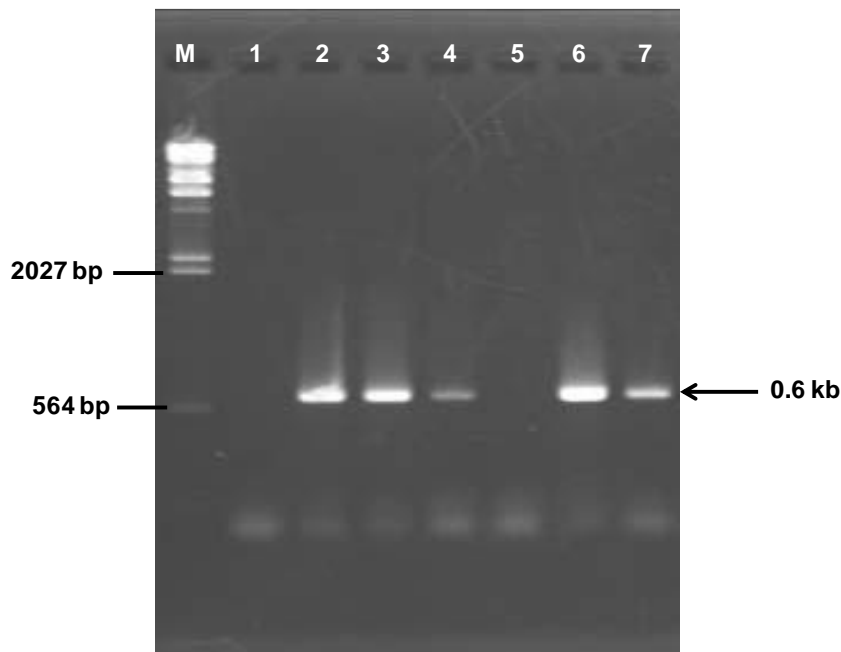
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả sàng lọc mẫu bệnh phẩm có chứa PEDV

Ngoài PEDV, ở Việt Nam cũng đã phát hiện sự hiện diện và lây lan của virus TGEV và gần đây là porcine deltacoronavirus (PDCoV). Các loại virus này đã được chứng minh gây ra các triệu chứng và tổn thương bệnh tích tương tự như bệnh do PEDV gây ra, khiến việc chẩn đoán lâm sàng trở nên khó khăn [71, 72]. Do đó, để xác định chính xác sự có mặt của PEDV trong các mẫu thu thập (phân hoặc ruột non), kỹ thuật PCR đã được áp dụng với các cặp mồi chẩn đoán đặc hiệu.

Các mẫu bệnh phẩm thu nhận ở các trang trại thuộc tỉnh Hưng Yên được tiến hành tách chiết thu nhận RNA tổng số. Mẫu RNA tổng số sau đó được sử dụng làm khuôn để thực hiện phản ứng RT-PCR chẩn đoán virus PEDV bằng cặp mồi PEDVF – PEDVR (bảng 2.2). Các mẫu dương tính với PEDV sẽ được tiến hành chuyển cDNA và thực hiện PCR để thu nhận gen S1.

Kết quả điện di kiểm tra, chúng tôi phát hiện 5 mẫu dương tính với PEDV, là các mẫu cho sản phẩm PCR kích thước khoảng 0,6 kb đúng như dự tính, băng DNA có chất lượng tốt, đơn băng (Hình 3.1).



Hình 3.1. Kết quả điện di phát hiện PEDV bằng cặp mồi chẩn đoán PEDVF-PEDVR
Giếng M: thang DNA chuẩn (DNA của thực khuẩn thể λ được cắt bằng enzyme *HindIII*)

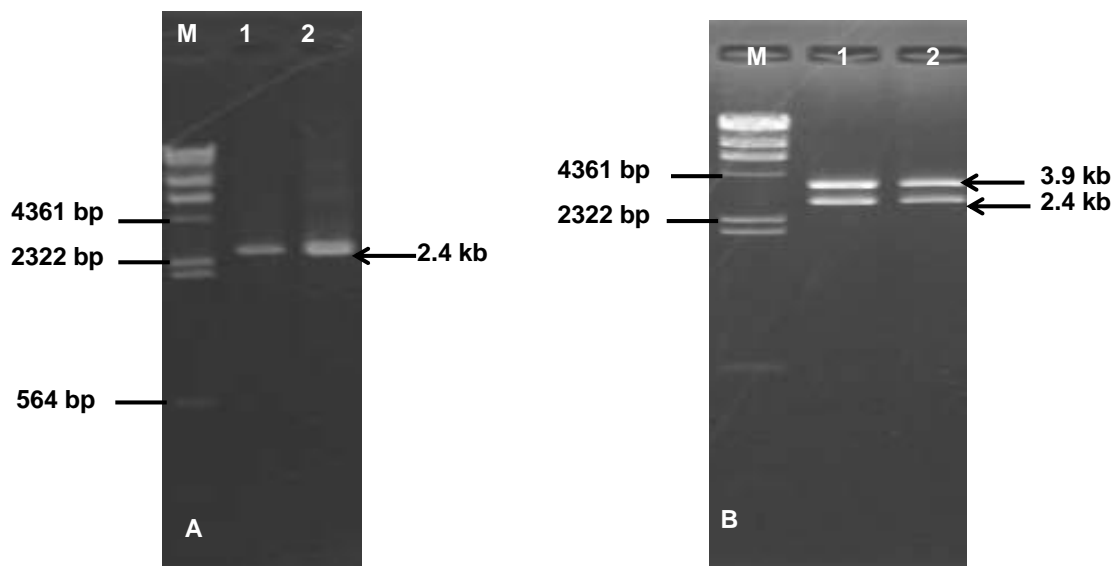
Giếng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: kết quả PCR bằng cặp mồi chẩn đoán của các mẫu PEDV thu nhận tại các trang trại đại diện cho các mẫu nghiên cứu

Trong năm mẫu dương tính, chúng tôi lựa chọn hai mẫu có chất lượng tốt và đại diện cho hai trại khác nhau của Hưng Yên (là mẫu số 2 và mẫu số 6) để giải mã gen S1.

3.2. Kết quả thu nhận và giải trình tự gen S1

Để thu nhận gen S1 hoàn chỉnh, chúng tôi tiến hành thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu PEDVS1F - PEDVS1R (Bảng 2.2), thành phần phản ứng và chu trình nhiệt đã được tối ưu (bảng 2.3). Mẫu được ký hiệu là PEDVHY1 và PEDVHY2.

Sản phẩm của phản ứng PCR thu nhận gen S1 hoàn chỉnh được kiểm tra bằng điện di trên thạch agarose 1%. Hình 3.2 thể hiện kết quả điện di của sản phẩm PCR gen S1 và DNA plasmid tái tổ hợp sau khi được cắt bằng enzyme giới hạn *EcoRI*. Các sản phẩm PCR từ mẫu PEDVHY1 và PEDVHY2 đều biểu hiện chất lượng tốt, cho thấy quá trình dòng hóa thành công vào vector pCR2.1. Khi kiểm tra DNA plasmid tái tổ hợp bằng cách cắt với enzyme *EcoRI*, hai băng được quan sát thấy: băng đầu tiên có kích thước 3,9 kb tương ứng với vector pCR2.1 và băng thứ hai có kích thước khoảng 2,4 kb, bằng với kích thước của sản phẩm PCR gen S1 được dòng hóa. DNA plasmid này sẽ được chọn để tiếp tục giải trình tự.



Hình 3.2. Kết quả điện di sản phẩm PCR thu toàn bộ gen S1 của 2 chủng PEDV nghiên cứu

Giếng M: thang DNA chuẩn (DNA của thực khuẩn thể λ được cắt bằng enzyme HindIII).

Hình 3.2A: Giếng 1: kết quả PCR khuếch đại gen S1 của mẫu PEDVHY1; Giếng 2: kết quả PCR khuếch đại gen S1 của mẫu PEDVHY2

Hình 3.2B: giếng 1: kết quả điện di DNA plasmid của chủng PEDVHY1 cắt bằng enzyme giới hạn *EcoRI*; Giếng 2: kết quả điện di DNA plasmid của chủng PEDVHY2 cắt bằng enzyme giới hạn *EcoRI*

DNA plasmid được giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Kết quả đã thu nhận được toàn bộ gen S1 của hai chủng PEDVHY1, PEDVHY2, gồm 2205 nucleotide mã hóa cho 735 amino acid.

Tỷ lệ đồng nhất nucleotide trong gen S1 giữa chủng PEDVHY1 và chủng PEDVHY2 cao, 99.66%. Chuỗi nucleotide thu được của mẫu PEDVHY1, PEDVHY2 được phân tích BLAST lên website của NCBI. Kết quả cho thấy trình tự nucleotide thu được thuộc gen S1 của virus PEDV trong nghiên cứu này do có tỷ lệ tương đồng cao (trên 97%) với các trình tự nucleotide trên gen S1 của các chủng PEDV đã được đăng ký trên ngân hàng gen (Hình 3.3)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Porcine epidemic diarrhea virus strain CH-LCC-02-2011 S protein (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1029	1029	100%	0.0	97.51%	4161	KP399634.1
Porcine epidemic diarrhea virus strain CH/GX/PEDV/1902/2017 complete genome	Porcine epidemi...	1029	1029	100%	0.0	97.51%	28044	MZ364311.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate DT1 S protein (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1029	1029	100%	0.0	97.51%	4158	MG373532.1
Porcine epidemic diarrhea virus strain CH-TD4-2018 spike protein (S) gene partial cds	Porcine epidemi...	1029	1029	100%	0.0	97.51%	1509	MW330075.1
Porcine epidemic diarrhea virus BP-2016 S gene for spike protein complete cds	Porcine epidemi...	1029	1029	100%	0.0	97.51%	4158	LC496368.1
Porcine epidemic diarrhea virus strain CH/GX/PEDV/1939/2018 complete genome	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	28044	MZ364312.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate HUA-PED160 spike protein gene partial cds	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	4155	MK435387.1
Porcine epidemic diarrhea virus strain CH-JM-2018 spike protein (S) gene partial cds	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	1509	MW330108.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate VN367/VP/2014 spike (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	4152	KX982571.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate VN02/HY/2013 spike (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	4158	KX982554.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate SC-ZY-2 S protein gene complete cds	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	4161	KR732652.1
Porcine epidemic diarrhea virus strain YNLP/2022 complete genome	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	28036	OQ437174.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate VN232/HB/2013 spike (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	4143	KX982564.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate VN292/HN/2014 spike (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	4152	KX982568.1
Porcine epidemic diarrhea virus strain CH/GD-15/2018 spike protein (S1) gene partial cds	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	2376	MT739785.1
Porcine epidemic diarrhea virus strain CH-XZ6-2018 spike protein (S) gene partial cds	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	1509	MW330205.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate BT3 S protein (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	4158	MG373530.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate HBXY3 spike protein (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	4158	KY775042.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate 13JM-291 spike glycoprotein (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	4158	KY619768.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate TG5 S protein (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	4158	MG373533.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate SHHC2016 spike protein gene complete cds	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	4158	MG198670.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate SC-ZY-1 S protein gene complete cds	Porcine epidemi...	1024	1024	100%	0.0	97.34%	4161	KR732651.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate CH/GD-19/2013 spike protein (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	4167	KP870129.1
Porcine epidemic diarrhea virus strain CH-TS-2018 spike protein (S) gene partial cds	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	1509	MW330189.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate CH-HYC-10-2011 spike protein gene partial cds	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	4152	JX242455.1
Porcine epidemic diarrhea virus strain K14JJ07 spike protein gene complete cds	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	4161	KM924408.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate YNBS/2022 complete genome	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	28031	OP972835.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate CH/GD-26/2014 spike protein (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	4152	KP870136.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate FJLY03-2017 spike protein (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	4158	OP171892.1
Porcine epidemic diarrhea virus strain CHGD-01 complete genome	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	28047	JX261936.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate CH/GD-29/2014 spike protein (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	4167	KP870139.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate CH/SCXM/2019 spike protein gene complete cds	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	4158	MN213154.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate CH-HYC-11-2011 spike protein gene partial cds	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	4152	JX242456.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate CH/SCPZ/2018 spike protein (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	4158	MH593147.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate VN-TH15/HY/2015 spike (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	4182	KX982576.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate FJLY01-2017 spike protein (S) gene complete cds	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	4158	OP171884.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate CH-YHC-12-2011 spike protein gene partial cds	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	4152	JX242460.1
Porcine epidemic diarrhea virus isolate JSNJ1602 spike protein gene complete cds	Porcine epidemi...	1018	1018	100%	0.0	97.18%	4158	MG198632.1

Hình 3.3. Kết quả BLAST dựa trên gen S1 của chủng PEDVHY1

Kết quả trong hình 3.3 cho thấy, trình tự nucleotide của chủ PEDVHY1 và PEDVHY2 có tỷ lệ tương đồng cao nhất đạt 97,51% với 4 chủng PEDV có nguồn gốc Trung Quốc, bao gồm CH-LCC-02-2011 (Mã GenBank: KP399634.1), CH/GX/PEDV/1902/2017 (Mã GenBank: MZ364311.1), CH-TD4-2018 (Mã GenBank: MW330075.1), BP-2016 (Mã GenBank: LC496368.1) và chủng DT1 (Mã GenBank: MG373532.1) của Việt Nam phân lập vào năm 2017 tại Đồng Tháp.

3.3. Kết quả phân tích phát sinh loài dựa trên gen S1

Phân tích phát sinh loài sử dụng toàn bộ hệ gen hoặc một số gen riêng lẻ đã được thực hiện để xác định các biến thể và mối quan hệ của các mẫu PEDV đã phân lập. Gen S toàn phần hoặc một phần được biết là các vị trí thích hợp trong phân tích mối quan hệ di truyền và dịch tễ học phân tử của PEDV [64]. Để hiểu rõ về biến thể và quá trình tiến hóa của PEDV ở Trung Quốc, chúng tôi đã xây dựng một cây phát sinh loài dựa trên trình tự tiểu phần gen S1.

Cây phả hệ được xây dựng dựa trên trình tự gen S1 của 54 chủng PEDV, trong đó có chủng nghiên cứu PEDVHY1, PEDVHY2 và 53 chủng còn lại đại diện cho các genotype đã và đang lưu hành trên toàn cầu bằng phần mềm MEGA7 sử dụng phương pháp “kết nối liền kề” (Neighbor-Joining (NJ)), với hệ số tin tưởng (bootstrap) là 1000 lần. Các chủng tham chiếu là đại diện cho các chủng thuộc các genotype khác nhau, được tải xuống từ Ngân hàng gen NCBI tương ứng với mã số GenBank của từng chủng (hình 3.3).

Kết quả phân tích phát sinh chủng loại cho thấy, các chủng PEDV tham chiếu trên thế giới được chia thành năm nhóm chính tương ứng với năm genotype: G1a, G1b, G2a, G2b, G2c (Hình 3.4).

Nhóm thứ nhất gồm 29 chủng PEDV thuộc genotype G2b, bao gồm các chủng virus phân lập tại nhiều quốc gia bao gồm: Mỹ, Hàn Quốc, Mexico, Trung Quốc, Việt Nam (từ năm 2013 đến 2018), và chủng PEDVHY1 thu nhận mới năm 2023 tại tỉnh Hưng Yên trong nghiên cứu này. Điều này chứng tỏ sự hiện diện của PEDV G2b khắp toàn cầu trong thời gian dài và tồn tại cho tới tận ngày nay. Nhìn chung, chủng PEDVHY1 trong nghiên cứu này có mối quan hệ họ hàng gần gũi với các chủng PEDV của Việt Nam.

Nhóm thứ hai gồm các chủng thuộc genotype G2a. Nhóm này gồm các chủng của Trung Quốc phân lập trong khoảng 4 năm trở lại đây gây ra nhiều ổ dịch lớn tại Trung Quốc và lan sang các nước lân cận. Tuy nhiên, tại Việt Nam vẫn chưa ghi nhận thấy sự lưu hành phổ biến của các chủng PEDV thuộc genotype G2a này.

Nhóm thứ ba gồm các chủng PEDV thuộc genotype G1a. Nhóm này chứa chủng PEDV cổ điển CV777 phân lập từ năm 1978 tại Bỉ. Ngoài ra còn có các chủng phân lập tại Hàn Quốc năm 1998 và phân lập tại Đan Mạch phân lập năm 2017. Chủng Avac-PEDV-98 phân lập năm 2021 của Việt Nam thuộc nhóm này.

Nhóm thứ tư gồm các chủng PEDV thuộc genotype G1b. Nhóm này chứa các chủng virus vaccine nhược độc được biến đổi từ các chủng cường độc thuộc genotype G1a. Trong đó chủng CV777 đại (genotype G1a) sau quá trình nhược độc hóa thành chủng CV777 nhược độc thuộc G1b, chủng DR13 có nguồn gốc G1a, sau khi cấy chuyển 100 đời đã thành chủng nhược độc DR13 thuộc G1b. Đây là hai trong số nhiều chủng virus vaccine đang được sử dụng rộng rãi hiện nay.

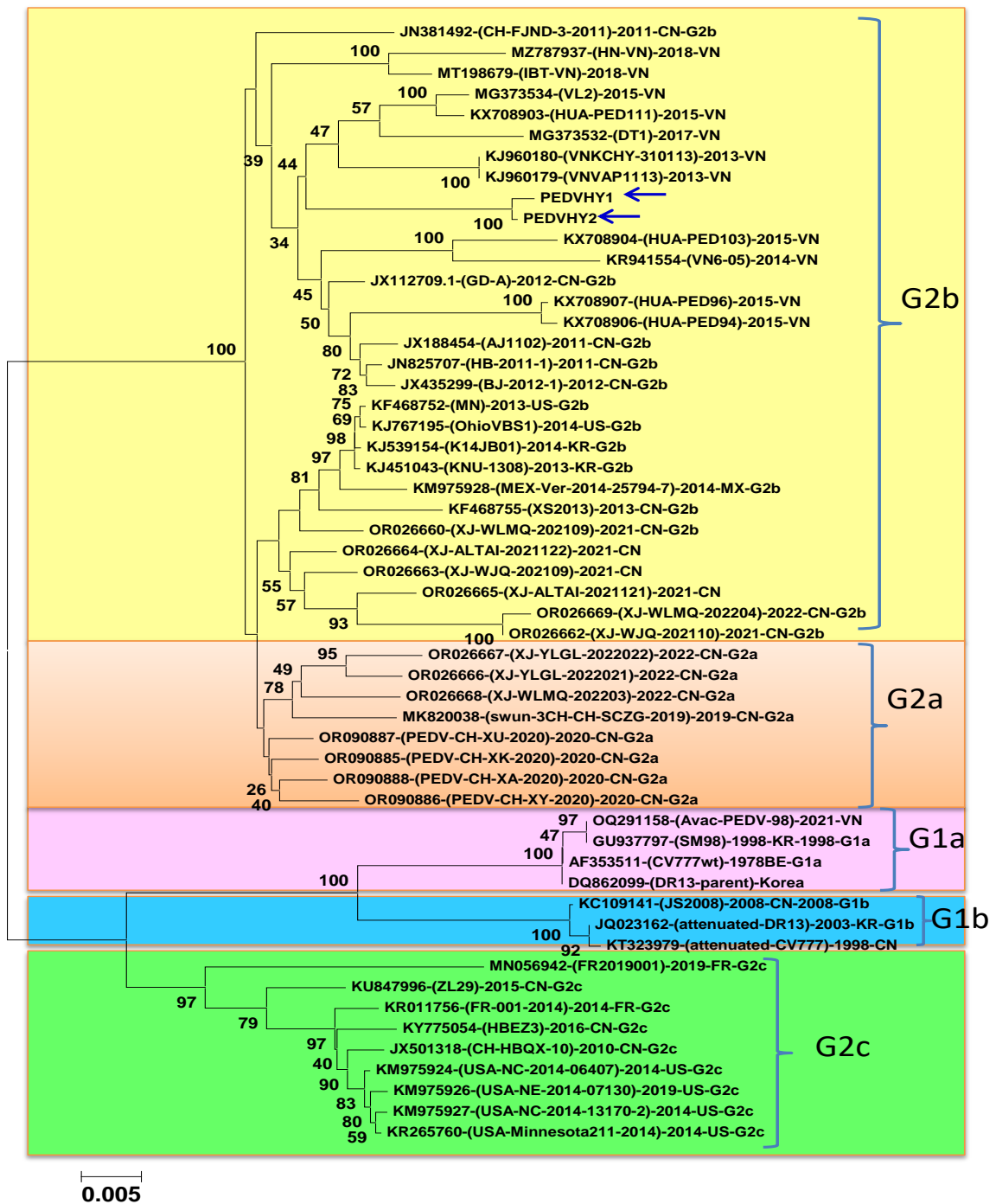
Nhóm thứ năm gồm các chủng PEDV thuộc genotype G2c. Nhóm này gồm các chủng thu nhận tại Mỹ, Pháp, Trung Quốc từ khoảng những năm 2010 trở lại đây.

Từ kết quả phân tích trên cho thấy có sự đa dạng di truyền gen S1 giữa các chủng PEDV của các quốc gia khác nhau, đặc biệt là giữa các châu lục.

Chủng PEDV nghiên cứu PEDVHY1 và PEDVHY2 phân lập năm 2023 tại tỉnh Hưng Yên đều thuộc genotype G2b. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thống nhất với các kết quả nghiên cứu của các tác giả khác cho rằng các chủng virus PEDV chiếm ưu thế tại Việt Nam thuộc loại có độc lực cực cao (G2b). Đồng thời phù hợp với nghiên cứu cho rằng các chủng PEDV thuộc genotype 2 có sự phân bố chủ yếu ở khu vực châu Á và Trung Quốc, trong đó các chủng G2a tập trung khắp khu vực phía đông Trung Quốc, từ Bắc Kinh đến tỉnh Quảng Đông, trong khi các chủng G2b chủ yếu nằm ở đông nam Trung Quốc [30, 65].

Ngược lại, hai chủng PEDV của Việt Nam trong nghiên cứu này lại có khoảng cách di truyền xa với các chủng vaccine như CV777, DR13, và SM98. Đây là đặc điểm cần chú ý khi sử dụng vaccine có nguồn gốc từ Mỹ và Úc để sử dụng cho lợn tại Việt Nam do có thể có hiệu quả thấp hơn. Chủng PEDVHY1, PEDVHY2 trong nghiên cứu của chúng tôi có mối quan hệ họ hàng gần gũi với các chủng VL2, HUA-PED111, DT1, VNKCHY-310113, VNVAP1113 của Việt Nam. Kết quả này đặt ra giả thuyết về nguồn gốc của các chủng PEDV tại Hưng Yên, vì các hoạt động giết mổ, vận chuyển gia súc bị bệnh đều góp phần tăng nguy cơ lây nhiễm PEDV. Việt Nam là một trong các quốc gia có ngành chăn nuôi lợn phát triển, với số lượng trang trại chăn nuôi lớn khả năng xuất hiện các chủng virus mới sẽ tăng lên. Điều này gợi ý rằng chúng ta nên tăng cường quản lý chăn nuôi lợn và vệ sinh môi trường trong quá trình vận chuyển, cải thiện chính sách quản lý vận chuyển lợn liên tỉnh nhằm giảm khả năng lây truyền và đột biến PEDV. Tóm lại, phân tích phả hệ nguồn gốc chỉ ra rằng các chủng PEDV lưu hành tại Việt Nam trong nghiên cứu này có nguồn

gốc từ Trung Quốc và chúng đang dần trải qua biến đổi di truyền và hình thành một phân nhóm PEDV mới ở Việt Nam.



Hình 3.4. Cây phả hệ xác định mối quan hệ nguồn gốc của các chủng PEDV dựa trên trình tự nucleotide của tiểu phần gen S1.

Ghi chú: Chủng PEDVHY1 và PEDVHY2 trong nghiên cứu được đánh dấu bằng mũi tên. Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7, phương pháp “kết nối liền kề” ((Neighbor-Joining) với hệ số tin tưởng (bootstrap) 1000 lần lặp lại. Vạch ngang ở cuối hình (0.005) biểu thị sai khác nucleotide (1/1000) ở mỗi nhánh.

3.4. Kết quả thu nhận toàn bộ hệ gen

Trong hai chủng PEDV nghiên cứu, chủng PEDVHY1 được chọn để giải trình tự thu nhận hệ gen hoàn chỉnh.

Toàn bộ hệ gen của chủng virus tiêu chảy cấp ở lợn PEDVHY1 được nhân lên bằng phản ứng PCR từ nguồn khuôn cDNA, bằng 14 phản ứng với 14 cặp mồi khác nhau. Sản phẩm cuối cùng thu được bao gồm 14 đoạn DNA chứa toàn bộ DNA của hệ gen. Các sản phẩm PCR, sau khi tinh sạch được giải trình tự trực tiếp.

Đồng thời, hệ gen virus cũng được kết hợp giải trình tự toàn bộ hệ gen bằng phương pháp Illumina.

Bằng cách sắp xếp nối các chuỗi với nhau sử dụng các chương trình tin-sinh học chuyên biệt, và hỗ trợ của kết quả giải trình tự gen thế hệ mới, chúng tôi thu được chuỗi DNA của toàn bộ hệ gen của chủng PEDVHY1.

Trình tự toàn bộ hệ gen của PEDVHY1 có chiều dài 28.212 nucleotide với hàm lượng GC là 41,7%. Chủng PEDVHY1 của Việt Nam có tổ chức bộ gen tương tự như các phân lập PEDV khác đã được báo cáo trước đây, với 7 khung đọc mở (ORF), được đặc trưng bởi thứ tự gen ORF1a/1b-S-ORF3-E-M-N. Kết quả giải trình tự gen được trình bày chi tiết tại bảng 3.1.

Bảng 3.1: Trật tự sắp xếp hệ gen chủng PEDVHY1

Vị trí bắt đầu	Vị trí kết thúc	Chiều dài	Chuỗi	Gen	Sản phẩm
276	12629	12354	+	ORF1a	replicase polyprotein
12659	20620	7962	+	ORF1b	polyprotein
20617	24774	4158	+	S	spike protein
24771	25448	678	+	ORF3	ORF3 protein
25429	25659	231	+	E	envelope protein
25667	26347	681	+	M	membrane protein
26553	27839	1287	+	N	Nucleocapsid protein

Trình tự toàn bộ hệ gen của chủng PEDVHY1 được phân tích độ tương đồng trong trình tự bộ gen hoàn chỉnh bằng chương trình BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), cho thấy chủng PEDVHY1 có độ tương đồng đạt cao nhất với ba chủng CH/GX/PEDV/1939/2018 (số gia nhập GenBank: MZ364312.1), CH/GX/PEDV/1902/2017 (số gia nhập GenBank: MZ364311.1), và chủng GXGL/2022 (số gia nhập GenBank: PP472644.1) với độ tương đồng lần lượt là 98,84%, 98,82% và 98,69% tương ứng.

Gen S của chủng PEDVHY1 có chiều dài đầy đủ là 4158 nucleotide, dài hơn 6 nucleotide so với chủng CV777. Phân tích BLAST ghi nhận gen S của PEDVHY1 tương đồng 97,6%-97,91% về nucleotide với 3 chủng của Trung Quốc phân lập từ năm 2015 đến 2017 gồm CH/GX/PEDV/1902/2017 (mã GenBank: MZ364311.1), CH_huaiyang_2015 (mã GenBank: KY496313.1) và JSYC1601 (mã GenBank: MG198637.1).

Chiều dài đầy đủ của gen E của PEDVHY1 là 231 nt, mã hóa 77 amino acid. Kết quả BLAST cho thấy gen E tương đồng 99,13% với 23 chủng PEDV có nguồn gốc từ các nước trong khu vực châu Âu như COL/Antioquia00265/2015 (mã GenBank: MK071619.1) của Colombia, USA/SouthDakota336/2014 (mã GenBank: KR265811.1) của Mỹ, tương đồng đạt mức tương tự với 3 chủng nguồn gốc châu Á là XJ1904-34 (mã GenBank: OL348059.1) của Trung Quốc, SF4017 (mã GenBank: MK558089.1) của Philipines và AOM-2/JPN/2014 (mã GenBank: LC063837.1) của Nhật Bản.

Chiều dài đầy đủ của gen M của PEDVHY1 là 681 nt, mã hóa 224 axit amin. Protein M của chủng PEDVHY1 có độ đồng nhất cao, đạt 99,81% với 15 chủng PEDV có nguồn gốc từ Trung Quốc và 4 chủng PEDV có nguồn gốc Thái Lan gồm DTI1 (Mã Genbank: MW805354.1), DTI2 (Mã Genbank: MW805355.1), DTI3 (Mã Genbank: MW805356.1), DTI1 (Mã Genbank: MW805357.1). Kết quả tương đồng của PEDVHY1 cao 99,41%-99,81% với các chủng từ khắp thế giới cho thấy trình tự gen M được bảo tồn cao.

PEDVHY1 có trình tự gen N với kích thước là 1287 nucleotide. Gen N đạt tương đồng cao nhất 99,15% khi so sánh với chủng CT3 (Mã Genbank: MG373546.1) phân lập từ tỉnh Cần Thơ của Việt Nam, cùng hai chủng của Trung Quốc gồm GS/YD37/2022 (Mã Genbank: OR601543.1) và GS/YD17/2022 (Mã Genbank: OR601542.1) với tương đồng đạt 99,15% và 99,07%, tương ứng.

Kết quả giải trình tự cho thấy chiều dài đầy đủ của gen ORF3 của PEDVHY1 là 678 nt, mã hóa 226 axit amin. Kết quả BLAST ghi nhận gen ORF3 đạt tương đồng cao 99,41%-99,85% với các chủng tham khảo của Việt Nam và các nước lân cận như Trung Quốc, Thái Lan. Điều này cho thấy rằng gen ORF3 có tính bảo tồn cao trong hệ gen virus PEDV. Trong đó, tương đồng cao nhất (99,41%) với 5 chủng của Trung Quốc gồm CH/GX/PEDV/1939/2018 (mã Genbank: MZ364312.1), GDS51 (Mã Genbank: MH726403.1), CH/GX/PEDV/1902/2017 (Mã Genbank: MZ364311.1), GDS53 (Mã Genbank: MH726404.1) và SXXY (Mã Genbank: OR234022.1).

3.5. Kết quả phân tích đặc điểm phân tử gen S1

Bệnh PED đã gây thiệt hại to lớn cho ngành chăn nuôi lợn thế giới, trong quá trình tiến hóa và lây lan, virus PEDV đã tạo ra nhiều chủng khác nhau trên toàn cầu. Mỗi chủng có đặc điểm di truyền và độc lực riêng, ảnh hưởng đến mức độ nghiêm trọng của dịch bệnh và khả năng đáp ứng với các biện pháp phòng ngừa. Dưới đây là danh sách các chủng PEDV chính đã được phát hiện tại các khu vực khác nhau trên thế giới, được phân loại theo đặc điểm gen và sự phân bố địa lý.

Bảng 3.2: Danh sách các chủng PEDV của Việt Nam và thế giới sử dụng trong nghiên cứu

ST T	Ký hiệu chủng	Số đăng ký NHG	Genotype	Nước	Năm phân lập
1	PEDVHY1	Nghiên cứu này	G1a	Việt Nam	2024
2	DR13	DQ862099	G1a	Hàn Quốc	2006
3	CV777	AF353511	G1a	Bỉ	1978
4	SM98	GU937797	G1a	Hàn Quốc	1998
5	AVCT12	LC053455	G1a	Thái Lan	2010
6	CHM2013	KM887144	G1a	Trung Quốc	2013
7	Avac/PEDV/98	OQ291158	G1a	Việt Nam	2021
8	LZC	EF185992	G1a	Trung Quốc	2006
9	CV777 (at)	KT323979	G1a	Trung Quốc	1998
10	attenuated-DR13	JQ023162	G1a	Hàn Quốc	2003
11	SD-M	JX560761	G1a	Trung Quốc	2012
12	SC1402	KP162057	G1a	Trung Quốc	2014
13	JS2008	KC109141	G1a	Trung Quốc	2008
14	SQ2014	KP728470	G1a	Trung Quốc	2014
15	AH-M	KJ158152	G1a	Trung Quốc	2011
16	PC22A-P20	KU893862	G2a	Mỹ	2013
17	MEX/104/2013	KJ645708	G2a	Mexico	2013
18	MYG-1/JPN/2014	LC063838	G2a	Nhật Bản	2014
19	KNU-1305	KJ662670	G2a	Hàn Quốc	2013
20	CH/FJZZ-9/2012	KC140102	G2a	Trung Quốc	2012
21	XJ/YLGL/2022022	OR026667	G2a	Trung Quốc	2022
22	XJ/YLGL/2022021	OR026666	G2a	Trung Quốc	2022
23	XJ/WLMQ/202203	OR026668	G2a	Trung Quốc	2022
24	swun-3CH-CH-SCZG-2019	MK820038	G2a	Trung Quốc	2019
25	PEDV/CH/XU/2020	OR090887	G2a	Trung Quốc	2020
26	PEDV/CH/XK/2020	OR090885	G2a	Trung Quốc	2020

27	PEDV/CH/XA/2020	OR090888	G2a	Trung Quốc	2020
28	PEDV/CH/XY/2020	OR090886	G2a	Trung Quốc	2020
29	PC177	KR078300	G2a	Mỹ	2013
30	PC21A	KR078299	G2a	Mỹ	2013
31	KNU-1308	KJ451043	G2b	Hàn Quốc	2013
32	IBT-VN	MT198679	G2b	Việt Nam	2018
33	VN-TH15/HY/2015	KX982576	G2b	Việt Nam	2015
34	HUA-PED192	MK435381	G2b	Việt Nam	2016
35	VN-K2/HY/2015	KX982573	G2b	Việt Nam	2015
36	CH/HNPJ/2017	MF152604	G2b	Trung Quốc	2017
37	CH/FJND-3/2011	JN381492	G2b	Trung Quốc	2011
38	HN_VN	MZ787937	G2b	Việt Nam	2018
39	VL2	MG373534	G2b	Việt Nam	2015
40	HUA-PED111	KX708903	G2b	Việt Nam	2015
41	DT1	MG373532	G2b	Việt Nam	2017
42	VN/KCHY-310113	KJ960180	G2b	Việt Nam	2013
43	VN/VAP1113_1	KJ960179	G2b	Việt Nam	2013
44	HUA-PED103	KX708904	G2b	Việt Nam	2015
45	VN6-0514	KR941554	G2b	Việt Nam	2014
46	GD-A	JX112709	G2b	Trung Quốc	2012
47	HUA-PED96	KX708907	G2b	Việt Nam	2015
48	HUA-PED94	KX708906	G2b	Việt Nam	2015
49	AJ1102	JX188454	G2b	Trung Quốc	2011
50	HB-2011-1	JN825707	G2b	Trung Quốc	2011
51	BJ-2012-1	JX435299	G2b	Trung Quốc	2012
52	MN	KF468752	G2b	Mỹ	2013
53	OhioVBS1	KJ767195	G2b	Mỹ	2014
54	K14JB01	KJ539154	G2b	Hàn Quốc	2014
55	MEX/Ver/2014/25794-7	KM975928	G2b	Mexico	2014
56	XS2013	KF46875	G2b	Trung Quốc	2013
57	XJ/WLMQ/202109	OR026660	G2b	Trung Quốc	2021
58	XJ/ALTAI/2021122	OR026664	G2b	Trung Quốc	2021
59	XJ/WLMQ /202204	OR026669	G2b	Trung Quốc	2022
60	XJ/WJQ/202110	OR026662	G2b	Trung Quốc	2021
61	Tottori2/JPN/2014	LC022792	G2b	Nhật Bản	2014
62	MEX/104/2013	KJ645708	G2b	Mexico	2013
63	USA/Colorado/2013	KF272920	G2b	Mỹ	2013
64	CH/ZMDZY/11	KC196276	G2b	Mỹ	2011

65	LZW	KJ777677	G2b	Trung Quốc	2012
66	AH2012	KC210145	G2b	Trung Quốc	2012
67	GD-B	JX088695	G2b	Trung Quốc	2012
68	CH/GDZQ/2014	KM242131	G2b	Trung Quốc	2014
69	YN1	KT021227	G2b	Trung Quốc	2013
70	ZJCZ4	JX524137	G2b	Trung Quốc	2011
71	HUA-PED153	MK435389	G2b	Việt Nam	2016
72	VN367/VP/2014	KX982571	G2b	Việt Nam	2014
73	CH/S	JN547228	G2b	Trung Quốc	1986
74	MEX/Mexico329/2014	KR265766	G2b	Mexico	2014
75	ON-018	KM189367	G2b	Canada	2014
76	HBEZ3	KY775054	G2c	Trung Quốc	2016
77	FR2019001	MN056942	G2c	Pháp	2019
78	ZL29	KU847996	G2c	Trung Quốc	2015
79	FR/001/2014	KR011756	G2c	Pháp	2014
80	CH/HBQX/10	JX501318	G2c	Trung Quốc	2010
81	USA/NC/2014/06407	KM975924	G2c	Mỹ	2014
82	USA/NE/2014/07130	KM975926	G2c	Mỹ	2014
83	USA/NC/2014/13170-2	KM975927	G2c	Mỹ	2014
84	USA/Minnesota211/2014	KR265760	G2c	Mỹ	2014
85	CH/GX/PEDV/1939/2018	MZ364312.1		Trung Quốc	2018
86	CH/GX/PEDV/1902/2017	MZ364311.1		Trung Quốc	2017
87	CH-LCC-02-2011	KP399634.1		Trung Quốc	2011
88	CH-TD4-2018	MW330075.1		Trung Quốc	2018
89	BP-2016	LC496368.1		Trung Quốc	2016
90	DT1	MG373532.1		Việt Nam	2017
91	CH_huaiyang_2015	KY496313.1		Trung Quốc	2015
92	JSYC1601	MG198637.1		Trung Quốc	2016
93	COL/Antioquia00265/2015	MK071619.1		Colombia	2015
94	USA/SouthDakota336/2014	KR265811.1		Mỹ	2014
95	XJ1904-34	OL348059.1		Trung Quốc	2019
96	SF4017	MK558089.1		Philippines	2017
97	AOM-2/JPN/2014	LC063837.1		Nhật Bản	2014
98	DTI1	MW805354.1		Thái Lan	2019
99	DTI2	MW805355.1		Thái Lan	2019
100	DTI3	MW805356.1		Thái Lan	2019
101	DTI4	MW805357.1		Thái Lan	2019
102	GS/YD37/2022	OR601543.1		Trung Quốc	2022

103	GS/YD17/2022	OR601542.1		Trung Quốc	2022
104	GDS51	MH726403.1		Trung Quốc	2017
105	GDS53	MH726404.1		Trung Quốc	2017
106	SXXY	OR234022.1		Trung Quốc	2021

Trong hệ gen của virus PEDV, vùng gen S đóng vai trò quan trọng vì nó quyết định tính kháng nguyên và độc lực của virus. Trong vùng gen S, đặc biệt là vùng S1, có ý nghĩa quan trọng nhất. Vùng S1 chịu trách nhiệm cho việc nhận dạng vật chủ và liên kết với các thụ thể trên bề mặt tế bào đích, giúp virus xâm nhập vào tế bào. Điều này có nghĩa là vùng S1 chứa các epitope kháng nguyên, các thành phần quan trọng trong quá trình kích thích hệ miễn dịch của vật chủ tạo ra kháng thể.

Đặc biệt, vùng S1 có tỷ lệ đột biến cao hơn so với các phần khác trong hệ gen của PEDV. Sự biến đổi này cho phép virus thích nghi với môi trường và né tránh hệ miễn dịch của vật chủ, dẫn đến sự xuất hiện của các chủng virus với độc lực và khả năng lây lan khác nhau. Do tầm quan trọng của vùng S1, nó đã trở thành mục tiêu chính trong nhiều nghiên cứu.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành so sánh trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn trên gen S1 của hai chủng virus PEDVHY1 và PEDVHY2 mà chúng tôi phân lập được. Để có cái nhìn toàn diện hơn về sự tương đồng và khác biệt về mặt di truyền của hai chủng này, chúng tôi đã so sánh chúng với một số chủng virus PEDV đã được xác định trước đó. Các chủng được lựa chọn cho phân tích bao gồm XJ-YLGL-2022021, IBT-VN, HBEZ3, X-J-WLMQ, KNU-1308, cũng như các chủng nổi tiếng được sử dụng làm vaccine hiện nay như DR13 dạng wild type (G1a) và dạng nhược độc (G1b), CV777 dạng wild type (G1a) và dạng nhược độc (G1b). Việc so sánh trình tự với các chủng này giúp làm sáng tỏ mức độ tương đồng di truyền của các chủng PEDVHY1 và PEDVHY2 với các chủng vaccine hiện hành, từ đó đánh giá tiềm năng và hiệu quả của các vaccine hiện có đối với việc phòng ngừa các chủng PEDV mới.

Phân tích so sánh được thực hiện bằng phần mềm Genedoc 2.7, một công cụ hiệu quả trong việc sắp xếp và phân tích trình tự nucleotide và amino acid. Kết quả so sánh chi tiết được trình bày trong bảng 3.3.

Kết quả cho thấy chủng hai chủng PEDV trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ sai khác nhau ở bốn vị trí amino acid (L120R, E484P, K638E và P720S) trên protein S1 trong khi chứa nhiều sai khác lớn (xóa đoạn, chèn đoạn) so với các chủng virus nhược độc vaccine.

Protein S1 chứa tổng số 71 vị trí sai khác về amino acid giữa các chủng đại diện cho các genotype. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm hiểu các sai khác amino

acid giữa chủng CV777 thực địa (Mã Genbank: AF353511) (G1a), CV777 nhược độc vaccine (Mã Genbank: KT323979) (G1b), DR13 thực địa (Mã Genbank: JQ023162) (G1b) thu nhận tại Hàn Quốc năm 2009, DR13 nhược độc vaccine (Mã Genbank: JQ023162) (G1b), HBZ3 thực địa (Mã Genbank: KY775054) thu nhận tại Trung Quốc năm 2016 (G2c), XJ-WLMQ-202203 (OR026668) thu nhận tại Trung Quốc năm 2022 (G2a), KNU-1308 (Mã Genbank: KJ451043) thu nhận tại Hàn Quốc năm 2013 (G2b), IBT-VN (Mã Genbank: MT198679) thu nhận tại Việt Nam năm 2018 và chủng nghiên cứu là PEDVHY1 và PEDVHY2 cũng được thu nhận tại tỉnh Hưng Yên năm 2023.

Tiêu phần protein S1 của virus PEDV bao gồm một chuỗi peptide tín hiệu (SP) và hai vị trí quan trọng cho việc liên kết với thụ thể: thụ thể ở đầu tận N (S1-NTD) và thụ thể ở đầu tận C (S1-CTD), bao gồm cả vùng tương đương COE (CO-26K equivalent).

Trong chuỗi peptide tín hiệu này, có sự khác biệt về amino acid giữa các chủng virus thuộc hai nhóm genotype G1 và G2. Cụ thể, các chủng thuộc nhóm G1 có ba vị trí amino acid khác với nhóm G2: ở vị trí thứ 2 (aa 2), nhóm G1 có R hoặc T, trong khi nhóm G2 có K hoặc S; ở vị trí thứ 5 (aa 5), nhóm G1 có I, còn nhóm G2 có N hoặc T; và ở vị trí thứ 15 (aa 15), nhóm G1 có P hoặc L, trong khi nhóm G2 có S.

Trong vùng liên kết thụ thể thứ nhất (S1-NTD) phát hiện 34 sai khác lớn về amino acid giữa các genotype. Đồng thời xuất hiện đột biến chèn amino acid của chủng virus thực địa so với chủng vaccine tại vị trí 56 (I/T), 139 (D/N) và 157 (Y/H). Tại vị trí amino acid 59 – 61, chủng thực địa được chèn thêm 3 amino acid (HGV/QGV) so với chủng vaccine. Trong khi đó, chủng thuộc G1a và G1b lại có thêm 2 amino acid (DI/NI) ở vị trí 163 – 164 so với chủng thuộc G2a, G2b, G2c. Tại các vị trí khác là các đột biến điểm đặc trưng giữa các genotype (Bảng 2.1). Các đột biến chèn/xóa nằm chủ yếu ở vùng siêu biến đổi của chuỗi peptide S1.

Trong vùng liên kết thụ thể thứ 2 (S1-CTD) chứa 7 sai khác, trong đó chủng CV777 (G1a) thực địa chứa nhiều sai khác nhất so với các chủng còn lại. Tại vị trí 554, 599, 638, chủng virus vaccine hoàn toàn khác với hai chủng virus nghiên cứu. Đặc biệt, ở vị trí 638 chỉ riêng chủng PEDVHY1 là K trong khi các chủng khác thuộc cùng genotype 2 là E và các chủng thuộc genotype 1 là Q/E.

Epitope COE-CO26K là một trong những epitope trung hòa có trên protein S1 của PEDV. Amino acid tại vùng epitope này có sự đương đồng cao giữa các chủng PEDV thuộc nhóm G2 nhưng có nhiều vị trí sai khác so với nhóm G1. Các chủng PEDV thuộc nhóm G2 là những chủng có độc lực cao, đang lưu hành hiện nay tại nhiều quốc gia trên thế giới. Kết quả nghiên cứu cho thấy hai chủng PEDV nghiên

cứu là những chủng thuộc nhóm G2 có độc lực cao, có nguy cơ lây lan cao tại các trang trại chăn nuôi lợn.

Vaccine được sản xuất từ các chủng PEDV cổ điển trong nhóm G1 thường rất hiệu quả đối với các biến thể cổ điển. Tuy nhiên, chúng lại không cung cấp được sự bảo vệ hoàn chỉnh chống lại các chủng PEDV mới và có độc lực cao trong nhóm G2. Đặc biệt, tiểu đơn vị S1 của protein S là vùng có tỷ lệ đột biến cao hơn toàn bộ gen S, với tỷ lệ đột biến lên tới $1,5 \times 10^{-3}$ lần thay thế mỗi vị trí mỗi năm [73]. Những sai khác kể trên giữa các chủng vaccine và chủng thực địa có thể là nguyên nhân dẫn đến việc virus tăng hay giảm khả năng liên kết với tế bào chủ, ảnh hưởng đến khả năng bảo hộ của vaccine.

Bảng 3.3. Vị trí sai khác amino acid thuộc protein S1 giữa các chủng PEDV đại diện các genotype chủng nghiên cứu

Vị trí (CV777(G1a))	1-SP-19				S1-NTD									
	2	5	10	15	27-29	30	56	57	59-61	62	64	68-72	74	
CV777(G1a)	R	I	L	P	QST	T	-	M	---	S	S	GTGIE	A	
DR3(G1a)	R	I	F	L	QST	I	-	M	---	S	S	GTGIE	D	
CV777 (at) (G1b)	T	I	F	L	QST	I	-	M	---	S	S	GTGIE	D	
DR3(at) (G1b)	T	I	F	L	QST	I	-	M	---	S	S	GTGIE	D	
HBEZ3 (G2c)	K	N	F	S	QST	I	-	M	---	S	S	GTGIE	A	
XJ-WLMQ (G2a)	K	T	F	S	SAN	T	I	E	HGV	N	T	AGQHP	A	
KNU-1308 (2b)	S	T	F	S	SAN	T	I	E	QGV	N	T	AGQPH	A	
IBT-VN	S	T	F	S	SAN	T	I	E	QGV	N	T	AGQPH	A	
PEDVHY1	S	T	F	S	SAN	T	T	E	QGV	N	T	AGQHP	A	
PEDVHY2	S	T	F	S	SAN	T	T	E	QGV	N	T	AGQHP	A	

Vị trí (CV777(G1a))	S1-NTD												
	82	84	86	87	89	118	120	132	133	138	139	157	158
CV777(G1a)	L	Y	D	S	Q	N	I	K	T	V	-	Y	M
DR3(G1a)	L	Y	D	S	Q	N	I	K	T	V	-	Y	L
CV777 (at) (G1b)	L	Y	D	S	Q	S	I	K	T	V	-	-	L
DR3(at) (G1b)	L	Y	D	S	Q	S	I	K	T	V	-	-	L
HBEZ3 (G2c)	L	Y	D	A	Q	N	I	K	T	V	-	Y	M
XJ-WLMQ (G2a)	L	H	R	G	H	N	T	N	T	A	D	H	M
KNU-1308 (2b)	V	H	R	G	H	N	T	K	T	A	N	H	M
IBT-VN	L	H	R	G	H	N	T	K	T	A	D	H	M
PEDVHY1	L	H	R	G	H	N	T	K	A	A	N	H	M
PEDVHY2	L	H	R	G	H	N	T	K	A	A	N	H	M

Vị trí (CV777(G1a))	S1-NTD									
	159	160-162	163-164	187	201-203	211	228	230-231	237	248-249
CV777(G1a)	R	DGK	DI	L	RRS	T	Y	EP	T	DS
DR3 (G1a)	Q	DGK	NI	L	NRS	T	Y	EP	S	DS
CV777 (at) (G1b)	Q	DGK	NI	I	NRS	T	Y	EP	S	DS
DR3(at) (G1b)	Q	DGK	NI	I	NRS	T	Y	EP	S	DS
HBEZ3 (G2c)	Q	DGK	NI	L	NRS	T	Y	EP	S	DS
XJ-WLMQ (G2a)	S	EHS	--	F	SGG	E	S	QL	L	EL
KNU-1308 (2b)	S	EHS	--	F	SGG	E	S	QP	I	EP
IBT-VN	S	EHS	--	F	SGG	E	S	QP	I	EP
PEDVHY1	S	EHS	--	F	SGG	E	S	QP	I	EP
PEDVHY2	S	EHS	--	F	SGG	E	S	QP	I	EP

Vị trí (CV777(G1a))	S1-NTD		S1-CTD (COE-CO26K)						
	270	522	541	554	599	610	617	638	640
CV777(G1a)	L	A	F	T	G	A	L	E	I
DR3 (G1a)	L	A	F	T	G	E	F	E	V
CV777 (at) (G1b)	L	A	F	T	G	E	F	Q	V
DR3(at) (G1b)	L	A	F	T	G	E	F	Q	V
HBEZ3 (G2c)	L	S	F	S	S	E	F	E	V
XJ-WLMQ (G2a)	L	S	L	S	S	E	F	E	V
KNU-1308 (2b)	L	S	F	S	S	E	F	E	V
IBT-VN	L	A	F	S	S	E	F	E	V
PEDVHY1	V	A	F	S	S	E	F	K	V
PEDVHY2	V	A	F	S	S	E	F	E	V

Chú thích: vị trí amino acid trong bảng 3.3 là vị trí của chủng CV777 thực địa (AF353511)

3.6. Kết quả so sánh về mức độ đồng nhất về nucleotide và amino acid gen S

Gen S của virus PEDV (Porcine Epidemic Diarrhea Virus) thường xuyên đột biến do áp lực từ việc sử dụng vaccine và miễn dịch cộng đồng. Tỷ lệ đột biến được ước tính là khoảng $1,683 \times 10^{-4}$ lần thay thế mỗi vị trí mỗi năm ở cấp độ nucleotide và $2,239 \times 10^{-3}$ lần thay thế mỗi vị trí mỗi năm ở cấp độ amino acid [74]. Vì protein S có vai trò quan trọng trong hệ miễn dịch, chứa nhiều epitope (đoạn kháng nguyên) kích thích phản ứng miễn dịch, nên khi nó đột biến, vaccine trở nên kém hiệu quả hơn. Điều này có thể dẫn đến sự giảm hiệu quả của vaccine, đặc biệt đối với các chủng PEDV có biến thể mới.

Trong nghiên cứu này, trình tự nucleotide và amino acid toàn bộ gen S của chủng PEDVHY1 phân lập tại Hưng Yên năm 2023 được so sánh với các chủng PEDV thuộc các genotype khác nhau đã đăng ký trên ngân hàng gen, bằng chương trình Gendoc 2.7. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.4.

Kết quả cho thấy, chủng PEDVHY1 của Việt Nam có tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và tương đồng về amino acid cao nhất với các chủng gốc Trung Quốc (CH-HNPJ-2017) và Việt Nam (VN-K2-HY-2015, G2b-IBT-VN, HUA-PED192, VN-TH15-HY-2015) thuộc genotype G2b (lần lượt là 96,7% – 97,6% và đạt 97% – 98,2%). Tuy nhiên có tỷ lệ tương đồng thấp khi so sánh với các chủng PEDV thuộc các genotype khác, chỉ từ 92,6% – 97,2% về nucleotide và 92% – 97,5% về amino acid. Sự sai khác lớn về trình tự gen kháng nguyên có thể dẫn đến sự kém tương đồng kháng nguyên-miễn dịch giữa chủng vaccine và chủng thực địa, từ đó làm giảm hiệu quả phòng bệnh của vaccine. Đây là lí do vì sao mặc dù đã tiêm phòng vaccine nhưng mà dịch vẫn bùng phát tại Việt Nam. Từ kết quả nghiên cứu cho thấy cần có kế hoạch nghiên cứu chế tạo chủng vaccine mới, phù hợp với chủng virus đang lưu hành để cho hiệu quả bảo hộ cao hơn.

Bảng 3.4: Tỷ lệ (%) đồng nhất về thành phần nucleotide và amino acid toàn bộ gen S của PEDVHY1 với các chủng tham khảo khác của Việt Nam và thế giới

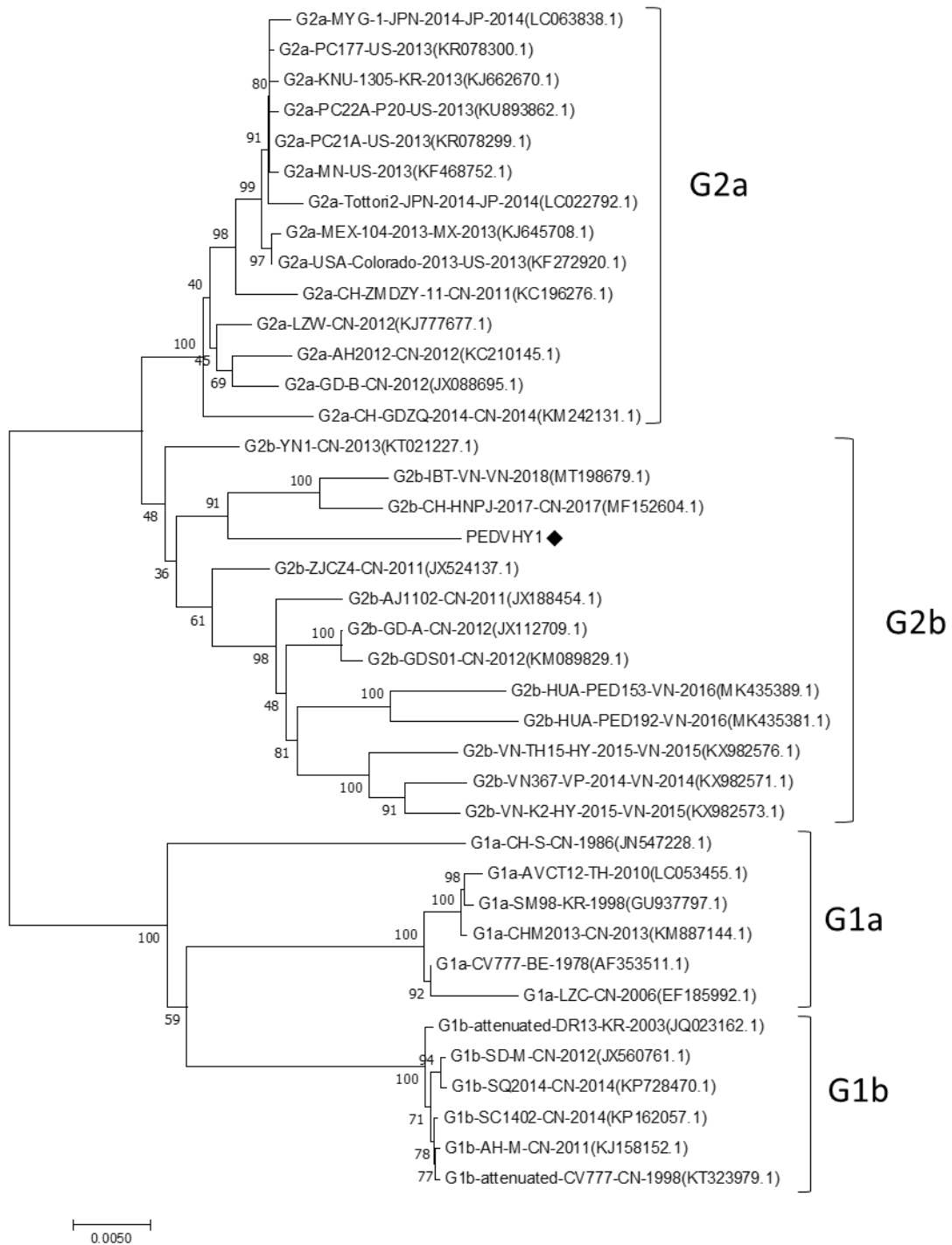
	G2b					G2a					G1a				G1b				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1		97.5	96.6	96.6	96.6	97.5	97.1	97.0	97.0	97.1	96.6	93.3	92.6	92.5	92.6	93.0	93.0	93.0	93.0
2	98.1		97.2	97.4	97.1	99.2	97.6	97.6	97.5	97.6	97.4	93.7	92.9	92.9	93.0	93.7	93.6	93.6	93.6
3	96.8	97.3		96.6	97.6	96.7	96.7	96.7	96.6	96.7	97.0	92.8	92.1	92.0	92.1	92.5	92.4	92.4	92.5
4	97.8	98.0	96.3		97.2	97.5	96.9	96.9	96.8	96.9	97.2	93.7	92.9	92.9	93.0	93.3	93.2	93.2	93.3
5	97.1	97.2	96.7	97.0		97.2	97.1	97.0	97.0	97.1	97.3	93.6	92.9	92.9	92.9	93.3	93.3	93.3	93.3
6	98.0	98.8	96.4	97.9	97.0		97.7	97.7	97.6	97.7	97.7	93.7	93.0	93.0	93.0	93.6	93.5	93.5	93.6
7	97.3	97.6	96.4	97.3	97.0	97.5		99.7	99.7	99.8	98.1	93.9	93.2	93.1	93.2	93.8	93.7	93.7	93.7
8	97.4	97.7	96.5	97.5	97.0	97.5	99.5		99.6	99.8	98.2	94.0	93.3	93.2	93.3	93.8	93.7	93.7	93.7
9	97.1	97.4	96.2	97.1	96.7	97.3	99.2	99.4		99.8	98.0	93.9	93.1	93.1	93.2	93.8	93.7	93.7	93.7
10	97.5	97.8	96.6	97.5	97.1	97.6	99.6	99.8	99.4		98.2	94.0	93.2	93.2	93.3	93.9	93.8	93.8	93.8
11	97.3	97.6	96.7	97.5	97.0	97.8	98.4	98.6	98.2	98.6		93.9	93.1	93.1	93.2	93.7	93.7	93.6	93.7
12	92.9	92.9	92.0	93.0	92.8	92.8	93.2	93.5	93.0	93.4	93.0		99.2	99.1	99.2	96.8	96.8	96.8	96.8
13	91.8	91.8	90.8	91.8	91.6	91.6	92.0	92.3	91.8	92.1	91.8	98.6		99.9	99.9	96.3	96.3	96.2	94.1
14	91.8	91.8	90.8	91.8	91.6	91.6	92.0	92.3	91.8	92.1	91.8	98.6	99.9		99.9	96.3	96.2	96.2	96.2
15	91.8	91.8	90.8	91.8	91.6	91.6	92.0	92.3	91.8	92.1	91.8	98.6	99.8	99.8		96.4	96.4	96.3	96.4
16	92.5	92.8	91.3	92.3	92.2	92.5	92.8	93.0	92.6	92.9	92.5	96.1	95.1	95.1	95.2		99.9	99.8	99.9
17	92.2	92.5	91.1	92.1	92.0	92.2	92.5	92.7	92.3	92.6	92.4	95.9	94.9	94.9	95.0	99.7		99.8	99.9
18	92.1	92.4	91.2	92.1	92.0	92.1	92.4	92.6	92.2	92.6	92.4	95.7	94.7	94.7	94.8	99.5	99.5		99.9
19	92.3	92.6	91.2	92.2	92.0	92.3	92.6	92.8	92.4	92.7	92.5	95.9	94.9	94.9	95.0	99.7	99.7	99.6	

Ghi chú: 1.PEDVHY1, 2.G2b-IBT-VN-VN-2018(MT198679.1), 3.G2b-VN-TH15-HY-2015-VN-2015(KX982576.1), 4.G2b-HUA-PED192-VN-2016(MK435381.1), 5.G2b-VN-K2-HY-2015-VN-2015(KX982573.1), 6.G2b-CH-HNPJ-2017-CN-2017(MF152604.1), 7.G2a-PC22A-P20-US-2013(KU893862.1), 8.G2a-MEX-104-2013-MX-2013(KJ645708.1), 9.G2a-MYG-1-JPN-2014-JP-2014(LC063838.1), 10.G2a-KNU-1305-KR-2013(KJ662670.1), 11.G2a-CH-FJZZ-9-2012-CN-2012(KC140102.1), 12.G1a-CV777-BE-1978(AF353511.1), 13.G1a-SM98-KR-1998(GU937797.1), 14.G1a-AVCT12-TH-2010(LC053455.1), 15.G1a-CHM2013-CN-2013(KM887144.1), 16.G1b-attenuated-DR13-KR-2003(JQ023162.1), 17.G1b-attenuated-CV777-CN-1998(KT323979.1), 18.G1b-SD-M-CN-2012(JX560761.1), 19.G1b-SC1402-CN-2014(KP162057.1)

3.7. Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc dựa trên gen S hoàn chỉnh và toàn bộ hệ gen

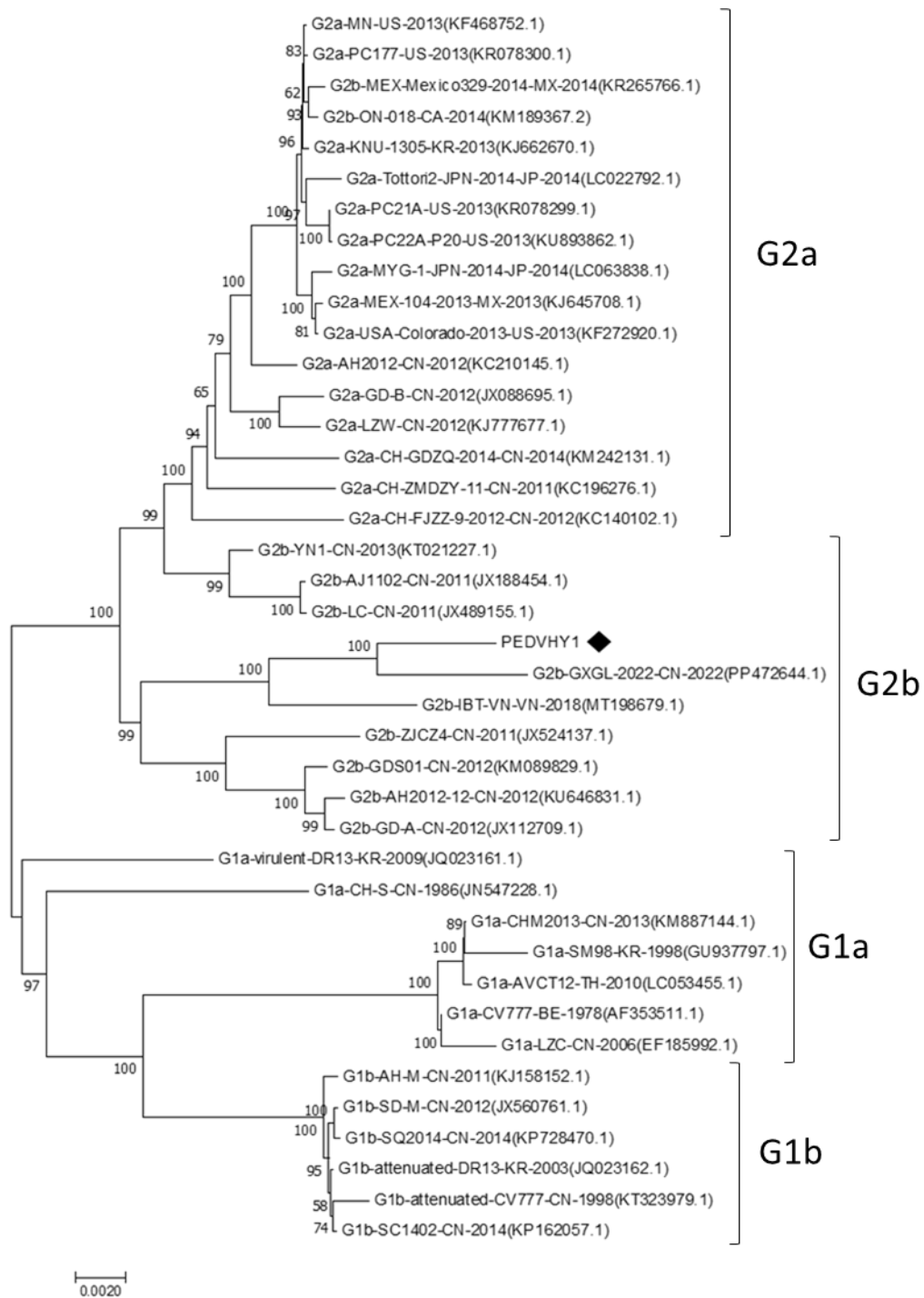
Phân tích phả hệ dựa trên gen S và toàn bộ hệ gen cung cấp cái nhìn tổng quan về mối quan hệ di truyền giữa các chủng PEDV đang lưu hành tại Việt Nam và trên thế giới. Sự phân tích này không chỉ giúp xác định các nhóm genotype mà còn cho phép theo dõi sự tiến hóa của virus qua thời gian và không gian địa lý. Việc hiểu rõ sự tương đồng và khác biệt giữa các genotype PEDV góp phần quan trọng trong việc đánh giá khả năng lan truyền, độc lực của các chủng, và đưa ra các biện pháp phòng ngừa hiệu quả.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích phả hệ nguồn gốc của các chủng PEDV dựa vào dữ liệu nucleotide của gen S là gen quan trọng liên quan đến tính sinh miễn dịch của virus, và toàn bộ hệ gen của virus nhằm đánh giá một cách toàn diện, chính xác nhất về nguồn gốc của chủng virus đang lưu hành tại Việt Nam. Những phân tích này không chỉ cung cấp thông tin về sự phân bố của các nhóm virus mà còn giúp xác định rõ ràng các chủng đang chiếm ưu thế, từ đó hỗ trợ xây dựng chiến lược phòng dịch phù hợp. Kết quả được thể hiện trong Hình 3.4 và 3.5



Hình 3.5. Cây phả hệ xác định mối quan hệ nguồn gốc của các chủng PEDV dựa trên trình tự nucleotide của gen S.

Ghi chú: Chủng PEDVHY1 trong nghiên cứu được đánh dấu bằng hình thoi màu đen. Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7, phương pháp “kết nối liền kề” ((Neighbor-Joining) với hệ số tin tưởng (bootstrap) 1000 lần lặp lại. Vạch ngang ở cuối hình (0.005) biểu thị sai khác nucleotide (1/1000) ở mỗi nhánh.



Hình 3.6. Cây phả hệ xác định mối quan hệ nguồn gốc của các chủng PEDV dựa trên trình tự toàn bộ hệ gen.

Ghi chú: Chủng PEDVHY1 trong nghiên cứu được đánh dấu bằng hình thoi màu đen. Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7, phương pháp “kết nối liền kề” ((Neighbor-Joining) với hệ số tin tưởng (bootstrap) 1000 lần lặp lại. Vạch ngang ở cuối hình (0.002) biểu thị sai khác nucleotide (1/1000) ở mỗi nhánh.

Phân tích phả hệ nguồn gốc cho thấy các chủng PEDV trên thế giới tập trung thành hai nhóm G1 và G2. Trong mỗi nhóm G1 và G2 tiếp tục được chia thành các phân nhóm là G1a và G1b; G2a và G2b.

Cả hai cây phân loại, dựa trên dữ liệu gen S hay dữ liệu toàn bộ hệ gen đều thống nhất xếp loại PEDVHY1 vào genotype G2b cùng với các chủng có nguồn gốc Trung Quốc và Việt Nam. Các genotype còn lại nằm ở các nhánh riêng biệt, có độ tập trung cao theo từng nhóm.

Đáng chú ý là các chủng vaccine CV777, DR13, và SM98 hiện đang được sử dụng đều nằm ở nhóm genotype G1a và G1b.

Kết quả phân loại này phù hợp với nghiên cứu cho rằng các chủng PEDV thuộc genotype 2 có sự phân bố chủ yếu ở khu vực châu Á và Trung Quốc [30]. Ngược lại, hai chủng trong nghiên cứu lại có khoảng cách di truyền xa với các chủng vaccine như CV777, DR13, và SM98.

Tóm lại, một chủng mới có độc lực cao đã được phân lập và xác định, giúp chúng ta hiểu rõ hơn về các đặc điểm phân tử, đánh giá khả năng gây bệnh, các biến thể di truyền/phát sinh loài của chủng PEDV gây bệnh thực địa tại tỉnh Hưng Yên (một trong các tỉnh có quần thể lợn cao nhất) liên quan đến các đợt bùng phát. So sánh toàn bộ bộ gen và các protein cấu trúc cho thấy các chủng PEDV G2 vẫn là nguồn chính gây ra các đợt bùng phát mặc dù đã liên tục tiêm vaccine. Nghiên cứu này cho thấy sự cần thiết trong giám sát dịch tễ học phân tử của PEDV cũng như phát triển các loại vaccine có tính bảo hộ cao với chủng virus đang lưu hành.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

- Đã thu nhận và giải trình tự toàn bộ hệ gen của chủng virus PEDV thu nhận tại tỉnh Hưng Yên, năm 2023 gồm 28.212 nucleotide, kí hiệu PEDVHY1.

- Đã phân tích đặc điểm phân tử gen kháng nguyên S và S1 của chủng virus PEDV gây bệnh. Kết quả cho thấy gen S1 có kích thước 2205 nucleotide mã hóa cho 735 amino acid; gen S hoàn chỉnh có kích thước 4158 nucleotide mã hóa cho 1386 amino acid. Protein S1 chứa nhiều đột biến, đặc biệt là đột biến chèn đoạn và xóa đoạn so với chủng virus nhược độc vaccine.

- Phân tích phả hệ nguồn gốc dựa trên dữ liệu nucleotide toàn bộ hệ gen, dữ liệu gen S và dữ liệu gen S1 đều đồng nhất cho thấy chủng virus PEDV gây bệnh thuộc genotype G2b, là chủng virus đang lưu hành phổ biến hiện nay ở Việt Nam và trên thế giới, khác nhóm với chủng virus vaccine DR13 và CV777 nhược độc đều thuộc genotype G1.

2. Kiến nghị

Cần tiếp tục thu nhận và giải mã gen S cũng như toàn bộ hệ gen của các chủng PEDV ở nhiều tỉnh thành khác nhau để đưa ra được đánh giá tổng quan nhất về dịch tễ học phân tử của PEDV trên toàn quốc hiện nay.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Pospischil A., Stuedli A., Kiupel M., 2002, Diagnostic notes: update on porcine epidemic diarrhea, *Journal of Swine Health and Production*, 10(2): pp. 81-85.
2. Pensaert M., De Bouck P., 1978, A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine, *Archives of virology*, 58: pp. 243-247.
3. Schoch C.L., Ciufo S., Domrachev M., Hotton C.L., Kannan S., Khovanskaya R., Leipe D., McVeigh R., O'Neill K., Robbertse B., Sharma S., Soussov V., Sullivan J.P., Sun L., Turner S., Karsch-Mizrachi I., 2020, NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools, *Database (Oxford)*, 2020.
4. Lee C., Zakaryan H., 2019, Porcine viruses: from pathogenesis to strategies for control.
5. Kocherhans R., Bridgen A., Ackermann M., Tobler K., 2001, Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence, *Virus genes*, 23: pp. 137-144.
6. Guo J., Fang L., Ye X., Chen J., Xu S., Zhu X., Miao Y., Wang D., Xiao S., 2019, Evolutionary and genotypic analyses of global porcine epidemic diarrhea virus strains, *Transboundary and emerging diseases*, 66(1): pp. 111-118.
7. Pensaert M.B., Martelli P., 2016, Porcine epidemic diarrhea: a retrospect from Europe and matters of debate, *Virus research*, 226: pp. 1-6.
8. Sun Y., Chen Y., Han X., Yu Z., Wei Y., Zhang G., 2019, Porcine epidemic diarrhea virus in Asia: An alarming threat to the global pig industry, *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 70: pp. 24-26.
9. Fan B., Jiao D., Zhang R., Zhou J., Guo R., Yu Z., Shi D., Zhao Y., Gu J., Niu B., 2020, Origin and epidemic status of porcine epidemic diarrhea virus variants in China, *Transboundary and emerging diseases*, 67(3): pp. 1364-1370.
10. Park S.-J., Song D.-S., Ha G.-W., Park B.-K., 2007, Cloning and further sequence analysis of the spike gene of attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13, *Virus genes*, 35: pp. 55-64.
11. Zhao M., Sun Z., Zhang Y., Wang G., Wang H., Yang F., Tian F., Jiang S., *Complete genome sequence of a Vero cell-adapted isolate of porcine epidemic diarrhea virus in eastern China*. 2012, Am Soc Microbiol.
12. Guo X., Hu H., Chen F., Li Z., Ye S., Cheng S., Zhang M., He Q., 2016, iTRAQ-based comparative proteomic analysis of Vero cells infected with virulent and CV777 vaccine strain-like strains of porcine epidemic diarrhea virus, *Journal of Proteomics*, 130: pp. 65-75.
13. Duy D.T., Nguyen T.T., Puranaveja S., Thanawongnuwech R., 2011, Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)

- isolates from southern Vietnam during 2009-2010 outbreaks, *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 41(1): pp. 55-64.
14. Chasey D., Cartwright S., 1978, Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea, *Research in veterinary science*, 25(2): pp. 255.
 15. Takahashi K., Okada K., Ohshima K., 1983, An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan, *Nihon Juigaku Zasshi*, 45(6): pp. 829-32.
 16. Chen J.-F., Sun D.-B., Wang C.-B., Shi H.-Y., Cui X.-C., Liu S.-W., Qiu H.-J., Feng L., 2008, Molecular characterization and phylogenetic analysis of membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea virus isolates in China, *Virus Genes*, 36: pp. 355-364.
 17. Cheun-Arom T., Temeeyasen G., Tripipat T., Kaewprommal P., Piriyaongsa J., Sukrong S., Chongcharoen W., Tantituvanont A., Nilubol D., 2016, Full-length genome analysis of two genetically distinct variants of porcine epidemic diarrhea virus in Thailand, *Infection, Genetics and Evolution*, 44: pp. 114-121.
 18. Stevenson G.W., Hoang H., Schwartz K.J., Burrough E.R., Sun D., Madson D., Cooper V.L., Pillatzki A., Gauger P., Schmitt B.J., 2013, Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences, *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 25(5): pp. 649-654.
 19. Lee S., Lee C., 2014, Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US strains, South Korea, 2013, *Emerging Infectious Diseases*, 20(7): pp. 1223.
 20. Hanke D., Jenckel M., Petrov A., Ritzmann M., Stadler J., Akimkin V., Blome S., Pohlmann A., Schirrmeyer H., Beer M., 2015, Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014, *Emerging infectious diseases*, 21(3): pp. 493.
 21. Lin C.-N., Chung W.-B., Chang S.-W., Wen C.-C., Liu H., Chien C.-H., Chiou M.-T., 2014, US-like strain of porcine epidemic diarrhea virus outbreaks in Taiwan, 2013–2014, *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(9): pp. 1297-1299.
 22. Van Diep N., Norimine J., Sueyoshi M., Lan N.T., Hirai T., Yamaguchi R., 2015, US-like isolates of porcine epidemic diarrhea virus from Japanese outbreaks between 2013 and 2014, *Springerplus*, 4: pp. 1-10.
 23. Lin C.-M., Saif L.J., Marthaler D., Wang Q., 2016, Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains, *Virus research*, 226: pp. 20-39.
 24. Diep N., Sueyoshi M., Izzati U., Fuke N., Teh A., Lan N., Yamaguchi R., 2018, Appearance of US-like porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) strains before US outbreaks and genetic heterogeneity of PEDV s collected in Northern Vietnam during 2012–2015, *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(1): pp. e83-e93.

25. He W.-T., Bollen N., Xu Y., Zhao J., Dellicour S., Yan Z., Gong W., Zhang C., Zhang L., Lu M., 2022, Phylogeography reveals association between swine trade and the spread of porcine epidemic diarrhea virus in China and across the world, *Molecular Biology and Evolution*, 39(2): pp. msab364.
26. Than V.T., Choe S.E., Vu T.T., Do T.D., Nguyen T.L., Bui T.T., Mai T.N., Cha R.M., Song D., An D.J., 2020, Genetic characterization of the spike gene of porcine epidemic diarrhea viruses (PEDVs) circulating in Vietnam from 2015 to 2016, *Veterinary medicine and science*, 6(3): pp. 535-542.
27. Kim Y.K., Lim S.-I., Lim J.-A., Cho I.-S., Park E.-H., Le V.P., Hien N.B., Thach P.N., Quynh D.H., Vui T.Q., 2015, A novel strain of porcine epidemic diarrhea virus in Vietnamese pigs, *Archives of virology*, 160: pp. 1573-1577.
28. Mai T.N., Yamazaki W., Bui T.P., Nguyen V.G., Le Huynh T.M., Mitoma S., Daous H.E., Kabali E., Norimine J., Sekiguchi S., 2020, A descriptive survey of porcine epidemic diarrhea in pig populations in northern Vietnam, *Tropical Animal Health and Production*, 52: pp. 3781-3788.
29. Myint O., Hoa N.T., Fuke N., Pornthummawat A., Lan N.T., Hirai T., Yoshida A., Yamaguchi R., 2021, A persistent epidemic of porcine epidemic diarrhoea virus infection by serological survey of commercial pig farms in northern Vietnam, *BMC Veterinary Research*, 17: pp. 1-6.
30. Lee C., 2015, Porcine epidemic diarrhea virus: an emerging and re-emerging epizootic swine virus, *Virology journal*, 12: pp. 1-16.
31. Zheng L., Wang X., Guo D., Cao J., Cheng L., Li X., Zou D., Zhang Y., Xu J., Wu X., 2021, Porcine epidemic diarrhea virus E protein suppresses RIG-I signaling-mediated interferon- β production, *Veterinary Microbiology*, 254: pp. 108994.
32. Lai M., Perlman S., Anderson L., *Coronaviridae In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B. & Straus SE (Eds), Fields virology 5th edition (pp. 1305–1336). Philadelphia, PA, USA: Williams. 2007, Lippincott, & Wilkins.*[Google Scholar].
33. Puranaveja S., Poolperm P., Lertwatcharasarakul P., Kesdaengsakonwut S., Boonsoongnern A., Urairong K., Kitikoon P., Choojai P., Kedkovid R., Teankum K., 2009, Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhea virus, Thailand, *Emerging Infectious Diseases*, 15(7): pp. 1112.
34. Utiger A., Tobler K., Bridgen A., Suter M., Singh M., Ackermann M., *Identification of proteins specified by porcine epidemic diarrhoea virus.* 1995: Springer.
35. de Haan C.A., Kuo L., Masters P.S., Vennema H., Rottier P.J., 1998, Coronavirus particle assembly: primary structure requirements of the membrane protein, *J Virol*, 72(8): pp. 6838-50.

36. Zhang Q., Shi K., Yoo D., 2016, Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1, *Virology*, 489: pp. 252-68.
37. Xu X.G., Zhang H.L., Zhang Q., Dong J., Huang Y., Tong D.W., 2015, Porcine epidemic diarrhea virus M protein blocks cell cycle progression at S-phase and its subcellular localization in the porcine intestinal epithelial cells, *Acta Virol*, 59(3): pp. 265-75.
38. McBride R., Van Zyl M., Fielding B.C., 2014, The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein, *Viruses*, 6(8): pp. 2991-3018.
39. Ding Z., Fang L., Jing H., Zeng S., Wang D., Liu L., Zhang H., Luo R., Chen H., Xiao S., 2014, Porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein antagonizes beta interferon production by sequestering the interaction between IRF3 and TBK1, *J Virol*, 88(16): pp. 8936-45.
40. Liwnaree B., Narkpuk J., Sungsuwan S., Jongkaewwattana A., Jaru-Ampornpan P., 2019, Growth enhancement of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Vero E6 cells expressing PEDV nucleocapsid protein, *PLoS One*, 14(3): pp. e0212632.
41. Liu C., Tang J., Ma Y., Liang X., Yang Y., Peng G., Qi Q., Jiang S., Li J., Du L., 2015, Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus, *Journal of virology*, 89(11): pp. 6121-6125.
42. Suzuki T., Terada Y., Enjuanes L., Ohashi S., Kamitani W., 2018, S1 subunit of spike protein from a current highly virulent porcine epidemic diarrhea virus is an important determinant of virulence in piglets, *Viruses*, 10(9): pp. 467.
43. Li C., Li W., Lucio de Esarte E., Guo H., van den Elzen P., Aarts E., van den Born E., Rottier P.J., Bosch B.-J., 2017, Cell attachment domains of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein are key targets of neutralizing antibodies, *Journal of virology*, 91(12): pp. 10.1128/jvi.00273-17.
44. Chang C.-Y., Cheng I.-C., Chang Y.-C., Tsai P.-S., Lai S.-Y., Huang Y.-L., Jeng C.-R., Pang V.F., Chang H.-W., 2019, Identification of neutralizing monoclonal antibodies targeting novel conformational epitopes of the porcine epidemic diarrhoea virus spike protein, *Scientific reports*, 9(1): pp. 2529.
45. Ji Z., Shi D., Shi H., Wang X., Chen J., Liu J., Ye D., Jing Z., Liu Q., Fan Q., 2021, A porcine epidemic diarrhea virus strain with distinct characteristics of four amino acid insertion in the COE region of spike protein, *Veterinary Microbiology*, 253: pp. 108955.
46. Jang G., Lee D., Shin S., Lim J., Won H., Eo Y., Kim C.-H., Lee C., 2023, Porcine epidemic diarrhea virus: An update overview of virus epidemiology, vaccines, and control strategies in South Korea, *Journal of Veterinary Science*, 24(4).
47. Chang S.-H., Bae J.-L., Kang T.-J., Kim J., Chung G.-H., Lim C.-W., Laude H., Yang M.-S., Jang Y.-S., 2002, Identification of the epitope

- region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus, *Molecules and cells*, 14(2): pp. 295-299.
48. Sun J., Li Q., Shao C., Ma Y., He H., Jiang S., Zhou Y., Wu Y., Ba S., Shi L., 2018, Isolation and characterization of Chinese porcine epidemic diarrhea virus with novel mutations and deletions in the S gene, *Veterinary Microbiology*, 221: pp. 81-89.
 49. Callebaut P., Debouck P., Pensaert M., 1982, Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the coronavirus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea, *Veterinary microbiology*, 7(4): pp. 295-306.
 50. Kim Y., Krishna V.D., Torremorell M., Goyal S.M., Cheeran M.C.-J., 2018, Stability of porcine epidemic diarrhea virus on fomite materials at different temperatures, *Veterinary sciences*, 5(1): pp. 21.
 51. Jung K., Saif L.J., 2015, Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis, *The Veterinary Journal*, 204(2): pp. 134-143.
 52. Jung K., Saif L.J., Wang Q., 2020, Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): An update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control, *Virus research*, 286: pp. 198045.
 53. Sun R.-Q., Cai R.-J., Chen Y.-Q., Liang P.-S., Chen D.-K., Song C.-X., 2012, Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China, *Emerging infectious diseases*, 18(1): pp. 161.
 54. Gallien S., Moro A., Lediguerher G., Catinot V., Paboeuf F., Bigault L., Berri M., Gauger P.C., Pozzi N., Authié E., 2018, Evidence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-free boars, *Veterinary research*, 49: pp. 1-9.
 55. Li Y., Wu Q., Huang L., Yuan C., Wang J., Yang Q., 2018, An alternative pathway of enteric PEDV dissemination from nasal cavity to intestinal mucosa in swine, *Nature communications*, 9(1): pp. 3811.
 56. Bowman A.S., Krogwold R.A., Price T., Davis M., Moeller S.J., 2015, Investigating the introduction of porcine epidemic diarrhea virus into an Ohio swine operation, *BMC veterinary research*, 11: pp. 1-7.
 57. Lowe J., Gauger P., Harmon K., Zhang J., Connor J., Yeske P., Loula T., Levis I., Dufresne L., Main R., 2014, Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States, *Emerging infectious diseases*, 20(5): pp. 872.
 58. Li B., Ge J., Li Y., 2007, Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus, *Virology*, 365(1): pp. 166-172.
 59. Nam E., Lee C., 2010, Contribution of the porcine aminopeptidase N (CD13) receptor density to porcine epidemic diarrhea virus infection, *Veterinary microbiology*, 144(1-2): pp. 41-50.
 60. Nguyễn T.T., 2018, Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ học của bệnh tiêu chảy thành dịch ở lợn (PED) tại miền bắc Việt Nam: Luận án tiến sĩ. Chuyên ngành Dịch tễ học thú y: 9640108 [Tài nguyên điện tử].

61. Thăng L.T., Việt V.Đ., Anh Đ.L., 2020, Xác định một số đặc điểm bệnh lý của lợn mắc dịch tiêu chảy cấp do porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) gây ra trên lợn con theo mẹ tại các vùng sinh thái ở tỉnh Thanh Hóa, *Tạp chí Khoa học và công nghệ nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm Huế*, 4(2): pp. 1922-1927.
62. Sasaki Y., Alvarez J., Sekiguchi S., Sueyoshi M., Otake S., Perez A., 2016, Epidemiological factors associated to spread of porcine epidemic diarrhea in Japan, *Preventive veterinary medicine*, 123: pp. 161-167.
63. Nilubol D., Khatiworavage C., 2012, Comparative efficacy of oral administration of minced piglet intestine vs intramuscular vaccination in the control porcine epidemic diarrhea in gilts, *IPVS, Jeju, Korea*, 381.
64. Wang P.-H., Li Y.-Q., Pan Y.-Q., Guo Y.-Y., Guo F., Shi R.-Z., Xing L., 2021, The spike glycoprotein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in China, *Veterinary Research*, 52(1): pp. 87.
65. Huang Y.-W., Dickerman A.W., Piñeyro P., Li L., Fang L., Kiehne R., Opriessnig T., Meng X.-J., 2013, Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States, *MBio*, 4(5): pp. 10.1128/mbio.00737-13.
66. Tran T.X., Lien N.T.K., Thu H.T., Duy N.D., Duong B.T.T., Quyen D.V., 2021, Changes in the spike and nucleocapsid protein of porcine epidemic diarrhea virus strain in Vietnam-a molecular potential for the vaccine development?, *PeerJ*, 9: pp. e12329.
67. Duong B.T.T., Thao P.T.P., Hoa N.T., Thu H.T., Phuoc M.H., Le T.H., Van Quyen D., 2022, Molecular analysis reveals a distinct subgenogroup of porcine epidemic diarrhea virus in northern Vietnam in 2018-2019, *Arch Virol*, 167(11): pp. 2337-2346.
68. Fan B., Jiao D., Zhao X., Pang F., Xiao Q., Yu Z., Mao A., Guo R., Yuan W., Zhao P., He K., Li B., 2017, Characterization of Chinese Porcine Epidemic Diarrhea Virus with Novel Insertions and Deletions in Genome, *Scientific Reports*, 7(1): pp. 44209.
69. Nicholas K.B., Nicholas H.B. *GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments*. 1997.
70. Kumar S., Stecher G., Tamura K., 2016, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Molecular biology and evolution*, 33(7): pp. 1870-1874.
71. Le V.P., Song S., An B.H., Park G.N., Pham N.T., Le D.Q., Nguyen V.T., Vu T.T.H., Kim K.S., Choe S., An D.J., 2018, A novel strain of porcine deltacoronavirus in Vietnam, *Arch Virol*, 163(1): pp. 203-207.
72. Ma Y., Zhang Y., Liang X., Lou F., Oglesbee M., Krakowka S., Li J., 2015, Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States, *mBio*, 6(2): pp. e00064.
73. Jarvis M.C., Lam H.C., Zhang Y., Wang L., Hesse R.A., Hause B.M., Vlasova A., Wang Q., Zhang J., Nelson M.I., 2016, Genomic and evolutionary inferences between American and global strains of porcine

- epidemic diarrhea virus, *Preventive Veterinary Medicine*, 123: pp. 175-184.
74. Jang G., Park J., Lee C., 2021, Successful eradication of porcine epidemic diarrhea in an enzootically infected farm: a two-year follow-up study, *Pathogens*, 10(7): pp. 830.

PHỤ LỤC

Trình tự toàn bộ hệ gen của chủng PEDVHY1:

Trình tự gen ORF1a:

ATGGCTAGCAACCATGTTACATTGGCTGTTGCCAATGATGCAGAAATTCAGC
 CTTTGGCTTTTGCAGTGTAGTGAAGCCGTCTCATACTATTCTGAGGCCGCCG
 TAGTGGATTTATGCAATGCCGTTTTGTGTCCTTCGATCTCGTTGACACTGTTGA
 GGGATTGCTTCCCGAAGACTATGTCATGGTTGTGGTCGGCACTACCAAGCTTA
 GTGCGTATGTGGACACTTTTGGTAGCCGCCCCAGAAATATTTGTGGTTGGCTAT
 TATTTTCTAACTGTAATTACTTCCCTCGAAGAGTTAGAGCTCACTTTTGGTCGTC
 GTGGTGGTAACATCGTGCCAGTTGATCAATACATGTGTGGCGCTGACGGGAAA
 CCTGTTCTTCAGGAATCCGAGTGGGAGTATACAGACTTCTTTGCTGACTCCGAG
 GACGGTCAACTCAACATTGCTGGGATCACTTATGTGAAGGCCTGGATTGTAGA
 GCGGTCGGATGTCTCTTATGCGAGTCAGAATTTAACATCTATTAATCTATTAC
 TTATTGTTCAACCTATGAGCATACTTTTCCCTGATGGTACCGCCATGAAGGTTGC
 ACGTACTCCAAAGATCAAGAAGAATGTTGTCTTGTCTGAGCCACTTGCTACTAT
 CTACAGGGAAATTGGTTCTCCTTTTGTGGATAATGGGAGCGATGCTCGTTCTAT
 CATTAAAGAGACCAGTGTTCCCTCCACGCTTTTGTAAAGTGTAAGTGTGGTAGTTA
 TCATTGGACTGTTGGTGATTGGACTTCTATGTCTCCACCTGCTGTGGCTTTAA
 GTGCAAGCCAGTCCTTGTGGCTTCATGTTCTGCTACACCTGGTTCTGTTGTGGT
 TACGCGCGCTGGTGCTGGCACTGGTGTTAAGTATTACAACAACATGTTCCCTGCG
 CCATGTGGCAGACATTGACGGGTTGGCATTCTGGCGAATTCTTAAGGTGCAGT
 CCAAAGACGACCTCGCTTGTCTGGTAAATTCCTTGAACACCATGAGGAAGGT
 TTCACAGATCCTTGCTACTTTTTGAATGACTCGAGCATTGCTACTAAGCTCAAG
 TTTGACATCCTTAGTGGCAAGTTTTCTGATGAAGTCAAACAAGCTATCTTTGCT
 GGTGATGTTGTTGTTGGCAGTGCCTCGTTGACATTGTTGACGATGCACTGGGA
 CAACCTTGGTTTATACGTAAGCTTGGTGACCTTGCAAGTGCAGCCTGGGAGCA
 GCTTAAGGCTGTGCTTAGAGGCCTTAACCTTCTGTCTGATGAAGTCGTGCTCTT
 TGGCAAAGACTTAGCTGTGCCACTCTTAGTATCGTTAACGGTGTTTTTTGAGTT
 TGTCGCCGAAGTGCCAGAGAAGTTGGCTGCGGCTGTTACAGTTTTTTGTCAACTT
 TTTGAATGAGCTTTTTGAGTCTGCCTGTGACTGTTTAAAGGTCGGAGGTA
 AAACCTTTAACAGGGTTGGCTCTTATGTTCTTTTTGATAATGCATTGGTTAAGCTTGT
 C
 AATGCAAAGTTTCGCGGCCACGACAGGCAGGTGTTTGTGAAGTTCGTTACAC
 AAGCCTTGTTATTGGAAGTACCACCAAGGTGGTTTCCAAGCGGTTGAAAATG
 CCAATGTGAATCTCATCGTCGTTGACGAGGATGTGACTCTCAACACCACTGGTC
 GTACAGTTGTTGTTGATGGACTTGCATTCTTCGAGAGTGACGGGTTTTACAGAC
 ATCTTGCTGATGCTGACGTTGTCATTGAACATCCTGTTTATAAGTCTGCTTGTG
 GGCTCAAGCCAGTCTTTGAGTGTGACCCAATACCTGATTTTCCCATGCCTGTGG
 CCGCTAGTGTTGCAGAGCTTTGTGTGCAAACCTGACCTGTTGCTTAAAAATTACA

ACACTCCTTATAAACTTACAGCTGTGTGGTGAGAGGTGATAAGTGTTGCATT
ACTTGCACCTTACATTTACAGCACCAAGTTATATGGAGGATGCTGCTAATTTT
GTAGACCTCTGTACCAAGAACATTGGTACTGCTGGTTTTTCATGAGTTTTATATT
ACGGCCCATGAACAACAGAATCTGCAAGGGTTCGTAACCACTTGTTGCACGAT
GTCAGGTTTTGAGTGTTTTATGCCTATAATCCCACAGTGTCCAGCAGTGCTTGA
AGAGATTGATGGTGGTAGCATCTGGCGGTCTTTTATCACTGGTCTTAATACAAT
GTGGGATTTTTGCAAGCATCTTAAAGTCAGCTTTGGACTAGATGGCATTGTTGT
CACTGTAGCACGCAAATTTAAACGACTTGGTGCTCTCTTGGCAGAAATGTATA
ACACTTACCTTTCAACTGTGGTGGAAAACCTGGTACTGGCCGGTGTTAGCTTCA
AGTATTATGCCACCAGTGTCCCAAAAATTGTTTTGGGCTGTTGTTTTTACAGTG
TAAAAGTGTTCTTGCAAGTGCCTTCCAGATTCTGTCCAGGCAGGCATTGAGA
AGTTTAAAGTCTTTCTTAACTGTGTTACCCTGTTGTACCACGCGTCATTGAAA
CTTCTTTTGTGGAATTAGAAGAGACGACATTTAAACCACCAGCACTCAATGGT
AGTATTGCTGTTGTTGATGGCTTTGCTTTCTATTATGATGGAACACTATACTATC
CTACCGATGGTAATAGTGTGTGCCTATCTGTTTTAAGAAGAAGGGTGGTGGT
GATGTCAAATTCTCTGATGAAGTCTCTGTTAGAACCATTGACCCAGTTTATAAG
GTCTCCCTTGAATTTGAGTTCGAGTCTGAGACTATTATGGCTGTGCTTAATAAG
GCTGTTGGTAATCGTATCAAGGTTACAGGTGGTTGGGACGATGTTGTTGATTAT
ATCAACGTTGCCATTGAGGTTCTTAAAGATCACATCGATGTGCCTAAGTACTAC
ATTTATGATGAGGAAGGTGGCACCGATCCTAATATTCCCGTAATGGTTTCTCAG
TGGCCGCTGAATGATGACACGACCTCACAGGATCTGCTTGACGTGGAAGTTGT
TACGGATGCACCAATTGATTCCGAGGGTGATGAAGTGGCCTCCTCTGACCCTG
ATAAGGTGGCAGATGTGGCTAACTCTGAGCCTGAGGATGATGGTCTTAATGTA
GCTCCTGAAACAAATGTAGAGTCTGAAGTTGAGGAAGTTGCCGCAACCTTGTC
CTTTATTAAGATACACCTTCCACAGTTACTAAGGATCCTTTTGCTTTTGATTTT
GCAAGCTATGGAGGACTTAAGGTTTTAAGACAATCTCATAACAACCTGCTGGGT
TACTTCTACCTTGGTGCAGCTACAATTGCTTGGCATCTTTGATGACCCTGCAAT
GGAGCTTTTTAGTGCTGGTAGAGTTGGTCCAATGGTTCGCAAATGCTATGAGTC
ACAAAAGGCTATCTTGGGATCTTTGGGTGATGTGTCGGCTTGCCTAGAGTCTCT
GACTAAGGACCTACACACACTTAAGATTACTTGTCTGTAGTCTGTGGTTGTGG
TACTGGTGAACGTATTTATGAGGGTTGTGCTTTTCGTATGACGCCAACTTTGGA
ACCGTCCCATATGGTGCTTGTGCCAGTGTGCTCAAGTTTTGGTGCACACTTT
TAAAAGTATTGTTGGCACCGGCATCTTTGTGCGAGATACTACTGCTCTCTCCTT
GGATTCTTTGGTTGTAAAACCTCTTTGTGCGGCTGCTTTTATAGGCAAGGATAG
TGGTCATTATGTCACCAACTTTTATGATGCTGCTATGGCTATTGATGGTTATGG
TCGTCATCAGATAAAGTATGACACACTGAACACCATTTGTGTTAAAGACGTTA
ATTGGACAGCACCTTCTGTCCCTGACGTTGAGCCTGTATTGAAGCCTGTTGTCA
AACCTTTCTATTCTTATAAGAATGTTGATTTTTATCAAGGAGATTTTAGTGACC
TTGTTAAGCTTCCATGTGACTTTGTTGTTAATGCTGCAAATGAGAATTTGTCTC
ACGGTGGCGGCATAGCAAAGGCCATTGATGTTTATACCAAGGGCATGTTGCAG

AAGTGCTCAAATGATTACATTAAGCACACGGTCCCATTAAAGTTGGACGTGG
TGTCATGTTGGAGGCATTAGGTCTTAAGGTCTTTAATGTTGTTGGTCCACGTAA
GGGTAAGCATGCACCTGAGCTTCTTGTTAAGGCTTATAAGTCCGTTTTTGCTAA
TTCAGGTGTTGCTCTTACACCTTTGATTAGTGTTGGAATTTTTAGTGTTCCTTTG
GAAGAATCTTTATCTGCTTTTCTTGCATGTGTTGGTGATCGCCACTGTAAGTGC
TTTTGTTATAGTGACAAAGAGCGCGATGCGATCATTAATTACATGGATGGCTTG
GTAGATGCTATTTTCAAAGAAGCGCTTGTTGATACCACTCCTGTCCAGGAAGAT
GTTCAACAAGTTTCACAAAAACCAGTTTTGCCTAATTTGAACCTTTCAGGATT
GAAGGTGCTCATGCTTTCTATGAGTGTAACCCTGAAGGTTTGATGTCCTTAGGT
GCTGACAAGCTGGTGTGTTTACAAATTCCACTTTGGATTTTTGTAGCGTTGGT
AAGTGTCTTAACAATGTGACCGGCGGTGCATTGCTTGAAGCCATAAATGTATTT
AAAAAGAGTAACAAAACAGTGCCTGCTGGCAACTGTGTTACTTTTGAGTGTGC
AGATATGATTTCTATTACTATGGTAGTATTGCCAGCTGATGGTGTAGCTAATTA
TGACAAAAATTATGCACGGGCCGTTGTTAAGGTATCTAAGCTTAAAGGCAAGT
TATTGCTTGCTGTTGATGATGCCACGTTGTATTCCAAGTTGTCCCACCTTAGCG
TGGTAGGTTTCGTATCCACACCTGATGATGTGGAGCGTTTCTACGCAAATAAG
AGTGTGGTTATTAAGTCACTGAGGATACACGTAGTGTTAAGGCTGTTAAAGT
GGAATCTACTGTTACTTATGGACAACAAATCGGACCTTGTCTTGTTAATGACAC
CGTTGTACAGACAACAAACCTGTTGTTGCTGATGTTGTAGCTAAGGTTGTACC
AAGTGCTAATTGGGATTCACATTATGGTTTTGATAAGGCTGGTGAGTTCCATAT
GCTAGACCATACTGGTTTTGCCTTTTCTAGTGAAGTTGTTAATGGTAGGCGTGT
GCTTAAAACCACAGATAATAACTGTTGGGTTAATGTTACATGTTTACAATTACA
GTTTGCTAGATTTAGGTTCAAGTCAGCAGGTCTACAGGCTATGTGGGAGTCCTA
TTGTACTGGTGTGTTGCTATGTTTGTGCATTGGTTGTACTGGCTTACTGGTGT
GACAAAGGTCAGCCTAGTGATTCAGAAAATGCACTTAACATGTTGTCTAAGTA
CATTGTTCCCTGCTGGTTCTGTCACTATTGAACGTGTCACGCATGACGGCTGTTG
TTGTAGTAAACGTGTTGTCACTGCACCAGTTGTTAATGCTAGCGTTTTGAAGCT
TGGCGTCGAGGATGGTCTTTGTCCACATGGTCTTAACTACATTGACAAAGTTGT
TGTAAGTTAAAGGTAATAACAATTGTTGTCAATGTTGGGAAACCTGTGGTGGCAC
CATCACACCTCTTTCTCAAGGGTGTTCCTACACAACATTCCTAGATAATGGTA
ACGGTGTGTCGGCCATTATACTGTTTTTGATCATGACACTGGCATGGTGTATG
ATGGAGATGCTTTTGTACCGGGTGATCTTAATGTATCCCCTGTTACAAATATTG
TTGTCTCAGAGCAGACGGCTGTTGTGATTAAAGACCCCGTGAAGAAAGTAGAG
TTGGACGCTACAAAGCTGTTAGACACTATGAATTATGCATCGGAAAGATTCTTT
TCCTTTGGTGATTTTCATGTCACGTAATTTAATTACAGTGTTTTTGTACATCCTTA
GCATTTTGGGTCTCTGTTTTAGGGCCTTTCGTAAGAGAGATGTTAAAGTTCTAG
CTGGTGTGCCCCAACGTACTGGTATTATATTGCGTAAAAGTGTGCGCTATAATG
CAAAGGCGTTGGGTGTCTTTTTCAAGCTAAAGCTTTATTGGTTCAAAGTTCTTG
GTAAGTTTAGTTTGGGTGTTTATGCATTGTATGCACTACTATTCATGACAATAC
GCTTTACACCTATAGGTGGCCCTGTTTGTGATGATGTTGTTGCTGGTTATGCTA

ATTCTAGTTTTGACAAGAATGAGTATTGCAACAGTGTTATTTGTAAGGTCTGTC
TATATGGGTACCAGGA ACTCTCGGACTTCTCTCACACACAGGTAGTATGGCAA
CACCTTAGAGACCCATTAATTGGTAATGTGATGCCTTTCTTTTATTTGGCATTTT
TGGCAATTTTTGGGGGTGTTTATGTAAAGGCTATTACTCTCTATTTTATTTTTCA
GTATCTTAACATTCTTGGTGTGTTTTTGGGCTTACAACAGTCCATTTGGTTTTTG
CAGCTTGTGCCTTTTGATGTTTTTGGCGACGAGATCGTCGTCTTTTTCATCGTTA
CACGCGTATTGATGTTCCCTTAAGCATGTTTTCCCTTGGCTGTGATAAGGCATCTT
GTGTGGCTTGCTCTAAGAGTGCTCGTCTTAAGCGCGTTCCTATTCAGACTATCT
TTCAGGGTACTAGCAAATCCTTCTACGTACATGCCAATGGTGGTTCTAAGTTCT
GTAAGAAGCACAATTTCTTTTGTTTAAATTGTGATTCTTATGGTCCAGGCTGCA
CTTTTATTAATGACGTCATTGCAACTGAAGTTGGTAATGTCGTCAA ACTTAATG
TGCAACCCACAGGTCCTGCCACTATTCTTATTGACAAGGTTGAATTCAGTAATG
GTTTTTACTATCTTTATAGTGGTGACACATTTTGGGAAGTACA ACTTTGACATAA
CAGATAGCAAATACACTTGCAAAGAGGCACTTAAAAATTGTGGCATAATCACA
GACTTTATTGTTTTTAACAATAATGGTTCCAATGTAAATCAGGTTAAGAATGCA
TGTGTGTATTTTTACAGATGCTTTGTAAACCTGTAAATTAGTGGACTCAGCG
TTGTTGGCCAGTTTGTCTGTTGATTTTGGTGCAAGTTTACATAGTGCTTTTGTTA
GTGTGTTGTGGAATAGTTTCGGCAAAGACCTGTCAAGTTGTAATGACATGCAG
GATTGCAAGAGCACATTGGGTTTTGATGATGTACCATTGGATACCTTTAATGCT
GCTGTTGCTGAGGCTCATCGTTATGATGTCCTCTTGACTGACATGTCATTCAAC
AATTTTACCACCAGTTACGCAAACCAGAGGAAAAATTTCCCGTCCATGACAT
TGCCACGTGTATGCGTGTAGGTGCCAAGATTGTTAATCATAATGTTCTTGTCAA
GGATAGTATACCTGTGGTGTGGCTTGTACGTGACTTCATTGCCCTTTCGGAAGA
AACTAGGAAGTACATTATTCGTACGACTAAAGTTAAGGGTATAACATTTATGC
TGACCTTTAATGATTGTCGTATGCATACTACCATACTACTGTTTGCATTGCAA
ATAAGAAGGGTGCGGGTCTTCCTAGTTTTTCAAAGGTTAAGAAATTCTTTTGGT
TTTTGTGTCTTTTCGTAGTTGCTGTTTTCTTTTCACTAAGCTTTCTTGATTTTAGT
ATTCAGGTTAGCAGTGATAGCGATTATGATTTCAAGTATATTGAGAGTGGCCA
GTTGAAGACTTTTGACAATCCACTTAGTTGTGTGCATAATGCTTTTAGTA ACTT
CGACCAGTGGCATGATGCCAAGTTTGGTTTCACCCCGTCAACAATCCTAGTTG
TCCTATAGTTGTTGGTGTATCAGACGAAGCTCGCACTGTTCCAGGTATCCCAGC
AGGTGTTTATTTAGCTGGTAAAACACTTGTGTTTGGCTATTAACACCATTTTTGG
TACATCTGGTTTGTGCTTTGATGCTAGTGGCGTTGCTGATAAGGGCGCTTGCAT
TTTTAATTCGGCTTGCACCACATTATCTGGTTTGGGTGGA ACTGCTGTCTACTG
TTATAAGAATGGTCTAGTTGAAGGTGCTAAACTTTATAGTGAGTTGGCACCTCA
TAGCTACTATAAAATGGTAGATGGTAATGCTGTGTCTTTACCTGAAATTATCTC
ACGCGGCTTTGGCATCCGTA CTATCCGTACAAAGGCTATGACCTACTGTCGCGT
TGGCCAGTGTGTGCAATCTGCAGAAGGTGTTTTGTTTTGGCGCCGATAGATTCTT
TGTCTATAATGCAGAATCTGGTTCTGACTTCGTTTGTGGCACGGGGCTCTTCAC
ATTGTTGATGAATGTTATTAGTGTTTTTTCCAAGACAGTACCAGTA ACTGTGTT

GTCTGGTCAAATACTTTTTAATTGCATTATTGCTTTTGCAGCTGTTGCCGTGTGT
TTCTTATTTACAAAGTTTAAGCGCATGTTTCGGTGATATGTCTGTTGGCGTTTTCA
CTGTCGGTGCTTGTACTTTGTTGAACAATGTTTCTTACATTGTAACACAGAACA
CACTTGGCATGTTGGGCTATGCAATTTTGTACTTTTTGTGCACTAAAGGTGTTA
GATATATGTGGATTTGGCATTGTTGGGATTTTTGATCTCATATACACTTATTGCAC
CATGGTGGGTTTTGATGGTTTATGCCCTTTCAGCCATTTTAGAGTTTATGCCTA
ACTTTTTAAAGCTTAAGGTTTCAACACAACCTCTTTGAGGGTGACAAGTTCGTAG
GCTCTTTTGAAAATGCTGCAGCAGGTACATTTGTGCTTGATATGCATGCCTATG
AGAGACTTGCCAACTCTATCTCAACTGAAAACTGCGTCAGTATGCTAGTACTT
ACAATAAGTACAAGTATTATTCAGGCAGTGCTTCAGAGGCTGATTACAGGCTT
GCTTGTTTTGCCATTTGGCCAAGGCTATGATGGATTATGCTTCTAATCACAAC
GACACGTTATACACACCACCCACTGTGAGTTACAATTCAACTTTACAGGCGGG
CTTGCGTAAGATGGCACAACCATCTGGTGTGTTGAGAAGTGCATAGTTCGTGT
TTGCTATGGTAATATGGCTCTTAATGGCCTATGGCTTGGTGACACTGTTATCTG
CCCGCGCCATGTTATAGCGTCTAGTACTACTAGCACTATAGATTATGACTATGC
CATTTCTGTTTTACGCCTCCACAACCTTCTCCATTTTCATCTGGTAATGTGTTCCTA
GGTGTGTTGGGTGTAACCATGCGAGGTGTTTTGTTGCAGATAAAGGTTAATCA
AAACAATGTCCACACGCCTAAGTACACCTATCGCACAGTTAGACCGGGTGAAT
CTTTAATATTTTGGCGTGCTATGATGGTGCTGCAGCTGGTGTGTTATGGCGTTA
ACATGCGCTCTAATTACACTATTAGAGGTTTCGTTCATTAAATGGCGCTTGTGGTT
CACCTGGTTATAATATTAACAATGGTACCGTTGAGTTTTGCTATTTACACCAGC
TTGAACTCGGTTTCAGGCTGTCATGTTGGTAGCGACTTAGATGGTGTGTTATGTATG
GTGGCTATGAGGACCAACCTACTTTGCAAGTTGAAGGCGCTAGTAGTCTGTTT
ACGGAGAATGTGTTGGCATTTCCTTATGCAGCACTTATTAATGGTTCTACTTGG
TGGCTTAGTGCTTCTAGGATTGCTGTAGACAGGTTTAATGAGTGGGCTGTTCAT
AATGGTATGACAACAGTGGGTAATACTGATTGCTTTTCTATTCTTGCTGCTAAG
ACTGGCGTTGATGTACAACGTTTGTGGCCTCAATCCAGTCTCTGCATAAGAAT
TTTGGTGGAAAGCAAATTCTTGGCTATACCTCGTTGACAGATGAGTTTACTACA
TGTGAAGTTATACGTCAAATGTATGGCGTTAATCTTCAGAGTGGTTATGTTTCA
CGCGCCTGCAGAAATGTCTTGCTGGTTGGTTCTTTTCTGACTTCTTTTGGTCAG
AATTAGTTTCCTACACTAAGTTCTTTTGGGTAAATCCTGGTTATGTCACACCTA
TGTTTGGCGTGTGTTGTCATTGTTGTCCTCACTTTTGATGTTTCACACTCAAGCATAA
AACGTTGTTTTTCCAGGTCTTCTTAATACCTGCTCTGATTGTTACATCTTGCATT
AATTTGGCATTGATGTAGAAGTCTATAACTATTTGGCAGGGCATTGTTGATTAC
CATGTTTCTCTCATGGGTTTTAATGCACAAGGTCTTGTTAATATCTTTGTATGCT
TTGTTGTTACCATTTTACACGGCACATACACATGGCGCTTCTTTAATACACCTG
TGAGTTTTGTCACTTATGTGGTAGCTTTGTTGACTGCAGCATATAACTACTTCT
ACGCTAGTGACATTCTTAGTTGTGCTATGACACTATTTGCTAGTGTGACTGGCA
ACTGGTTTTGTTGGTGCTGTTTGTGTTATAAAGCTGCTGTTTATATGGCCTTGAGGTT
TCCTACTTTTGTGGCTATTTTTGGTGATATTAAGAGTGTTATGTTTTGTTACCTT

GTGTTGGGTTATTTTACCTGTTGCTTTTATGGTATTCTCTATTGGTTCAACAGGT
 TTTTAAAGGTTAGTGTAGGTGTCTATGACTATACTGTTAGTGCTGCTGAGTTA
 AGTATATGGTTGCTAACGGCTTACGTGCACCAACTGGAACACTTGATTCACTAC
 TTCTGTCTGCCAAATTGATTGGTATTGGTGGTGAGCGGAATATTAAGATCTCTT
 CCGTTCAGTCTAAATTGACTGATATTAAGTGTAGTAATGTTGTGCTTTTAGGCT
 GTCTCTCTAGCATGAATGTCTCAGCAAATTC AACAGAATGGGCCTATTGTGTTG
 ACTTGCATAACAAGATCAACTTGTGTAATGACCCAGAAAAAGCGCAGGAAATG
 CTA CTTGCTTTGTTGGCATTTCCTTAGTAAGAATAGTGCTTTTGGTTTAGATG
 ACTTATTGGAATCCTATTTTAATGACAATAGTATGTTGCAGAGTGTTGCATCTA
 CTTATGTCGGTTTGCCTTCTTATGTCATTTATGAAAATGCACGCCAACAGTATG
 AAGATGCTGTTAATAATGGTTCTCCACCTCAGTTGGTTAAGCAATTGCGCCATG
 CTATGAATGTAGCAAAGAGCGAATTTGACCGTGAGGCTTCTACTCAGCGTAAG
 CTTGATAGAATGGCGGAACAGGCTGCAGCACATATGTACAAAGAGGCACGAG
 CAGTTAATAGGAAGTCCAAAGTTGTAAGTGCTATGCATTCACTGCTTTTTGGTA
 TGTTGAGACGTTTGGATATGTCTTCTGTAGACACCATTCTCAACTTGGCAAAGG
 ATGGGGTTGTACCTCTGTCTGTCATACCGGCAGTCAGTGCTACTAAGCTTAACA
 TTGTTACTTCTGATATCGACTCTTATAATCGTGTCCAGCGTGAGGGATGTGTCC
 ATTACGCTGGTACCATTTGGAATATAATTGATATCAAGGACAATGATGGCAAG
 GTGGTACACGTCAAGGAGGTAACCGCACAGAATGCTGAGTCCCTGTCATGGCC
 CCTGGTCCTAGGGTGTGAGCGTATTGTCAAGCTCCAGAATAATGAAATTATTCC
 TGGTAAGCTGAAGCAGCGCTCCATTAAGGCAGAAGGAGATGGCATAAGTTGGA
 GAAGGTAAGGCACTTTACAATAATGAGGGTGGACGTA CTTTTATGTATGCTTTC
 ATCTCGGATAAACCGGACCTGCGTGTAGTTAAGTGGGAGTTTGATGGTGGTTG
 TAACACTATTGAGCTAGAACCACCACGTAAGTTTTTGGTGGATTCTCCTAATGG
 TGCACAGATCAAGTATCTCTACTTTGTTTCGTAACCTTAACACGTTACGTAGGGG
 TGCTGTTCTTGGCTACATAGGTGCCACTGTACGCTTGCAGGCTGGTAAACAAAC
 AGAACAGGCTATTA ACTCTTCATTGTTGACACTTTGCGCTTTCGCTGTGGATCC
 TGCTAAGACCTACATCGATGCTGTCAAAGTGGTCACAAACCAGTAGGTA ACT
 GTGTTAAGATGTTGGCCAATGGTTCTGGTAATGGACAAGCTGTTACTAATGGT
 GTGGAGGCTAGTACTAACCAGGATTCATATGGTGGTGCTTCCGTGTGTCTATAT
 TGTAGAGCACATGTTGAGCATCCATCTATGGATGGTTTTTGCAGACTGAAAGG
 CAAGTACGTACAGGTGCCACTAGGTACAGTGGATCCTATACGTTTTTGTACTTGA
 GAATGACGTTTGC AAGGTTTGTGGTTGTTGGCTGGCTAATGGCTGCACTTGTGA
 CAGATCCATTATGCAAAGCACTGATATGGCTTATTTAAACGAGTACGGGGCTC
 TAGTGCAGCTCGACTAG

Trình tự gen ORF1b:

GTGTATCGTGCTTTTGGACATCTACAACAAGGATGTTGCTTGTCTAGGTAAATTC
 CTCAAGGTGAACTGTGTTTCGCCTGAAGAATTTGGATAAGCATGATGCATTCTAT
 GTTGTCAAAGATGTACCAAGTCTGTGATGGAACACGAGCAATCCATTTATAG

CAGACTTGAAAAGTGTGGAGCCGTAGCCGAACACGATTTCTTCACTTGGAAGG
ATGGTCGTGCAATCTATGGTAACGTTTGTAGAAAGGATCTTACCGAGTATACT
ATGATGGATTTGTGTTACGCTTTACGTAACCTTTGATGAAAACAATTGTGATGTT
CTTAAGAGCATTTTAATTAAGGTAGGTGCTTGTGAGGAGTCCTACTTTAATAAT
AAAGTCTGGTTTGACCCTGTTGAAAATGAAGACATTCATCGTGTCTATGCATTG
TTAGGTACCATTGTTTCACGTGCTATGCTTAAATGCGTTAAGTTCTGTGATGCA
ATGGTTGAACAAGGTATAGTTGGTGTGTCACATTAGATAATCAGGATCTTAAT
GGTGATTTTTATGACTTTGGTGATTTTACTTGTAGCATCAAGGGAATGGGTATA
CCCATTTGCACATCATATTATTCTTATATGATGCCTGTTATGGGTATGACTAATT
GCCTTGCTAGTGAGTGTTTTGTTAAGAGTGATATATTTGGTGAGGATTTCAAGT
CATATGACCTTCTGGAATATGATTTACGGAGCATAAGACATCACTCTTCAACA
AGTATTTCAAGTATTGGGGACTGCAATACCACCCTAATTGTGTGGACTGCAGT
GATGAGCAGTGCATAGTTCACTGTGCTAACTTCAATACGTTGTTTTCCACTACT
ATACCTATTACGGCATTGACCTTTGTGTCGCAAGTGCTGGATTGATGGTGT
CCACTGGTAACTACAGCTGGTTACCATTTTAAACAGTTAGGTATAGTTTGGAAC
AATGATCTCAACTTACATTCTAGCAGGCTCTCTATTAATGAACTACTCCAGTTT
TGTAGTGATCCTGCATTGCTTATAGCATCATCACCAGCCCTTGTTGATCAGCGT
ACTGTTTGCTTTTCAGTTGCAGCGCTAGGTACAGGTATGACTAACCAGACTGTG
AAACCTGGCCATTTCAATAAGGAGTTTTATGACTTCTTACTTGAGCAAGGTTTC
TTCTCTGAGGGCTCTGAGCTTACTTTAAAGCACTTCTTCTTGCACAGAAGGGT
GATGCAGCTGTTAAGGATTTTACTACTATAGGTATAATAGACCCACTGTTCTG
GACATTTGCCAAGCACGCGTCGTGTATCAAATAGTGCAACGCTATTTTGATATC
TACGAAGGTGGTTGTATCACCCTAAAGAAGTGGTTGTTACAAACCTCAACAA
GAGCGCAGGCTATCCTTTGAACAAGTTTGGTAAAGCAGGTCTTTACTATGAGT
CTTTATCCTATGAGGAACAGGACGAACCTTATGCTTATACTAAGCGTAACATCC
TGCCCACTATGACACAGCTCAACCTTAAATATGCTATAAGTGGCAAAGAACGT
GCACGCACAGTGGGTGGTGTTCGCTTTTGTCAACCATGACTACTCGGCAGTAT
CATCAGAAACACCTTAAAGTCCATAGTTAACTAGAGGTGCTTCTGTTGTTATT
GGTACTACTAAGTTTTATGGTGGTTGGGACAATATGCTTAAAGAACCTTATTGAT
GGTGTGAAAATCCGTGTCTTATGGGTGGGATTACCCAAAGTGTGACAGAGC
ACTGCCCAATATGATACGTATGATTTACGCCATGATCTTAGGCTCTAAGCACAC
CACATGCTGCAGTTCCTACTGACCGCTTTTTTACAGGTTGTGCAATGAATTGGCTCA
AGTCCTTACTGAGGTTGTTTACTCTAATGGAGGTTTTTATTTGAAGCCAGGCGG
TACTACCTCTGGTGATGCAACCACCGCATATGCAAACCTCAGTTTTCAATATCTT
CCAAGCAGTAAGTGCCAATGTTAACAACCTTCTTAGTGTTGACAGCAATGTCT
GTCATAATTTAGAAGTTAAGCAATTGCAGCGTAAGCTTTATGAGTGCTGTTATA
GATCAACCACCGTCGATGACCAGTTCGTCGTTGAGTATTATGGTTACTTGCGTA
AACATTTCTCAATGATGATTCTCTCTGATGATGGCGTTGTTTGTACAACAATG
ACTATGCATCACTTGGTTATGTCGCTGATCTTAAACGCATTCAAGGCTGTTTTGT
ATTACCAGAACAATGTTTTTATGAGCGCCTCTAAATGTTGGATCGAGCCTGAC

ATTAATAAAGGTCCTCATGAATTTTGTTCGCAGCATACTATGCAGATTGTTGAT
AAGGATGGTACTTATTACCTTCCTTACCCTGATCCTTCAAGAATCCTCTCTGCA
GGTGTGTTTGTGACGACGTTGTTAAACTGATGCAGTTGTATTGCTTGAACGT
TATGTGTCATTGGCTATAGATGCCTACCCGTTATCTAAGCATGAAAACCCTGAA
TATAAGAAGGTGTTTTATGTGCTTTTGGATTGGGTTAAGCATCTGTATAAACT
TTGAATGCTGGTGTGTTAGAGTCTTTTTCTGTCACACTTTTGGAAAGATTCTACTG
CTAAATTCTGGGATGAGAGCTTTTATGCCAACATGTATGAGAAATCTGCAGTTT
TGCAATCTGCAGGGCTTTGTGTTGTTTGTGGCTCTCAAACCTGTTTTACGTTGTG
GTGATTGTCTACGGCGCCCTATGCTTTGTAAGTGTGCTTATGATCATGTCA
TTGGAACAACCTCACAAGTTCATTTTGGCTATCACTCCATATGTGTGTTGTGCTT
CAGATTGTGGTGTCAATGATGTAAGTCTACTTAGGTGGTCTTAGTTATT
GGTGTGTCATGAACACAAGCCACGTCTTGCATTCCCATTGTGTTCTGCTGGTAATG
TTTTTGGTTTGTACAAAATTCTGCCACCGGCTCACCCGACGTTGAGGACTTTA
ATCGCATTGCTACATCCGATTGGACTGATGTTTCTGACTACAGGTTGGCAAATG
ATGTCAAGGACTCATTGCGTCTATTTGCAGCGGAAACTATCAAGGCCAAGGAG
GAGAGCGTTAAGTCATCCTACGCTTGTGCAAACTACATGAGGTTGTAGGACC
TAAAGAGTTGTTGCTCAAATGGGAAGTCGGCAGACCCAAACCACCTCTTAATA
GAAATTCGGTTTTCACTTGTATCATATAACGAAGAACACCAAATTTCAAATCG
GTGAGTTTGTGTTTGTGAGAAGGCAGAATATGATAATGACGCTGTAACATATAAA
ACTACCGCCACAACAAAACCTTGTTCCTGGCATGGTTTTTGTGCTTACCTCACAT
AATGTTTACGCCATTGCGCGCACCGACCATTGCTAATCAAGAACGTTATTCCACT
ATACATAAGTTGCATCCTGCTTTAACATACCTGAAGCTTATTCTAGCTTAGTG
CCATATTACCAACTGATTGGTAAGCAGAAGATTACAACCTATCCAGGGACCTCC
CGGTAGTGGTAAATCTCACTGCGTTATAGGGCTAGGTTTGTACTATCCAGGTGC
ACGTATAGTGTTTACAGCTTGTTCATGCAGCGGTCGATTCACTTTGTGTGAA
AGCCTCCACTGCTTATAGCAATGACAAATGTTTACGCATCATAACCACAGCGTG
CTCGTGTGAGTGTATGACGGCTTCAAGTCTAATAATACTAGTGCCAGTACC
TTTTCTCCACTGTCAATGCTTTGCCAGAGTGTAATGCGGACATTGTTGTGGTGG
ATGAGGTCTCTATGTGCACTAATTATGACTTGTCTGTCATAAATCAGCGCATCA
GCTATAGGCATGTAGTCTATGTTGGTGACCCTCAACAGTTGCCTGCACCACGTG
TTATGATTTACGTGGTACTTTGGAACCAAAGGACTACAACGTTGTCACTCAAC
GCATGTGTGCCCTTAAGCCTGATGTTTTCTTGCACAAGTGTTATCGTTGTCTG
CTGAGATAGTGCCTACTGTGTCTGAGATGGTCTATGAAAACCAATTCATTCTG
TGCACCCAGATAGCAAGCAATGTTTTAAAATCTTTTGAAGGGTAATGTTTCA
GTTGATAATGGTTCAAGCATCAATCGCAGGCAATTGGATGTTGTGCGTATGTTT
TTGGCTAAAACCCTAGGTGGTCAAAGGCCGTTTTTATTTCTCCTTATAACAGC
CAGAATTATGTTGCTAGCCGCATGCTAGGTTTACAAATTCAGACAGTTGACTCA
TCCCAGGGTAGTGAGTATGACTATGTCATTTACACACAAACCTCAGATACTGC
CCATGCCTGTAATGTTAACAGGTTTAAATGTTGCCATCACAAGGGCTAAGAAAG
GCATATTATGTATAATGTGCGACAGATCCCTTTTTGATGTGCTTAAATTCTTTG

AGCTTAAATTGTCTGATTTGCAGGCTAATGAGGGTTGTGGTCTTTTTAAAGACT
GTAGCAGAGGTGATGATCTGTTGCCACCATCTCACGCTAACACCTTCATGTCTT
TAGCGGACAATTTTAAGACCGATCAAGATCTTGCTGTTCAAATAGGTGTTAAT
GGACCCATTAATATGAGCATGTTATCTCGTTTATGGGCTTCCGTTTTGATATC
AACATACCCAACCATCACACTCTCTTTTGCACACGTGACTTTGCCATGCGCAAT
GTTAGAGGTTGGTTGGGTTTTGACGTTGAAGGAGCACATGTTGTTGGCTCTAAC
GTAGGCACAAATGTCCCATTGCAATTAGGGTTTTCTAATGGTGTGATTTTTGTT
GTCAGACCTGAAGGTTGCGTTGTAAGTACTGAGTCTGGTGACTATATTAAACCCGTC
AGAGCTCGTGCTCCACCAGGGGAACAATTTGCACACCTTTTGCCTCTACTTAAA
CGCGGCCAACCATGGGATGTGGTTCGTAAGCGTATAGTGCAAATGTGTAGTGA
CTACCTGGCTAACCTATCAGACATACTAATTTTTGTGTTGTGGGCTGGTGGTTT
GGAGTTGACAACCTATGCGTTACTTTGTTAAGATTGGACCAAGCAAGAGTTGTG
ATTGTGGTAAGGTTGCTACTTGTACAATAGTGCGCTGCATACGTACTGTTGTT
TCAAACATGCCCTCGGTTGTGATTACCTGTATAATCCATACTGTATTGATATAC
AGCAGTGGGGATACAAGGGATCACTTAGCCTTAACCACCATGAGCATTGTAAT
GTACATAGAAACGAGCATGTGGCTTCTGGTGTATGCCATAATGACTCGCTGTCT
GGCCATACATGATTGCTTTGTCAAGAACGTTGACTGGTCCATCACATACCATT
TATTGGTAATGAGGCTGTTATTAATAAGAGCGGCCGAATTGTGCAATCACACA
CCATGCGGTCAGTTCTTAAGTTATAACAATCCGAAAGCCATATATGATATTGGCA
ATCCTAAGGGCATCAGATGTGCCGTAACGGATGCTAAGTGGTTTTGCTTTGAC
AAGAATCCTACTAATTCTAATGTCAAGACATTGGAGTATGACTATATAACACA
TGGCCAATTTGATGGGTTGTGCTTGTGTTTGAATTGCAATGTTGACATGTATCC
AGAATTTTCTGTGGTCTGTCGTTTTGATACTCGCTGTAGGTCACCACTCAACTT
GGAGGGTTGTAATGGCGGTTCACTGTATGTTAATAATCATGCATTCCATACACC
GGCTTTTGACAAGCGTGCATTTGCCAAGTTGAAGCCAATGCCATTTTTCTTTTA
TGATGATACTGAGTGCGACAAGTTACAGGACTCTATAAATTACGTTCTCTTAG
GGCTAGTAACTGCATTAATAATGTAATGTTGGTGGAGCTGTCTGTAGTAAGC
ATTGTTCTATGTACCATAGCTATGTTAATGCTTACAACACCTTTACGTCAGCGG
GCTTTACGATTTGGGTGCCACTTCGTTTGCACCTACAATCTGTGGCAGACAT
TTAGTAACAATTTGCAAGGTCTTGAGAACATTGCTTTCAATGTCGTAAAGAAA
GGATCTTTTGTGTTGGTGCTGAAGGTGAGCTTCCGTAGCTGTGGTTAATGACAAA
GTGCTCGTCAGAGATGGTACTGTTGATACTCTTGTTTTTTACAAACAAGACATCA
CTACCCACTAACGTAGCTTTTGTAGTTGTATGCCAAGCGCAAGATAGGACTCAC
CCCACCCATTACGATCCTACGTAACCTGGGTGTTGTTTGCACATCTAAGTGTGT
CATTTGGGATTATGAAGCCGAACGTCCACTTACTACTTTTACAAAGGATGTCTG
TAAATATACCGACTTTGAGGGTGACGTCTGCACACTCTTTGATAACAGCATTGT
TGGTTCATTAGAGCGATTCTCCATGACCCAAAATGCTGTGCTTATGTCACTTAC
AGCTGTTAAAAAGCTTACTGGCATAAAGTTAACTTATGGTTATCTTAATGGTGT
CCCAGTTAACACACATGAAGATAAACCTTTTACTTGGTATATTTACACTAGGAA
GAACGGCAAATTCGAGGACTATCCTGATGGCTATTTTACCCAAGGTAGAACAA

CCGCTGATTTTAGCCCTCGTAGCGACATGGAAAAGGACTTCCTAAGTATGGAT
 ATGGGTCTGTTTATTAGCAAGTACGGACTTGAAGATTACGGCTTTGAGCACGTT
 GTGTATGGTGATGTTTCAAAAACCACCCTTGGTGGTTTACATCTACTAATTTCCG
 CAGGTGCGTCTGGCCTGTATGGGTGTGCTTAAAATAGACGAGTTTGTGTCTAGT
 AACGATAGCACGTTAAAGTCTTGTACTGTTACATATGCTGATAACCCTAGTAGT
 AAGATGATTTGCACGTATATGGATCTCCTTCTTGACGACTTTGTTAGCATTCTT
 AAATCTTTGGATTTGAGCGTTGTATCTAAAGTTCATGAAGTTATGGTCGATTGT
 AAAATGTGGAGGTGGATGTTGTGGTGTAAGGATCATAAACTCCAGACATTTTA
 TCCGCAACTTCAGGCTAGTGAATGGAAGTGTGGTTATTCCATGCCTTCTATTTA
 CAAGATAACAACGTATGTGTTTAGAACCTTGCAATCTCTATAACTATGGTGCTGG
 TATTAAGTTACCTGATGGCATTATGTTTAAACGTAGTTAAATACACACAGCTTTG
 TCAATATCTTAATAGCACCACAATGTGCGTACCCCATCACATGCGTGTGCTACA
 TCTTGGTGCTGGCTCCGATAAGGGTGTGACCTGGCACGGCTGTCTTACGACG
 TTGGTTGCCACTGGATGCCATTATAGTTGACAATGATAGTGTGGATTACGTTAG
 CGATGCTGACTATAGTGTACAGGAGATTGCTCTACCTTATACCTGTCAGATAA
 GTTTGACTTAGTTATATCTGATATGTATGATGGTAATATTAAGTTGTGATGG
 GGAGAACGTGTCTAAAGAAGGCTTCTTTCCCTATATTAATGGTGTCATCACTGA
 AAAGTTGGCACTTGGTGGTACTGTAGCTATTAAGGTGACGGAGTTTAGTTGGA
 ATAAGAAGTTGTATGAACTCATTCAGAAGTTTGAGTATTGGACAATGTTCTGTA
 CCAGTGTTAACACGTCATCATCAGAGGCATTTTTAATTGGTGTTCACTATTTAG
 GTGATTTTGCAAGTGGCGCTGTGATTGACGGCAACACTATGCATGCCAATTAT
 ATCTTCTGGCGTAATTCCACAATTATGACTATGTCTTACAATAGTGTACTTGAT
 TTAAGCAAGTTCAATTGTAAGCATAAGGCTACAGTTGTGCTTAATTTAAAAGA
 TTCATCCATCAGTGATGTTGTGTTAGGTTTGTGTAAGAATGGTAAGTTGCTAGT
 GCGTAATAATGACGCCATTTGTGGTTTTTCTAATCATTTGGTCAACGTAAACAA
 ATGA

Trình tự gen S:

ATGAGGTCTTTAACCTACTTCTGGTTGTTCTTACCAGTACTTTCAACATTTAGCC
 TACCACAAGATGTCACCAGGTGCTCAGCTAACACTAATTTTAGGGCGGTTCTTTT
 CAAAATTCAATGTTTCAGGCGCCTGCAGTTGTTGTACTCGGCGGTTATCTACCTA
 CTGGTGAAAATCAGGGTGTCAATCAACTTGGTACTGTGCTGGCCAACATCCA
 ACTGCTAGTGGCGTTCATGGTATCTTTCTTAGCCATATTAGAGGTGGTCATGGC
 TTTGAGATTGGCATTTCGCAAGAGCCTTTTGACTCTAGTGGTTACCAGCTTTAT
 TTACATAAGGCTACTGATGGTAACACTAATGCTACTGCGCGATTGCGCATTTCG
 CAGTTTCTCAGCATTAAAGCATTGGGCCCCACTGCTAATAATGATGTTACAACA
 GGTGCTAACTGCCTATTTAATAAAGCCATCCCAGCTCATATGAGTGAACATAG
 TGTTGTCGGCATAACATGGGATAATGACCGTGTCACTGTCTTCTCTGACAAGAT
 CTATCATTTTTATTTTAAAATGATTGGTCCCGTGTGCGACAAAGTGCTACAA
 CAGTGGAGGTTGTGCTATGCAATATGTTTACGAACCCACTTACTACATGCTTAA

TGTTACTAGTGCTGGTGAGGATGGTATTTCTTATCAACCCTGTACAGCTAATTG
CATTGGTTATGCTGCCAATGTATTTGCTACTGAGCCCAATGGCCACATACCAGA
AGGGTTTAGTTTTAATAATTGGTTTCTTTTGTCCAATGACTCCACTGTGTTGCAT
GGTAAGGTGGTTTCCAACCAACCATTATTGGTCAATTGTCTTTTGGCCATGCCT
AAGATTTATGGACTAGGCCAATTTTTCTCCTTCAATCAATCGATCGATGGTGT
TGTAATGGAGCTGCTGTGCAGCGTGCACCAGAGGCTCTGAGGTTTAATATTA
TGACACCTCTGTCATTCTTGCTGAAGGCTCAATTGTACTTCATACTGCTTTAGG
AACAAATCTTTCTTTTGTGGCAGTAATTCCTCAGATCCTCATTAGCCACATTC
GCCATACCTTTAGGTGCTACCCAGGTACCCTATTATTGTTTTCTTAAAGTGGAT
ACTTACAATTCCACTGTTTATAAATTTTTGGCTGTTTTACCTCCTACCGTCAGGG
AAATTGTCATCACCAGTATGGTGATGTTTATGTCAATGGGTTTGGCTACTTGC
ATCTCGGTTTGTGGATGCTGTCACAATTAACTTCACTGGTCATGGCACTGACG
ATGACGTTTCTGGTTTTTGGACCATAGCATCGACTAATTTTGTGATGCACTCA
TCGAAGTTCAAGGAAGTCCATTCAGCGTATTCTTTATTGTGATGATCCTGTTA
GCCAACTCAAGTGTTCTCAGGTTGCTTTTACCTTGACGAAGGTTTTTACCCTA
TCTCTTCTACAAACCTTCTGAGTCATGAACAGCCAACCTCTTTTGTACTTTGCC
ATCATTTAATGATCATTCTTTTGTAAATATACTGTCTCTGCTGCTTTTGGTGGT
CATAGTGGTGCCAACCTCATTGCATCTGACACTACTATCAATGGGTTTAGTTCT
TTTTGTGTTGACACCAGACAATTTACCATTTCCTGTTTTATAACGTTACAAAC
AGTTATGGTTATGTGTCTAAATCACAGGACAGTAATTGTCCTTTTACCTTGCAG
TCTGTTAATGATTACCTGTCTTTTAGCAAATTTTGTGTTTCTACCAGTCTTTTGG
CTAGTGCCTGTACCATAGATCTTTTTGGTTACCCTGAGTTTGGTAGTGGTGTCA
AGTTTACGTCCCTTTATTTTCAATTCACAAAGGGTGAGTTGATTACTGGCACGC
CTAAACCACTTAAAGGTGTTACGGACGTCTCTTTTATGACTCTGGATGTGTGTA
CCAAGTATACTATCTATGGCTTTAAAGGTGAGGGTATTATTACCCTTACAACT
CTAGCTTTTTGGCAGGTGTTTATTACACATCTGATTCTGGACAGTTGTTAGCCTT
TAAGAATGTCACTAGTGGTGCTATTTATTCTGTTACGCCATGTTCTTTTTTCA
GCAGGCTGCATATGTTGATGATGATATAGTGGGTGTTATTTCTAGTTTACCTAG
CTCCACTTTTAAACAGTACTAGGGAGTTGCCTGGTTTTCTTCTACCATTCTAATGA
TGGCTCTAATTGCACAGAGCCTGTGTTGGTGTATAGTAACATAGGTGTTTGCAA
ATCTGGCAGTATTGGGTATGTCCCATCTCAGTCTGGTCAAGTTAAGATTGCACC
CACGGTACTGGGAATATTAGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGAC
AGAATATCTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCTACATATGT
TTGTAATGGTAACTCTCGTTGTAAACAATACTCACCCAGTACACTGCAGCATG
TAAGACCATAGAGTCAGCTTTACAACCTCAGCGCTAGACTTGAGTCTGCTGAAG
TCAACTCCATGCTTACTATTTCTGAAGAGGCTCTACAGTTAGCTACCATCAGTT
CATTTAATGGTGATGGGTATAATTTTACTAATGTGCTGGGTGTTTCTGTGTATG
ACCCTGCAAGTGGCAGGGTGGTACAAAAAAGGTCTTTTATTGAAGACCTGCTT
TTAATAAAGTGGTTACTAATGGCCTTGGTACTGTTGATGAAGACTATAAGCGC
TGTTCTAATGGTCGTTCTGTGGCAGATCTAGTCTGTGCACAGTATTACTCTGGT

GTCATGGTACTACCTGGTGTGTTGTTGACGCTGAGAAGCTTCATATGTATAGTGCG
TCTCTCATCGGTGGTATGGTGCTAGGAGGTTTTACTTCTGCAGCGGCATTGCCT
TTTAGCTATGCTGTTCAAGCTAGACTCAATTATCTTGCTTTACAGACGGATGTT
CTACAGCGGAACCAGCAAATGCTTGCTGAGTCTTTTAACTCTGCTATTGGTAAT
ATAACTTCAGCCTTTGAGAGTGTTAAAGAGGCTATTAGTCAAACCTTCTAAGGG
TTTGAACACTGTGGCTCATGCGCTTACTAAGGTTCAAGAGGTTGTTAACTCGCA
GGGTGCAGCTTTGACTCAACTTACCGTACAGCTGCAACACAACCTTCCAAGCCA
TCTCTAGTTCTATTGATGACATTTACTCTCGACTGGACATTCTTTCAGCCGACGT
TCAGGTTGATCGTCTCATCACCGGCAGGTTATCAGCACTTAATGCTTTTGTGTC
TCAAACCCTCACTAAGTATACTGAGGTTCAAGGCTAGCAGGAAGCTAGCACAGC
AAAAGGTTAATGAGTGCGTTAAATCGCAATCTCAGCGTTATGGTTTTTGTGGTG
GTGATGGCGAGCACATTTTCTCTCTGGTACAGGCCGCACCTCAAGGCCTGCTGT
TTTTACATACAGTACTTGTACCGGGTGACTTTGTAAATGTTATTGCCATCGCTG
GCTTATGTGTTAACGATGAAATTGCATTGACTCTACGTGAGCCTGGCTTAGTCT
TGTTTACGCATGAACTTCAAGATACTGCGACGGAATATTTTGTTCATCGCGAC
GTATGTATGAACCTAGAAAACCTACCGTTGGTGATTTTGTTCAAATTGAGAGTT
GTGTGGTCACCTATGTCAATTTGACTAGAGACCAACTACCAGAAGTAATCCCA
GATTACATCGATGTTAACAAAACACTTGATGAGATTTTAGCTTCTCTGCCCAAT
AGAACTGGTCCAAGTCTTCTCTAGATGTTTTTAATGCCACTTATCTTAATCTCA
CTGGTGAAATTGCAGATTTAGAGCAGCGTTCAGAGTCTCTCCGTAATACCACA
GAAGAGCTCCAAAGTCTTATATATAATATCAACAACACACTAGTTGACCTTGA
ATGGCTCAACCGAGTTGAGACATATATCAAGTGGCCGTGGTGGGTTTGGTTGA
TTATTTTTATTGTTCTCATTTTTGTTGTGTCATTACTAGTGTCTGCTGCATTTCC
ACGGGTTGTTGTGGATGCTGCGGCTGCTGTGGTGCTTGTTTTTTCAGGTTGTTGT
AGGGGTCCTAGACTTCAACCTTACGAAGCTTTTGAAAAGGTCCACGTGCAGTG
A

Trình tự gen ORF3

GTGATGTTTCTTGGACTTTTTCAATACACGATTGACACAGTCGTCAAAGATGTC
TCTAAGTCTGCCAACTTGTCTTCGGACGCTGTCCAAGAGTTGGAGCTTAATGTA
GTTCCAATTAGACAAGCTTCAAATGTGACTGGTTTTTCTTTTCACCAGTGTTTTTA
TTTACTTCTTTCGACTGTTTAAAGCTTCTTCTTTGAGGCGCAATTATGTTATGTT
GGCAGCGCGTTTTGCTGTCATCTTCTTTATTGCCACTTTTATATTAAGTGTGGT
GCATTTTTAGATGCAACTATTATTTGTTGCACACTTATTGGCAGGCTCTTTTTAG
TCTGCTTTTATTCCCTGGCGCTATAAAAATGCGCTCTTTATTATCTTTAATACTAC
TACACTTTCTTTCTCAATGGTAAAGCAGCTTATTATGACGGCAAATCCATTGT
GATTCTAGAAGGTGGTGATCATTACATCACTTTTGGCAACTCTTTCGTTGCTTT
CGTTAGTAGCATTAACTTGTATCTAGCTATACGTGGGCGGCAAGAAGCTGACC
TACATCTGTTGCGAACTGTTGAGCTTCTTGATGGCAAGAAGCTTTATGTCTTTT
CGCAACATCAAATTGTTGGCATTACTAATGCTGCATTTGACTCAATTCAACTAG

ACGAGTATGCTACAATTAGTGAATGA

Trình tự gen E:

ATGCTACAATTAGTGAATGATAATGGTCTAGTAGTTAATGTTATACTTTGGCTT
TTCGTA CTCTTTTTCTTGCTTATTATAAGCATTACATTCGTCCAATTGGTTAATC
TGTGCTTCACTTGTCCACCGGTTGTGTAATAGCGCAGTTTACACACCTATAGGGC
GTTTGTATAGAGTTTATAAGTCTTACATGCAAATTGACCCCTCCCTAGTACTG
TTATTGACGTATAA

Trình tự gen M:

ATGTCTAACGGTCTATTCCCGTTGATGAGGTGATTGAACACCTTAGAACTGG
AATTTACATGGAATATCATACTGACGATACTACTTGTAGTGCTTCAGTATGGC
CATTACAAGTACTCTGCGTCTTGTATGGTGTCAAGATGGCTATTCTATGGATA
CTTTGGCCTCTTGTGTTGGCACTTTCACCTTTTGTATGCATGGGCTAGCTTTCAGG
TCAACTGGGTCTTTTTTGTCTTTCAGCATCCTTATGGCTTGCATCACTCTTATGCT
GTGGATAATGTACTTTGTCAATAGCATTTCGGTTGTGGCGCAGGACACATTCTG
GTGGTCTTCAATCCTGAAACAGACGCGCTTCTCACTACTTCTGTGATGGGCCG
ACAGGTTTGCATTCCAGTGCTTGGAGCACC AACTGGTGTAACGCTAACACTCCT
TAGTGGTACATTGCTTGTAGAGGGCTATAAGGTTGCTACTGGCGTACAGGTAA
GTCAATTACCTAATTTTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAACAATTGTCTATG
GACGTGTTGGTCGTTTCAGTCAATGCTTCATCTAGCACTGGTTGGGCTTCTATG
TCCGGTCAAACACGGCGACTACTCAGCTGTGAGTAATCCTAGTGCGGTTCTC
ACAGATAGTGAGAAAGTGCTTCATTTAGTCTAA

Trình tự gen N:

GTGCCATTATCCCTCTATGCCCCTCTTAGGGTACTAATGACAAACCCCTTCT
AAGGTA CTTGCTAATAATGCTGTACCCACTAATAAAGGAAATAAGGACCAGCA
AATTGGATACTGGAATGAGCAAATTCGCTGGCGCATGCGCCGTGGTGAGCGAA
TTGAGCAACCTTCCAATTGGCATTCTACTACCTCGGAACAGGACCTCACGCCG
ACCTCCGCTATAGGACTCGTACTGAGGGTGT TTTCTGGGTTGCTAAAGAAGGC
GCAAAGACTGAACCCACTAACCTGGGTGTCAGAAAGGCGTCTGAAAAGCCAA
TCATTCCAAACTTCTCTCAACAGCTTCCAGCGTAGTTGAGATTGTTGAACCTA
ACACACCTCCTACTTCACGTGGAAATTCACGTAGCAGGAGTCGTGGTAATGGC
AACAAACAGGTCCAGATCTCCAAGTAACAACAGAGGCAATAACCAGTCCCGCG
GTAATTCACAGAATCGTGGAAGTAACCAGGGTTCGTGGAGCTTCTCAGAACAGA
GGAGGCAATAATAATAACAATAACAAGTCTCGTAACCAGTCCAAGAATAGAA
ACCAGTCAAATGACCGTGGTGGAAATGACATCACGCGATGATCTGGTGGCTGCT
GTCAAGGATGCCCTTAAATCTTTGGGTATTGGAGAAAATCCTGATAGGCTTAA
GCAACAACAGAAGCCTAAGCAGGAAAAGTCTGACAACAGCGGCAAAAACACA
CCTAAGAAGAACAATCCAGGGCCACTTCGAAGGAACGTGACCTCAAAGACA
TCCAGAGTGAGGAGAATTCCCAAGGGCGAAAATAGCGTAGCAGCTTGCTTC

GGACCCAGGGGGGGCTTCAAAAATTTTGGAGATGCAGAATTTGTCGAAAAAG
GTGTTGATGCCTCAGGCTATGCTCAGATCGCCAGTTTGGCACCAAATGTTGCAG
CATTGCTCTTTGGTGGTAATGTGGCTGTTTCGCGAGCTAGCGGACTCTTACGAGA
TTACATACAATTATAAAATGACTGTGCCAAAGTCTGATCCAAATGTTGAGCTTC
TTGTTTCACAGGTTGATGCATTTAAACTGGTAATGCAAACCCAGAGAAAG
AAGGAAAAGAAGAATAAGCGTGAAACCACGCAGCAGCTGAATGAAGATGCCA
TCTACGATGACGTGGGTGTGCCATCTGATGTGACTCATGCCAATTTGGAATGG
GACACAGCTGTTGATGGTGGTGACACTGCCGTTGAAATTATCAACGAGATCTT
CGATACAGGAAATTAA

ĐẠI HỌC HUẾ
NHIỀU TÁC GIẢ

BÁO CÁO KHOA HỌC PROCEEDINGS

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024
NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2024

Thành phố Huế, ngày 25 – 26 tháng 9 năm 2024

**Công nghệ gen; Công nghệ hóa sinh và protein; Công nghệ tế bào;
Công nghệ vi sinh, thực phẩm và môi trường; Công nghệ sinh học nông nghiệp;
Công nghệ sinh học y dược; Y học tái tạo và trị liệu tế bào**



NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC HUẾ
Huế, 2024

15. TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN PROTEIN TÀI TỶ HỢP hMMP-1 (HUMAN MATRIX METALLOPROTEINASE 1) TRONG *E. coli* BL21. Nguyễn Trọng Bình, Trần Phú Hiền, Chương Thị Ngọc Hiếu, Nguyễn Thiện Phương... 97
16. GIẢI MÃ VÀ PHÂN TÍCH GEN S1 CỦA CHỦNG VIRUS PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA GÂY BỆNH TIÊU CHẢY CẤP TRÊN LỢN TẠI TỈNH HƯNG YÊN NĂM 2023. Lưu Minh Đức, Đỗ Thị Roan, Nguyễn Thị Khuê, Don Nguyen, Đoàn Thị Thanh Hương..... 104
17. ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ GIỐNG LẠC LÀY (*Trichosanthes cucumerina* L.). Trương Thị Hồng Hải, Hồ Thị Hoàng Nhi, Sonexay Rasphone, Hồ Ngọc Hân 110
18. THIẾT KẾ CẤU TRÚC VECTOR CRISPR/Cas9 CHỈNH SỬA GEN TÍN HIỆU CỦA HOOC MÔN BRASSINOSTEROID Ở CÂY CÀ CHUA. Lê Văn Hiền, Trương Thanh Tùng, Lê Thị Thảo, Nguyễn Văn Tjnh..... 116
19. PHÂN TÍCH ĐA HÌNH ĐƠN NUCLEOTIDE CỦA THỤ THỂ KHỨU GIÁC cOR52H9 VÀ cOR9S13 TRÊN CHÓ NGHIỆP VỤ. Lê Thị Huệ, Phạm Thị Khánh Linh, Nguyễn Ngọc Hưng, Lê Văn Trọng, Đoàn Thị Thanh Hương..... 123
20. PHÂN TÍCH CÁC ĐẶC ĐIỂM CỦA HỌ PROTEIN VACUOLAR IRON TRANSPORTER (VIT) VÀ DỮ LIỆU BIỂU HIỆN HỌ GEN *OsVIT* Ở LÚA BẰNG CÔNG CỤ TIN SINH HỌC. Lê Quỳnh Mai, Phạm Minh Duy, Đỗ Minh Ân..... 130
21. NGHIÊN CỨU MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ GIỐNG HOA HỒNG (*Rosa* spp.) CỎ Ở MIỀN BẮC VIỆT NAM DỰA TRÊN TRÌNH TỰ VÙNG *tmH-psbA*. Ngô Văn Đức, Hoàng Hải Đăng, Triệu Phương Mai, Phạm Quốc Toàn, Nguyễn Thị Bích Hương, Lê Thị Kiều Trinh, Nguyễn Minh Phương 136
22. BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA MÃ VẠCH *tmH-psbA* TRONG VIỆC XÁC ĐỊNH ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ MẪU LAN KIM TUYẾN THU THẬP TẠI VIỆT NAM. Hoàng Hải Đăng, Ngô Văn Đức, Trịnh Thị Hương, Hồ Viết Thế, Trần Trọng Tuấn 142
23. ĐỊNH DANH CHỦNG NẤM HƯƠNG THU NHẬN TẠI VƯỜN QUỐC GIA BẠCH MÃ BẰNG SINH HỌC PHÂN TỬ VÀ KHẢO SÁT MÔI TRƯỜNG NHÂN GIỐNG NHẪM BẢO TỒN NGUỒN GEN. Lê Thị Như Ngọc, Nguyễn Vũ Linh, Trần Thiện Ân, Võ Đình Ba, Nguyễn Việt Thắng, Nguyễn Minh Trí..... 149
24. BIỂU HIỆN PROTEIN TOLL-LIKE RECEPTOR 22 TỪ CÁ TRA *Pangasianodon hypophthalmus* VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG TƯƠNG TÁC VỚI VI KHUẨN. Nguyễn Thanh Tấn, Trần Văn Hiếu 154
25. NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM HỆ GENE CỦA 243 MẪU VI KHUẨN *Neisseria gonorrhoeae* PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM. Nguyễn Tiến Đạt, Vương Thị Hương, Trịnh Thị Xuân, Nguyễn Cường 160
26. NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA *Pseudomonas aeruginosa* TẠI VIỆT NAM THÔNG QUA PHÂN TÍCH PAN GENOME, CORE GENOME MLST VÀ CORE GENOME SNP. Vương Thị Hương, Nguyễn Tiến Đạt, Trịnh Thị Xuân, Nguyễn Cường..... 166

CÔNG NGHỆ HÓA SINH VÀ PROTEIN

1. NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH VÀ SINH ENZYME PHÂN GIẢI CHẤT HỮU CƠ CỦA CÁC CHỦNG VI NẤM PHÂN LẬP TỪ TRÀM TÍCH VÙNG BIỂN QUẢNG BÌNH. Vũ Thị Thu Huyền, Nguyễn Mai Anh, Lê Thị Hồng Minh 174
2. ISOLATION AND SCREENING OF *Bacillus* SP. PRODUCING FIBRINOLYTIC ENZYME WITH LOW CULTURE BROTH VISCOSITY. Thi-Thu-Trang Nguyen, Quoc-Phong Truong, Lan-Huong Nguyen, Tuan Le..... 182
3. CÁC CHỈ SỐ SINH HÓA MÁU CỦA DÊ BOER KHI SỬ DỤNG THỨC ĂN Ủ CHUA. Nguyễn Thị Thu Hiền..... 188
4. ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA QUÁ TRÌNH TIỀN XỬ LÝ NẤM VÀ THỦY PHÂN RƠM LÚA MÌ BẰNG HỖN HỢP CHẾ PHẨM ENZYME THƯƠNG MẠI. Dương Hiếu Linh, Dietmar Schlosser..... 194
5. NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HOÁ CỦA TINH DẦU CÂY BÁCH XANH (*Calocedrus macrolepis* Kurz) TẠI KHU BẢO TỒN THIÊN NHIÊN PÙ HƯƠNG, NGHỆ AN. Trần Đức Dũng, Nguyễn Quốc Bình, Trần Đình Thắng 199
6. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CHIẾU XẠ TIA GAMMA NGUỒN Co60 ĐẾN HÌNH THÀNH RỄ THỨ CẤP VÀ TÍCH LŨY HỢP CHẤT THỨ CẤP CỦA RỄ CÂY ĐĂNG SÂM (*Codonopsis javanica*) NUÔI CÂY *IN VITRO*. Lê Thị Thúy, Trịnh Thị Hương, Tạ Nguyễn Minh Hằng, Đỗ Thanh Như 205
7. NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ ĐIỀU KIỆN LÊN MEN SINH TỔNG HỢP PECTINASE CỦA CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus licheniformis* V114. Nguyễn Thị Hồng Liên, Nguyễn Văn Hiếu, Trần Thị Hương, Đặng Thị Nhung, Lê Thị Trà, Phan Thị Hồng Thảo 210

GIẢI MÃ VÀ PHÂN TÍCH GEN S1 CỦA CHỦNG VIRUS PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA GÂY BỆNH TIÊU CHẢY CẤP TRÊN LỢN TẠI TỈNH HƯNG YÊN NĂM 2023

Lưu Minh Đức^{1,2}, Đỗ Thị Roan^{1,2}, Nguyễn Thị Khuê^{1,2}, Don Nguyen³, Đoàn Thị Thanh Hương^{1,2*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Squalicum High School Bellingham, Washington, USA

TÓM TẮT

Virus PED gây bệnh tiêu chảy cấp chủ yếu ở lợn con chưa cai sữa. Tỷ lệ nhiễm bệnh trong đàn khá cao, tỷ lệ chết cũng tương đối cao gây nên nhiều thiệt hại cho ngành chăn nuôi. Kích thước hệ gen virus khoảng 28 kb mã hóa cho các gen quan trọng cho quá trình nhân bản và hoàn thiện cấu tạo virus. Gen kháng nguyên spike chứa tiểu phần S1 bao gồm phần protein dẫn và hai vùng thụ thể liên kết. Gen S1 của chủng PEDVHY1 và PEDVHY2 thu nhận tại Hưng Yên năm 2023 đều có kích thước 2205 nucleotide mã hóa cho 735 amino acid thuộc genotype G2b. Protein S1 chứa nhiều đột biến, đặc biệt là đột biến chèn đoạn và xóa đoạn so với chủng virus nhược độc vaccine. Vùng gen S1 của hai chủng nghiên cứu ít có sai khác hơn so với các chủng thuộc genotype khác. Phân tích phả hệ nguồn gốc cho thấy hai chủng PEDV nghiên cứu có quan hệ gần gũi với nhau trong cây phả hệ và cùng nhóm với các chủng PEDV thu thập tại Việt Nam thu nhận trong giai đoạn 2013 đến 2018, thuộc genotype G2b, khác nhóm với chủng virus vaccine DR13 và CV 777 nhược độc.

Từ khóa: Gen S1, genotype, Hưng Yên, PEDV.

MỞ ĐẦU

Bệnh tiêu chảy trên lợn (PED-Porcine Epidemic Diarrhea) do virus tiêu chảy cấp ở lợn (PEDV-Porcine Epidemic Diarrhea Virus) gây ra. Đây là một bệnh truyền nhiễm với tốc độ lây lan nhanh, lợn mắc bệnh có triệu chứng nôn mửa, tiêu chảy cấp tính, mất nước nghiêm trọng dẫn đến tử vong. Tỷ lệ tử vong của lợn dưới một tuần tuổi đặc biệt cao, tỷ lệ tử vong của lợn trưởng thành thấp hơn (Pospischil *et al.*, 2002).

Bệnh PED lần đầu tiên xuất hiện tại Anh vào năm 1971, sau đó nhanh chóng lan ra các khu vực châu Âu bao gồm Thụy Sĩ, Đức, Pháp, Hà Lan và Bulgaria (Pensaert, De Bouck, 1978). Tại châu Á, PED lần đầu tiên được ghi nhận ở Nhật Bản vào năm 1982, sau đó là hàng loạt các quốc gia lớn như Trung Quốc năm 1986, Ấn Độ năm 2003 và Thái Lan năm 2007 (Temeeyasen *et al.*, 2013). Năm 2013, một đợt bùng phát dịch lợn đã xảy ra tại Mỹ, khiến 8 triệu con lợn mới sinh tử vong (Stevenson *et al.*, 2013). PEDV được báo cáo tại Việt Nam lần đầu tiên vào năm 2009 và các nghiên cứu cho thấy chủng PEDV gây nên đợt bùng phát dịch bệnh có mối quan hệ họ hàng với các chủng PEDV có nguồn gốc Trung Quốc (Nguyễn Tất Toàn *et al.*, 2012; Duy *et al.*, 2013). Cho đến nay, hầu hết các khu vực chăn nuôi lợn tại cả nước đều ghi nhận sự có mặt của PEDV. Mặc dù đã được sử dụng vaccine nhưng nhiều trang trại vẫn xảy ra bệnh gây thiệt hại rất nặng nề. Từ đó cho thấy các chủng virus thực địa đã biến đổi về đặc tính di truyền, dẫn đến không còn tương đồng về tính kháng nguyên-miễn dịch với các chủng virus vaccine đang sử dụng.

PEDV là một loại virus RNA sợi đơn dương, thuộc phân chi *Pedecovirus*, chi *Alphacoronavirus* trong họ *Coronaviridae*, thuộc bộ *Nidovirales* (Schoch *et al.*, 2020). Virus có cấu trúc hình cầu hoặc đa hình với đường kính 95–190 nm, có vỏ bọc ngoài cùng bao gồm các phần nhô ra hình gậy, hình tam giác có chiều dài 18–23 nm. Bộ gen PEDV dài khoảng 28 kb, bao gồm 7 khung đọc mở (ORF), được sắp xếp theo thứ tự 5'UTR-ORF1a-ORF1b-S-ORF3-E-M-N-3'UTR và đuôi poly (A) (Lee 2019). ORF1a, ORF1b chiếm khoảng 2/3 bộ gen, ở vị trí gần đầu 5' và mã hóa 16 protein phi cấu trúc (nsps). ORF3 nằm giữa gen S và E có vai trò mã hóa các protein phụ, đồng thời là yếu tố quyết định độc lực ở PEDV. Gen E giúp hình thành và giải phóng vỏ virus (Park *et al.*, 2008). Gen S mã hóa glycoprotein, được chia thành miền S1 và S2, đóng vai trò quan trọng trong liên kết với các thụ thể tế bào. Đặc biệt vùng gen S1 kích thích vật chủ sản xuất kháng thể trung hòa và là vùng có nhiều đột biến nhất trong hệ gen nên được sử dụng chủ yếu cho các nghiên cứu về dịch tễ học phân tử, phả hệ nguồn gốc và phát triển vaccine thế hệ mới (Sun *et al.*, 2007). Mặc dù PEDV được báo cáo chỉ có một kiểu huyết thanh, nhưng về mặt di truyền được chia thành hai nhóm: nhóm 1 (Genotype 1: là nhóm cổ điển) và nhóm 2 (Genotype 2: là nhóm độc lực cao) (Li *et al.*, 2012). Việc bổ sung thêm các nghiên cứu về đặc điểm phân tử, di truyền của virus là vô cùng cần thiết để phục vụ cho công tác phòng bệnh. Để góp phần tìm hiểu rõ hơn về các chủng PEDV đang lưu hành, chúng tôi tiến hành giải mã và phân tích gen kháng nguyên S1 của một số chủng virus thực địa thu

thập tại Hưng Yên năm 2023. Đây là một trong các tỉnh phía Bắc có ngành chăn nuôi lợn phát triển cũng như bị ảnh hưởng nặng nề bởi dịch bệnh. Kết quả thu nhận được phân tích và so sánh với các chủng PEDV tham chiếu trên thế giới.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm là phân và niêm mạc ruột của lợn bệnh khoảng 2 đến 3 tuần tuổi có triệu chứng nôn, đi ngoài phân lỏng bị ốm hoặc đã chết. Mẫu bệnh phẩm được mổ khám tại các trang trại và giữ lạnh trước khi chuyển đến phòng Miễn dịch học, Viện Công nghệ Sinh học. Mẫu bệnh phẩm được pha loãng bằng đệm PBS để có dạng huyền phù. Li tâm hỗn hợp ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 30 phút. Dịch nổi phía trên được dùng để tách chiết RNA tổng số sử dụng bộ kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các mẫu được kiểm tra dương tính PEDV bằng cặp mồi chẩn đoán sẽ được lựa chọn để giải mã và phân tích gen S1.

Tổng hợp cDNA, PCR và dòng hóa

cDNA được tổng hợp từ RNA virus (khoảng 1 µg) bằng bộ kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng PCR được thực hiện nhằm chẩn đoán PEDV, sử dụng cặp mồi: PEDVF (5'-TTCTGAGTCACGAACAGCCA-3'), PEDVR (5'-CATATGCAGCCTGCTCTGAA-3') nằm trên gen S (Park *et al.*, 2008) thu sản phẩm PCR có kích thước 651 bp. Cặp mồi thứ 2 nhằm khuếch đại phân đoạn DNA chứa toàn bộ gen S1 gồm: PEDVS1F (5'-GCTAGTGCGTAATAATGACGCCA-3') và PEDVS1R (5'-ACAGAGCCTGTGTTGGTGTGA-3') thu sản phẩm PCR có kích thước khoảng 2,4 kb. Phản ứng PCR được thực hiện trên tổng thể tích 50 µL bao gồm: 25 µL DreamTaq PCR Master Mix (2X), 2 µL mỗi loại mồi (10 pmol/µL) và 3 µL cDNA khuôn và nước tinh khiết cho đủ 50 µL. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau: 95°C – 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ [95°C – 30 giây, 55°C – 30 giây, 72°C – 3 phút] và 72°C – 10 phút. Sản phẩm PCR dương tính có chất lượng tốt được tinh sạch bằng bộ kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo, Mỹ) sau đó gắn vào vector tách dòng bằng bộ kit TA Cloning™ Kit (Thermo, Mỹ). Sản phẩm ligation được chuyển nạp vào tế bào khả biến DH5α.

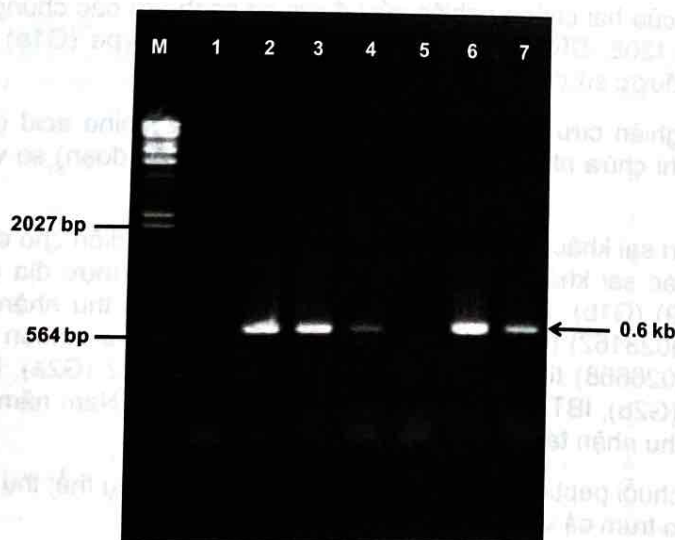
Phân tích trình tự gen và phả hệ nguồn gốc

DNA plasmid tái tổ hợp được giải trình tự bằng kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Thermo fisher, Mỹ). Để thu được toàn bộ chuỗi DNA từ DNA plasmid trên, chúng tôi thiết kế thêm một mồi bên trong gen S1 (PEDVS-F1: 5'-AATTGCATTGGTATGCTGC-3') để giải trình tự. Chuỗi nucleotide được xử lý bằng chương trình Seqed1.3, so sánh bằng chương trình AssemblyLIGN1.9 và MacVector8.2 (Accelrys Inc). Các trình tự tương ứng với vùng gen S1 đăng ký tại Ngân hàng gen được sử dụng để so sánh đối chiếu với chuỗi gen nghiên cứu, sử dụng chương trình GENEDOC2.7 (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). Phân tích phả hệ nguồn gốc bằng chương trình MEGAX sử dụng phương pháp kết nối liền kề (Neighbor-joining) với giá trị bootstrap 1000 lần lặp lại (Kumar *et al.*, 2018).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả sàng lọc mẫu bệnh phẩm có chứa PEDV

Bằng cặp mồi chẩn đoán, chúng tôi phát hiện 5 mẫu dương tính với PEDV, là các mẫu cho sản phẩm PCR kích thước khoảng 0,6 kb đúng như dự tính (Hình 1).



Hình 1. Kết quả điện di phát hiện PEDV bằng cặp mồi chẩn đoán PEDVF-PEDVR

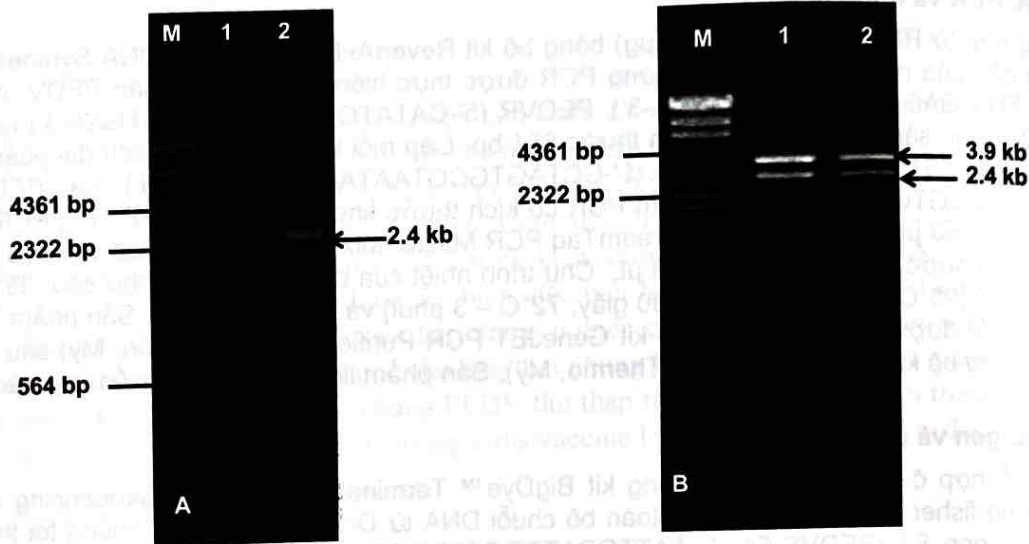
Giống M: Thang DNA chuẩn (DNA của thực khuẩn thể λ được cắt bằng enzyme HindIII). Giếng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: Kết quả PCR bằng cặp mồi chẩn đoán của các mẫu PEDV thu nhận tại các trang trại đại diện cho các mẫu nghiên cứu.

Trong năm mẫu dương tính, chúng tôi lựa chọn hai mẫu có chất lượng tốt nhất và đại diện cho hai huyện khác nhau của Hưng Yên (là mẫu số 2 và mẫu số 6) để giải mã gen S1. Mẫu được ký hiệu là PEDVHY1 và PEDVHY2. Hai mẫu này sẽ được dùng để nhân gen S1 bằng cặp mồi đặc hiệu PEDVS1F - PEDVS1R.

Kết quả thu nhận và giải trình tự gen S1

Sản phẩm PCR gen S1 của hai chủng PEDVHY1 và PEDVHY2:

Kết quả điện di sản phẩm PCR gen S1 và sản phẩm cắt DNA plasmid tái tổ hợp bằng enzyme giới hạn EcoRI được trình bày trong Hình 2. Sản phẩm PCR thu được từ mẫu 2 và mẫu 6 (tương ứng với mẫu bệnh phẩm ký hiệu PEDVHY1 và PEDVHY2) có chất lượng tốt, dòng hóa thành công vào vector pCR2.1. DNA plasmid tái tổ hợp được cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn EcoRI cho hai băng, một băng có kích thước 3.9 kb là vector pCR2.1, một băng có kích thước khoảng 2.4 kb bằng kích thước sản phẩm PCR gen S1 đem dòng hóa. Các DNA plasmid này sẽ được chọn để giải trình tự.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR thu toàn bộ gen S1 của 2 chủng PEDV nghiên cứu

Giếng M: thang DNA chuẩn (DNA của thực khuẩn thể λ được cắt bằng enzyme HindIII).

Hình 2A: Giếng 1: kết quả PCR khuếch đại gen S1 của mẫu PEDVHY1; Giếng 2: kết quả PCR khuếch đại gen S1 của mẫu PEDVHY2

Hình 2B: Giếng 1: Kết quả điện di DNA plasmid của chủng PEDVHY1 cắt bằng enzyme giới hạn EcoRI; Giếng 2: Kết quả điện di DNA plasmid của chủng PEDVHY2 cắt bằng enzyme giới hạn EcoRI.

DNA plasmid được giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Kết quả đã thu nhận được toàn bộ gen S1 của hai chủng PEDVHY1 và PEDVHY2, gồm 2205 nucleotide mã hóa cho 735 amino acid.

Trình tự amino acid (suy diễn) của hai chủng nghiên cứu được so sánh với các chủng: XJ-YLGL-2022021, IBT-VN, HBEZ3, X-J-WLMQ, KNU-1308, DR13 wild type (G1a), CV777 wild type (G1a), DR13 nhược độc (G1b), CV777 nhược độc (G1b) đang được sử dụng làm vaccine hiện nay (Bảng 1).

Kết quả cho thấy hai chủng nghiên cứu chỉ sai khác nhau ở bốn vị trí amino acid (K120R, E484P, K638E và P720S) trên protein S1 trong khi chứa nhiều sai khác lớn (xóa đoạn, chèn đoạn) so với các chủng virus nhược độc vaccine.

Protein S1 chứa tổng số 71 vị trí sai khác về amino acid giữa các chủng đại diện cho các genotype. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm hiểu các sai khác amino acid giữa chủng CV777 thực địa (AF553511) (G1a), CV777 nhược độc vaccine (KT323979) (G1b), DR13 thực địa (JQ023162) (G1b) thu nhận tại Hàn Quốc năm 2009, DR13 nhược độc vaccine ((JQ023162) (G1b), HBZ3 thực địa (KY775054) thu nhận tại Trung Quốc năm 2016 (G2c), XJ-WLMQ-202203 (OR026668) thu nhận tại Trung Quốc năm 2022 (G2a), KNU-1308 (KJ451043) thu nhận tại Hàn Quốc năm 2013 (G2b), IBT-VN (MT198679) thu nhận tại Việt Nam năm 2019 và hai chủng nghiên cứu là PEDVHY1, PEDVHY 2 thu nhận tại tỉnh Hưng Yên năm 2023.

Tiểu phần protein S1 có chứa chuỗi peptide tín hiệu (SP), hai vị trí liên kết thụ thể: thụ thể đầu tận N (S1-NTD) và thụ thể đầu tận C (S1-CTD) bao trùm cả vùng COE (CO-26K equivalent).

Trong vùng peptide tín hiệu, các chủng virus thuộc genotype G1 chứa ba vị trí sai khác về amino acid so với các chủng virus thuộc genotype G2 (aa 2: R/T↔K/S, aa 5: I↔N/T, aa 15: P/L↔S).

Trong vùng liên kết thụ thể thứ nhất (S1-NTD) phát hiện 34 sai khác lớn về amino acid giữa các genotype. Đồng thời xuất hiện đột biến chèn amino acid của chủng virus thực địa so với chủng vaccine tại vị trí 56 (I/T), 139 (D/N)

và 157 (Y/H). Tại vị trí amino acid 59 – 61, chủng thực địa được chèn thêm 3 amino acid (HG V/QGV) so với chủng vaccine. Trong khi đó, chủng thuộc G1a và G1b lại có thêm 2 amino acid (DI/NI) ở vị trí 163 – 164 so với chủng thuộc G2a, G2b, G2c. Tại các vị trí khác là các đột biến điểm đặc trưng giữa các genotype (Bảng 1). Các đột biến chèn/xóa nằm chủ yếu ở vùng siêu biến đổi của chuỗi peptide S1.

Trong vùng liên kết thụ thể thứ 2 (S1-CTD) chứa 7 sai khác, trong đó chủng CV777 (G1a) thực địa chứa nhiều sai khác nhất so với các chủng còn lại. Tại vị trí 554, 599, 638, chủng virus vaccine hoàn toàn khác với hai chủng virus nghiên cứu. Đặc biệt, ở vị trí 638 chỉ riêng chủng PEDVHY1 là K trong khi các chủng khác thuộc cùng genotype 2 là E và các chủng thuộc genotype 1 là Q/E.

Epitope COE-CO26K là một trong những epitope trung hòa có trên protein S1 của PEDV. Amino acid tại vùng epitope này có sự đa dạng cao giữa các chủng PEDV thuộc nhóm G2 nhưng có nhiều vị trí sai khác so với nhóm G1. Các chủng PEDV thuộc nhóm G2 là những chủng có độc lực cao, đang lưu hành hiện nay tại nhiều quốc gia trên thế giới. Kết quả nghiên cứu cho thấy hai chủng PEDV nghiên cứu là những chủng có độc lực cao, có nguy cơ lây lan cao tại các trang trại chăn nuôi lợn.

Những sai khác kể trên giữa các chủng vaccine và chủng thực địa có thể là nguyên nhân dẫn đến việc virus tăng hay giảm khả năng liên kết với tế bào chủ, ảnh hưởng đến khả năng bảo hộ của vaccine.

So sánh tỷ lệ đồng nhất nucleotide dựa trên trình tự gen S1 cho thấy, tỷ lệ đồng nhất nucleotide giữa chủng PEDVHY1 và chủng PEDVHY2 cao, 99.66%. Tuy nhiên, khi so sánh với một số chủng PEDV phân lập tại Việt Nam giai đoạn 2013 đến 2018 thì tỷ lệ tương đồng đạt thấp hơn, dao động từ 96.55% đến 97.32%. Điều này cho thấy đã có sự biến đổi trong gen kháng nguyên S1 của PEDV thực địa đang lưu hành tại Việt Nam so với các chủng trước đây.

Bảng 1. Vị trí sai khác amino acid thuộc protein S1 giữa các chủng PEDV đại diện các genotype và hai chủng nghiên cứu

Vị trí (CV777(G1a))	1-SP-19	S1-NTD																							
	2	5	10	15	27-29	30	56	57	59-61	62	64	68-72	74	82	84	86	87	89	118	120	132	133	138	139	157
CV777(G1a)	R	I	L	P	QST	T	-	M	---	S	S	GTGIE	A	L	Y	D	S	Q	N	I	K	T	V	-	Y
DR3(G1a)	R	I	F	L	QST	I	-	M	---	S	S	GTGIE	D	L	Y	D	S	Q	N	I	K	T	V	-	Y
CV777 (at) (G1b)	T	I	F	L	QST	I	-	M	---	S	S	GTGIE	D	L	Y	D	S	Q	S	I	K	T	V	-	-
DR3(at) (G1b)	T	I	F	L	QST	I	-	M	---	S	S	GTGIE	D	L	Y	D	S	Q	S	I	K	T	V	-	-
HBEZ3 (G2c)	K	N	F	S	QST	I	-	M	---	S	S	GTGIE	A	L	Y	D	A	Q	N	I	K	T	V	-	Y
XJ-WLMQ (G2a)	K	T	F	S	SAN	T	I	E	HGV	N	T	AGQHP	A	L	H	R	G	H	N	T	N	T	A	D	H
KNU-1308 (2b)	S	T	F	S	SAN	T	I	E	QGV	N	T	AGQPH	A	V	H	R	G	H	N	T	K	T	A	N	H
IBT-VN	S	T	F	S	SAN	T	I	E	QGV	N	T	AGQPH	A	L	H	R	G	H	N	T	K	T	A	D	H
PEDVHY1	S	T	F	S	SAN	T	T	E	QGV	N	T	AGQHP	A	L	H	R	G	H	N	T	K	A	A	N	H
PEDVHY2	S	T	F	S	SAN	T	T	E	QGV	N	T	AGQHP	A	L	H	R	G	H	N	T	K	A	A	N	H

Vị trí (CV777(G1a))	S1-NTD												S1-CTD (COE-CO26K)							
	158	159	160-162	163-164	187	201-203	211	228	230-231	237	248-249	270	522	541	554	599	610	617	638	640
CV777 (G1a)	M	R	DGK	DI	L	RRS	T	Y	EP	T	DS	L	A	F	T	G	A	L	E	I
DR3 (G1a)	L	Q	DGK	NI	L	NRS	T	Y	EP	S	DS	L	A	F	T	G	E	F	E	V
CV777 (at) (G1b)	L	Q	DGK	NI	I	NRS	T	Y	EP	S	DS	L	A	F	T	G	E	F	Q	V
DR3(at) (G1b)	L	Q	DGK	NI	I	NRS	T	Y	EP	S	DS	L	A	F	T	G	E	F	Q	V
HBEZ3 (G2c)	M	Q	DGK	NI	L	NRS	T	Y	EP	S	DS	L	S	F	S	S	E	F	E	V
XJ-WLMQ (G2a)	M	S	EHS	--	F	SGG	E	S	QL	L	EL	L	S	L	S	S	E	F	E	V
KNU-1308 (2b)	M	S	EHS	--	F	SGG	E	S	QP	I	EP	L	S	F	S	S	E	F	E	V
IBT-VN	M	S	EHS	--	F	SGG	E	S	QP	I	EP	L	A	F	S	S	E	F	E	V
PEDVHY1	M	S	EHS	--	F	SGG	E	S	QP	I	EP	V	A	F	S	S	E	F	K	V
PEDVHY2	M	S	EHS	--	F	SGG	E	S	QP	I	EP	V	A	F	S	S	E	F	E	V

Chú thích: vị trí amino acid trong bảng 2.1 là vị trí của chủng CV777 thực địa (AF353511).

So sánh với các chủng thuộc genotype G1 (cường độc và vaccine), hai chủng PEDV phân lập tại Hưng Yên năm 2023 có tỷ lệ tương đồng thấp (từ 90.79% đến 91.12%). Kết quả cho thấy có sự khác biệt đáng kể về thành phần nucleotide giữa các chủng PEDV thuộc các genotype khác nhau, từ đó thấy được tầm quan trọng của công tác giám sát dịch tễ học phân tử và sử dụng vaccine phòng bệnh PED tại Việt Nam.

KẾT QUẢ PHÂN TÍCH PHẢ HỆ NGUỒN GỐC

Cây phả hệ được xây dựng dựa trên trình tự gen S1 của 54 chủng PEDV, trong đó có hai chủng nghiên cứu PEDVHY1 và PEDVHY2, 52 chủng còn lại đại diện cho các genotype đã và đang lưu hành trên toàn cầu. Các chủng tham chiếu được tải xuống từ Ngân hàng gen NCBI theo mã số GenBank của từng chủng.

Cây phả hệ gồm năm nhóm chính tương ứng với năm genotype: G1a, G1b, G2a, G2b, G2c (Hình 3). Nhóm thứ nhất gồm 29 chủng PEDV thuộc genotype G2b, bao gồm các chủng virus phân lập tại nhiều quốc gia bao gồm: Mỹ, Hàn Quốc, Mexico, Trung Quốc, Việt Nam (từ năm 2013 đến năm 2018), và hai chủng PEDVHY1 và PEDVHY2 thu nhận mới năm 2023 tại tỉnh Hưng Yên trong nghiên cứu này. Điều này chứng tỏ sự hiện diện của PEDV G2b khắp toàn cầu trong thời gian dài và tồn tại cho tới tận ngày nay.

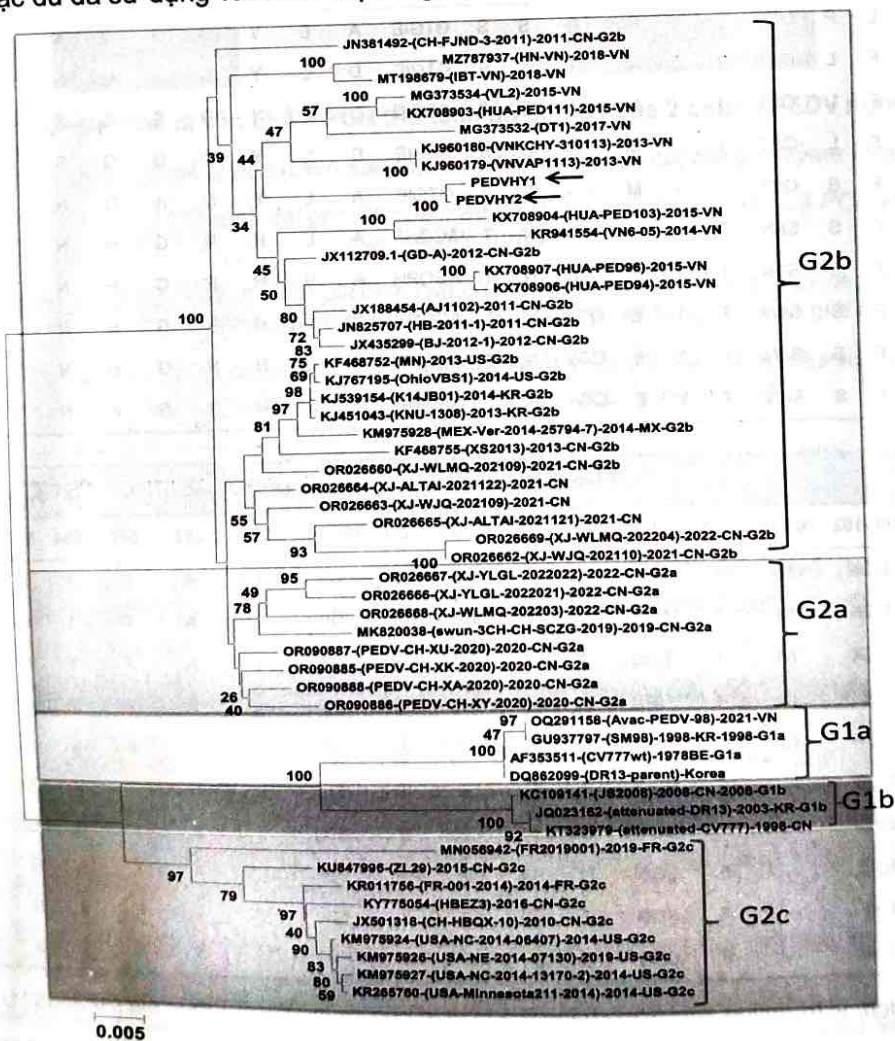
Nhóm thứ hai gồm các chủng thuộc genotype G2a. Nhóm này gồm các chủng của Trung Quốc phân lập trong khoảng 4 năm trở lại đây gây ra nhiều ổ dịch lớn tại Trung Quốc và lan sang các nước lân cận. Tuy nhiên, tại Việt Nam vẫn chưa ghi nhận thấy sự lưu hành phổ biến của các chủng PEDV thuộc genotype G2a này.

Nhóm thứ ba gồm các chủng PEDV thuộc genotype G1a. Nhóm này chứa chủng PEDV cổ điển CV777 phân lập từ năm 1978 tại Bỉ. Ngoài ra còn có các chủng phân lập tại Hàn Quốc năm 1998 và phân lập tại Đan Mạch phân lập năm 2017. Chủng Avac-PEDV-98 phân lập năm 2021 của Việt Nam thuộc nhóm này.

Nhóm thứ tư gồm các chủng PEDV thuộc genotype G1b. Nhóm này chứa các chủng virus vaccine nhược độc được biến đổi từ các chủng cường độc thuộc genotype G1a. Trong đó chủng CV777 đại (genotype G1a) sau quá trình nhược độc hóa thành chủng CV777 nhược độc thuộc G1b, chủng DR13 có nguồn gốc G1a, sau khi cấy chuyển 100 đời đã thành chủng nhược độc DR13 thuộc G1b. Đây là hai trong số nhiều chủng virus vaccine đang được sử dụng rộng rãi hiện nay.

Nhóm thứ năm gồm các chủng PEDV thuộc genotype G2c. Nhóm này gồm các chủng thu nhận tại Mỹ, Pháp, Trung Quốc từ khoảng những năm 2010 trở lại đây.

Hai chủng PEDV nghiên cứu (PEDVHY1 và PEDVHY2) phân lập năm 2023 tại tỉnh Hưng Yên thuộc genotype G2b, không cùng nhóm với hai chủng virus vaccine CV777 và DR13. Điều này là nguyên nhân dẫn đến việc đàn lợn vẫn mắc bệnh mặc dù đã sử dụng vaccine để phòng bệnh.



Hình 3. Phả hệ nguồn gốc PEDV dựa trên trình tự gen S1

Chú thích: Các nhóm khác nhau được đánh dấu bằng màu nền khác nhau. Chủng nghiên cứu PEDVHY1 và PEDVHY2 được đánh dấu bằng hình mũi tên.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã giải mã và phân tích trình tự gen S1 của hai chủng PEDV thu nhận tại tỉnh Hưng Yên năm 2023. Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc cho thấy cả hai chủng PEDV nghiên cứu đều thuộc genotype G2b, là chủng virus đang lưu hành phổ biến hiện nay ở Việt Nam và trên thế giới. Hai chủng PEDV thực địa có 45 vị trí sai khác về amino acid trong protein kháng nguyên S1 so với các chủng PEDV thuộc các genotype khác và với hai chủng virus vaccine đang sử dụng hiện nay.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ từ Nhiệm vụ Quỹ gen cấp quốc gia “Khai thác và phát triển nguồn gen virus (CSFV và PEDV) để chế tạo kit chẩn đoán và phục vụ sản xuất vắc-xin phòng bệnh dịch tả lợn cổ điển và bệnh tiêu chảy cấp ở lợn” mã số NVQG-2023/ĐT.04 do TS. Đoàn Thị Thanh Hương chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Duy DT, Toan NT, Puranaveja S, Thanawongnuwech R (2013). Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates from southern Vietnam during 2009-2010 outbreaks. *Thai J Vet Med*, 41: 55-56.
- Lee C (2019). Porcine Viruses: From Pathogenesis to Strategies for Control. Zakaryan H, editor. *Norfolk: Caister Academic Press; Porcine epidemic diarrhoea virus: 107-134.*
- Li W, van Kuppeveld FJM, He Q, Rottier PJM, Bosch BJ (2016). Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res*, 226: 117-127.
- Li W, Li H, Liu Y, Pan Y, Deng F, Song Y, Tang X, He Q (2012). New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerg Infect Dis*, 18: 1350-1353.
- Park SJ, Moon HJ, Luo Y, Kim HK, Kim EM, Yang JS, Song DS, Kang BK, Lee CS, Park BK (2008). Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild- and attenuated-type porcine epidemic diarrhea viruses. *Virus Genes*, 36: 95-104.
- Pensaert M, De Bouck P (1978) A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol*, 58: 243–247.
- Pospischil A, Stuedli A, Kiupel M (2002). Update on porcine epidemic diarrhea. *J Swine Health Prod*, 10: 81-85.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6):1547-1549.
- Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, Mcveigh R, O'Neill K, Robbertse B, Shama S, Soussov V, Sullivan JP, Sun L, Turner S, Karsch-Mizrachi I (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*: baaa062.
- Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough ER, Sun D, Madson D, Cooper VL, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt BJ, Koster LG, Killian ML, Yoon KJ (2013). Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Investig of Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc*, 25(5): 649-654.
- Sun DB, Feng L, Shi HY, Chen JF, Liu SW, Chen HY (2007). Spike protein region (aa 636-789) of porcine epidemic diarrhea virus is essential for induction of neutralizing antibodies. *Acta Virol*. 51(3): 149-156.
- Temeeyasen G, Srijangwad A, Tripipat T, Tipsombatboon P, Piriyaopongsa J, Phoolcharoen W, Chuanasa T, Tantituvanont A, Nilubol D (2013). Genetic diversity of ORF3 and spike genes of porcine epidemic diarrhea virus in Thailand. *Infect Genet Evol*, 21: 205-213.

SEQUENCING AND ANALYSIS S1 GENE OF PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS ISOLATED IN HUNG YEN IN 2023

Luu Minh Duc^{1,2}, Do Thi Roan^{1,2}, Nguyen Thi Khue^{1,2}, Don Nguyen³, Doan Thi Thanh Huong^{1,2*}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

³Squalicum High School Bellingham, Washington, USA

SUMMARY

PED virus causes acute diarrhea mainly in unweaned piglets. The infection rate in herds and the mortality rate are high, causing a lot of damage to the livestock industry. The genome of virus is about 28 kb in size, encodes important genes for replication and complete virus creation. The antigen protein spike contains an S1 subunit contains a signal protein and two receptor-binding domains. The S1 genes of both strains PEDVHY1 and PEDVHY2 collected in Hung Yen in 2023 are 2205 nucleotides in size, encoding 735 amino acids and belong to genotype G2b. The S1 protein contains many mutations, especially insertion and deletion mutations compared to vaccine strains. The S1 gene region of the two studied trains has little difference, while they have many mutations compared to other genotypes. Phylogenetic analysis shows that the two studied PEDV strains are closely related in the family tree and are in the same group with Vietnamese strains collected from 2013 to 2018 belonging to genotype G2b, different genotype from attenuated vaccine virus strains: DR13 and CV777.

Keywords: S1 gene, genotype, Hung Yen, PEDV.

* Author for correspondence: Tel: 0988904605; Email: doantthuong74@gmail.com