

Nghiên cứu khoa học

XÁC ĐỊNH, PHÂN NHÓM VIRUS GÂY BỆNH VIÊM PHẾ QUẢN TRUYỀN NHIỄM TRÊN GÀ NĂM 2018 Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

*Lê Thị Kim Xuyên¹, Nguyễn Thị Cẩm Loan²,
Trần Ngọc Bích³, Đoàn Thị Thanh Hương^{1,4}, Lê Thanh Hòa^{1,4}*

TÓM TẮT

Tám chuỗi nucleotide của gen nucleoprotein (N) gồm 403 bp đã được thu nhận từ 7 mẫu bệnh phẩm IBV trên gà nuôi ở hai tỉnh Sóc Trăng và Vĩnh Long bằng PCR và giải trình tự. Trình tự nucleotide gen N của IBV được đưa vào sắp xếp so sánh, phân tích phả hệ (25 chủng) và tính toán khoảng cách di truyền (20 chủng). Kết quả nghiên cứu cho thấy giữa 8 chủng của Việt Nam, một số nhóm chủng có khoảng cách di truyền rất thấp, cụ thể: 0-0,2% giữa 3 chủng IBST3, IBST4, IBST9; 0,5% giữa 2 chủng IBST5-1 và IBST5-2 và 0% giữa IBST14 và IBVL22. Phân tích phả hệ đã chia 25 chủng IBV thành 2 nhóm chính, bao gồm: Nhóm 1 tập hợp các mẫu của thế giới và 3 mẫu IBV phân lập năm 2018 tại Sóc Trăng (IBST4, IBST3, IBST9) với chủng vaccin 4-91 (KF377577) và 2 chủng (IBST5-1, IBST5-2) cùng với Mass41 (AY851295); và nhóm 2 gồm các chủng có nguồn gốc hoàn toàn từ Trung Quốc và 2 chủng phân lập ở Vĩnh Long (IBVL17, IBVL22) và 1 chủng phân lập ở Sóc Trăng (IBST14) cùng với QX và LX4 (QX-like) của Trung Quốc. Có ít nhất 3 nhóm IBV đã xác định được là đang nhiễm trên đàn gà và có sự đa nhiễm trên cùng một cá thể, trong đó có nhóm 4-91, Mass (Mass41) và QX (LX4 hay QX-like) phân lập năm 2018 tại Sóc Trăng và Vĩnh Long.

Từ khóa: IBV, gen nucleoprotein, khoảng cách di truyền, Sóc Trăng, Vĩnh Long, phả hệ.

Determining and grouping IBV in chicken in Mekong Delta, 2018

*Le Thi Kim Xuyen, Nguyen Thi Cam Loan,
Tran Ngoc Bich, Doan Thi Thanh Huong, Le Thanh Hoa*

SUMMARY

There were 8 nucleotide sequences of the nucleoprotein gene (N) including 403 bp collected from 7 IBV specimens on the chickens raising in Soc Trang and Vinh Long provinces identified by PCR and sequencing. The nucleotide sequences of gene N of IBV were arranged and compared. The pedigree of 25 strains was analyzed and genetic distance of 20 strains was calculated. The studied result showed that among 8 IBV strains isolated in Viet Nam, some strain groups presented a very low genetic distance, for example: 0-0.2% among 3 strains (IBST3, IBST4, IBST9), 0.5% between 2 strains (IBST5-1, IBST5-2) and 0% between 2 strains (IBST14 and IBVL22). Base on pedigree analysis, 25 IBV strains were divided into 2 groups, including: Group 1 consisted of all IBV strains in the world, 3 IBV strains isolated in 2018 at Soc Trang (IBST4, IBST3, IBST9), vaccine strain 4-91 (KF377577), and 2 strains (IBST5-1, IBST5-2) together with Mass 41 (AY851295). Group 2: consisted of all the Chinese IBV strains and 2 strains isolated in Vinh Long (IBVL17, IBVL22) and 1 strain isolated in Soc Trang (IBST14) together with QX and LX4 (QX-like) strains of China. At least, there were 3 IBV strains determined to be infected on the chicken herds, presenting co-infection in the same chicken. Of which, there were group 4-91, Mass (Mass41) and QX (LX4 or QX-like) isolated in 2018 in Soc Trang and Vinh Long.

Keywords: IBV, nucleoprotein gene, genetic distance, Soc Trang, Vinh Long, pedigree.

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

² Trường Cao đẳng Cộng đồng Vĩnh Long

³ Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Đại học Cần Thơ

⁴ Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm phế quản truyền nhiễm (Infectious Bronchitis, IB) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính của gia cầm gây ra bởi virus viêm phế quản truyền nhiễm (Infectious Bronchitis Virus, IBV). Bệnh xảy ra trên toàn thế giới, chủ yếu lây nhiễm đường hô hấp, thận và hệ thống sinh sản, gây ra suy hô hấp, tổn thương thận, giảm sản lượng trứng và trứng bị biến dạng (Cavanagh, 2007; Ignjatovic et al., 2002). IB được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1931 tại Mỹ và kể từ đó đã trở thành một căn bệnh ảnh hưởng đến ngành chăn nuôi gia cầm ở tất cả các nơi trên thế giới (Sjaak de Wit et al., 2011).

Tác nhân gây bệnh là một loại RNA virus, *Gammacoronavirus*, thuộc họ *Coronaviridae* (<https://talk.ictvonline.org/>), sợi đơn dương, với chiều dài xấp xỉ 27,6 kb, mã hóa bốn loại protein cấu trúc: nucleocapsid protein (N), membrane protein (M), envelop protein (E) và spike protein (S); một loại RNA polymerase phụ thuộc RNA của virus và nhiều protein không cấu trúc khác (Jackwood, 2012). Trong số các protein này, protein S và N là protein kháng nguyên, tạo ra phản ứng miễn dịch bảo vệ chống lại IBV (Ignjatovic và Sapats, 2005). Protein N bao gồm 409 axit amin. Protein này được tham gia vào một loạt các chức năng như đóng gói virus, lắp ráp, hình thành lõi virus, truyền tín hiệu và điều chỉnh quá trình tế bào chủ (You et al., 2007). Protein S được chia thành các tiểu đơn vị S1 và S2, gen S1 rất khác nhau giữa các chủng virus và có liên quan trực tiếp đến sự đa dạng của các nhóm kháng nguyên và di truyền của IBV (Cavanagh, 2007; Toro et al., 2012). Các serotype Massachusetts (Mass) và Connecticut (Conn) lần đầu tiên được phân lập lần lượt vào những năm 1940 và 1950 (Jungherr et al., 1956). Kể từ đó, một số kiểu huyết thanh bao gồm Arkansas, Connecticut (Conn), Massachusetts (Mass), 4/91, 793B, D274, H120, Italian-02, Baudette, California, Georgia 98 và QX đã được xác định và báo cáo trên toàn cầu (Jackwood et al., 2003; Sjaak de Wit et al., 2011).

Trong nhiều thập kỷ, việc xác định và phân loại di truyền IBV được thực hiện mà không có các tiêu chí rõ ràng về danh pháp, phương pháp so sánh phân tích dữ liệu phân tử và xác định vùng gen

chính xác để phân tích. Kết quả là các subclade của virus liên quan chặt chẽ, đôi khi lưu hành ở các vùng địa lý nhỏ, đã được gán làm kiểu gen mới và hơn 50 nhóm di truyền đã được báo cáo (De Wit et al., 2011). Gần đây, một hệ thống phân loại rõ ràng hơn dựa trên hệ thống phân loại sinh học đã được đề xuất cho việc phân bổ các chủng IBV. Hệ thống này chia làm sáu kiểu gen, trong 32 dòng di truyền và cung cấp các chuỗi tham chiếu đáng tin cậy để hướng dẫn phân loại IBV (Valastro et al., 2016).

Gen N và gen S1 được lựa chọn để sử dụng trong phân loại virus IB và có rất nhiều công bố dựa trên giải trình tự và phân tích các gen này. Chỉ thị gen N (nucleocapsid) đã góp phần trong rà soát sớm sự lưu hành và xác định genotype trong giám định và phân loại IBV bên cạnh chỉ thị gen S1 và gần đây vẫn song song cùng sử dụng (Huang et al., 2004; Feng et al., 2012; Mo et al., 2013; Hemida et al., 2017).

Để kiểm soát bệnh, tiêm phòng vaccin là phương pháp quan trọng nhất. Vaccin sống nhược độc thường được sử dụng trong chương trình tiêm phòng, tuy nhiên khả năng chịu nhiệt kém, sự “tái độc” và tái tổ hợp giữa virus vaccin và virus gây bệnh thực địa thường xảy ra (McKinley et al., 2008; 2011; Lee et al., 2010; 2012). Hơn nữa, các loại vaccin này không đảm bảo việc bảo vệ các đàn gia cầm khác nhau đối với các chủng IBV mới xuất hiện (Sharma, 1999; Bande et al., 2015). Những yếu tố này làm cho việc kiểm soát dịch bệnh IB càng khó khăn và đa dạng hóa di truyền phân hóa genotype của IBV (McKinley et al., 2011).

Tại Việt Nam, bệnh IB được quan tâm rất nhiều trong những năm gần đây và các công trình công bố đã chỉ ra rằng, IBV ở Việt Nam gồm nhiều dòng và nhiều genotype khác nhau cũng giống như ở một số nước trong vùng như Trung Quốc, Malaysia; cụ thể các nghiên cứu đã phát hiện một mẫu IBV thuộc serotype Massachusetts (dòng H120), bốn mẫu thuộc serotype 793B (dòng 4/91) trên các trại gà công nghiệp tỉnh Lâm Đồng (Võ Thị Trà An et al., 2012); 3 mẫu thuộc genotype 793/B, 1 mẫu thuộc genotype QX và 1 chủng tương đồng với Malaysia (Trần Ngọc Bích et al., 2017), các chủng của Q1-like, QX-like và TC07-

02-like, đang lưu hành ở Hà Nội và một số tỉnh phía Bắc, có quan hệ gần gũi nguồn gốc và dịch tễ học với Trung Quốc (Nguyễn Thị Loan et al., 2017; Nguyễn Thị Loan, 2019). Việc xác định các chủng IBV đang lưu hành, gây bệnh tại Việt Nam là rất cần thiết, nhằm làm sáng tỏ dịch tễ học phân tử của virus, đồng thời góp phần quan trọng trong công tác phòng chống dịch bệnh đạt hiệu quả tốt.

Nghiên cứu này giới thiệu một số chủng IBV khác nhau, trong đó có chủng vacxin trên các đàn gà ở hai tỉnh Sóc Trăng và Vĩnh Long theo phương pháp sinh học phân tử giải mã và phân tích một phần

trình tự gen N của một số tác giả như Huang et al., (2004), Feng et al., 2012, Mo et al. (2013), Hemida et al., (2017), kết hợp với phân tích phả hệ nguồn gốc, nhằm nhanh chóng xác định sự lưu hành của IBV.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu nhận và bảo quản mẫu

Mẫu bệnh phẩm là khí quản của gà được chẩn đoán là nhiễm IBV từ các trại chăn nuôi gà tại hai tỉnh Sóc Trăng và Vĩnh Long, bao gồm 8 mẫu (bảng 1). Mẫu được bảo quản lạnh ở -20°C.

Bảng 1. Danh sách các chủng IBV Việt Nam và thể giới sử dụng gen N để phân tích so sánh thành phần gen và mối quan hệ nguồn gốc phả hệ

TT	Ký hiệu chủng	Số đăng ký Ngân hàng gen	Năm phân lập	Nước phân lập/xuất xứ	Genotype	Ghi chú về nguồn gốc
1	IBST3	Nghiên cứu này	2018	Việt Nam		Đàn bệnh
2	IBST4	Nghiên cứu này	2018	Việt Nam		Đàn bệnh
3	IBST5-1	Nghiên cứu này	2018	Việt Nam		Đàn bệnh
4	IBST5-2	Nghiên cứu này	2018	Việt Nam	Mass-41	Đàn bệnh
5	IBST9	Nghiên cứu này	2018	Việt Nam	Mass-41	Đàn bệnh
6	IBST14	Nghiên cứu này	2018	Việt Nam	LX4	Đàn bệnh
7	IBVL17	Nghiên cứu này	2018	Việt Nam	LX4	Đàn bệnh
8	IBVL22	Nghiên cứu này	2018	Việt Nam	LX4	Đàn bệnh
9	4-91vaccine	KF377577	-	Trung Quốc	4-91	Vaccin
10	gammaCoV-74	KT886454	2009	Ba Lan	QX	Vaccin
11	H52	EU817497	2014	Trung Quốc	Chưa rõ	Vaccin
12	Cal557	FJ904715	2003	Hoa Kỳ	CAL	Cường độc
13	THA80151	KU253620	2008	Thái Lan	QX-like	Cường độc
14	TN92	KR902510	2003	Ấn Độ	Mass-41	Chưa rõ
15	Mass41	FJ904721	1972	Hoa Kỳ	Mass-41	Cường độc
16	Mass41	AY851295	-	-	Mass-41	Chưa rõ
17	LX4	AY217750	-	Trung Quốc	Chưa rõ	Cường độc
18	SDZB0808	KF853202	2008	Trung Quốc	QX	Cường độc
19	SZ	KY421672	2012	Trung Quốc	QX-like	Cường độc
20	ck-CH-LBJ-120481	KX389094	2012	Trung Quốc	LX4	Cường độc
21	gammaCoV-G052	KY047602	2016	Ba Lan	GI-23 (Var2-like)	Cường độc
22	Cal99	AY514485	-	Hoa Kỳ	CAL	Nhược độc
23	Conn46	FJ904716	1996	Hoa Kỳ	CON	Nhược độc
24	Mass41	FJ904722	1979	Hoa Kỳ	Mass-41	Cường độc
25	gammaCoV-I1101	KY620116	2016	Trung Quốc	LX4	Cường độc

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết RNA tổng số và chuyển cDNA

RNA tổng số được tách chiết từ mẫu bệnh phẩm sử dụng bộ sinh phẩm RNeasy Minikit của QIAgen, theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tóm tắt như sau: Bổ sung 350 μ l RLT vào ống 2 ml sạch; thêm 150 μ l mẫu vào, lắc đều; bổ sung 350 μ l Ethanol 70%, lắc đều và đảo; chuyển cột, ly tâm 10000 v/p trong 1 phút, bỏ dịch phía dưới ống; bổ sung 700 μ l RW1, ly tâm 10000 v/p trong 1 phút rồi bỏ dịch; thêm 500 μ l RPE; ly tâm 10000 v/p trong 1 phút và bỏ dịch dưới rồi làm khô cột bằng cách ly tâm; cho 30 μ l Elution Buffer vào giữa cột, để ở nhiệt độ phòng 2 phút rồi ly tâm 10000v/p trong 2 phút, thu dịch. Bảo quản mẫu ở -20°C .

RNA tổng số được chuyển đổi thành DNA (cDNA) sử dụng mỗi xác suất hexamer (Thermo Scientific) với chu trình: $56^{\circ}\text{C}/60$ phút và vô hoạt ở $85^{\circ}\text{C}/5$ phút.

2.2.2. Thu nhận gen N bằng PCR, giải trình tự và phân tích phả hệ

Phản ứng PCR thực hiện với mỗi xuôi IBF (5' TTTTGGTGATGACAAGATGAA 3') và mỗi ngược IBR (5' CGCATTGTTCTCTCTC 3') (Feng et al., 2012), thu vùng gen N, kích thước khoảng 0,4 kb, với chu trình nhiệt: 1 chu kỳ ở

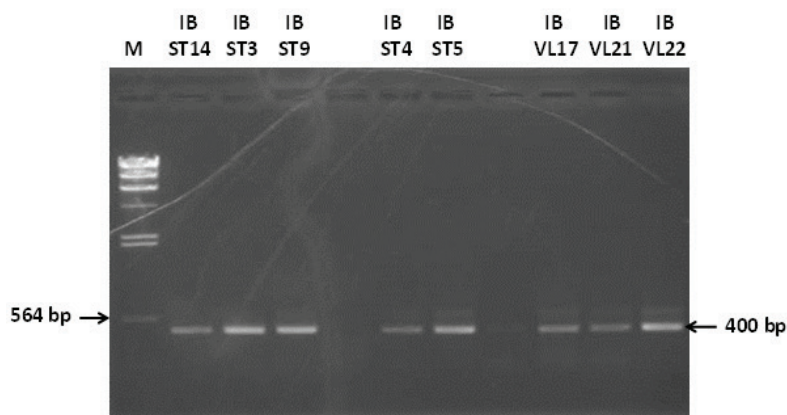
$94^{\circ}\text{C}/5$ phút, 35 chu kỳ [$94^{\circ}\text{C}/30$ giây, $45^{\circ}\text{C}/30$ giây; $68^{\circ}\text{C}/1$ phút], và 1 chu kỳ ở $68^{\circ}\text{C}/8$ phút. Tinh sạch bằng bộ sinh phẩm QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) và gửi đọc trình tự trực tiếp.

Các chuỗi nucleotide gen N được sắp xếp so sánh bằng chương trình GENEDOC2.7 (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>), xây dựng phả hệ nguồn gốc bằng chương trình MEGA7, sử dụng phương pháp “*tiếp cận cực đại*” (Maximum likelihood), với hệ số kiểm định tin tưởng bootstrap là 1000 lần lặp lại (Kumar et al., 2016).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thực hiện phản ứng PCR, giải trình tự một phần gen N

Sản phẩm PCR thu được có kích thước khoảng 0,4 kb, kết quả điện di ở hình 1 cho thấy chất lượng tốt, băng DNA sáng, đơn băng. Sau khi giải trình tự, phần gen N có kích thước 403 bp của 8 mẫu IBV của Việt Nam đã được thu nhận. Từ mẫu bệnh phẩm IBST5, hai chuỗi gen đặt tên là IBST5-1 và IBST5-2 đã thu được, chứng tỏ trong đó có hai hệ gen của IBV song nhiễm trong cùng một cá thể gà bệnh. Tất cả các chuỗi gen này được sử dụng để phân tích đặc điểm phân tử và phả hệ nguồn gốc.



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR của 5 chủng IBST và 3 chủng IBVL trên thạch agarose 1%
M: Chỉ thị phân tử DNA của thực khuẩn thể Lambda được cắt bằng HindIII. Các mẫu thu từ Sóc Trăng ký hiệu ST và từ Vĩnh Long ký hiệu VL.

3.2. Khoảng cách di truyền và biến đổi nucleotide giữa các chủng IBV

Trình tự 403 nucleotide gen N của 25 chủng

IBV (bảng 1) được đưa vào chương trình GeneDoc2.7 để sắp xếp so sánh và MEGA7 để phân tích mức độ đồng nhất về thành phần nucleotide (bảng 2).

Bảng 2. Khoảng cách di truyền (%) giữa các chủng IBV của Việt Nam trong nghiên cứu này và một số chủng tham chiếu đại diện của thế giới

		Các chủng IBV Việt Nam trong nghiên cứu này								Các chủng tham chiếu của thế giới										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	IBST4																			
2	IBST3	0,2																		
3	IBST9	0,2	0,0																	
4	IBST5-2	4,7	4,5	4,5																
5	IBST5-1	4,7	4,5	4,5	0,5															
6	IBVL17	8,8	8,6	8,6	6,2	6,8														
7	IBST14	8,8	8,6	8,6	6,8	7,3	1,2													
8	IBVL22	8,8	8,6	8,6	6,8	7,3	1,2	0,0												
9	4-91 vaccine	0,2	0,0	0,0	4,5	4,5	8,6	8,6	8,6											
10	gamma- CoV-74	0,9	0,8	0,8	5,2	5,2	9,4	9,2	9,2	0,8										
11	H52 (vaccine)	3,2	3,0	3,0	4,9	4,7	9,1	8,4	8,4	3,0	3,7									
12	Cal557	4,4	4,2	4,2	4,2	4,0	8,2	8,8	8,8	4,2	4,9	2,2								
13	THA 80151	4,7	4,5	4,5	3,3	3,2	7,5	8,3	8,3	4,5	5,4	4,7	4,3							
14	TN92	4,4	4,2	4,2	1,1	0,6	6,7	7,3	7,3	4,2	4,9	4,3	3,7	2,7						
15	Mass41- 72	4,5	4,4	4,4	0,9	0,5	6,7	7,3	7,3	4,4	5,1	4,5	3,8	3,0	0,5					
16	Mass41	4,7	4,5	4,5	0,5	0,0	6,8	7,3	7,3	4,5	5,2	4,7	4,0	3,2	0,6	0,5				
17	LX4	6,9	6,8	6,8	7,1	7,7	3,7	3,8	3,8	6,8	7,5	5,3	6,9	7,1	7,3	7,3	7,7			
18	SDZB 0808	7,3	7,1	7,1	5,9	6,0	3,2	4,2	4,2	7,1	8,0	7,2	6,7	5,8	5,7	5,7	6,0	3,0		
19	SZ	7,5	7,3	7,3	7,0	7,5	2,5	2,4	2,4	7,3	8,1	7,5	8,1	7,5	7,1	7,2	7,5	2,8	4,0	
20	ck-CH- LBJ- 120481	8,4	8,2	8,2	6,8	6,9	2,0	2,2	2,2	8,2	9,2	8,5	8,4	7,5	6,9	6,9	6,9	3,8	3,4	3,3

Ghi chú: Các chủng IBV của Việt Nam trong nghiên cứu này (1 đến 8) được bôi khung nền chỉ định. Số liệu các chủng Việt Nam so sánh với nhau và với các chủng đại diện của thế giới được bôi đậm.

Khoảng cách di truyền (pairwise genetic distance) theo cặp giữa 20 chủng bao gồm 8 chủng của Việt Nam trong nghiên cứu này và 12 trình tự tham chiếu của các chủng khác nhau trên thế giới (liệt kê ở bảng 1) được tính toán bằng

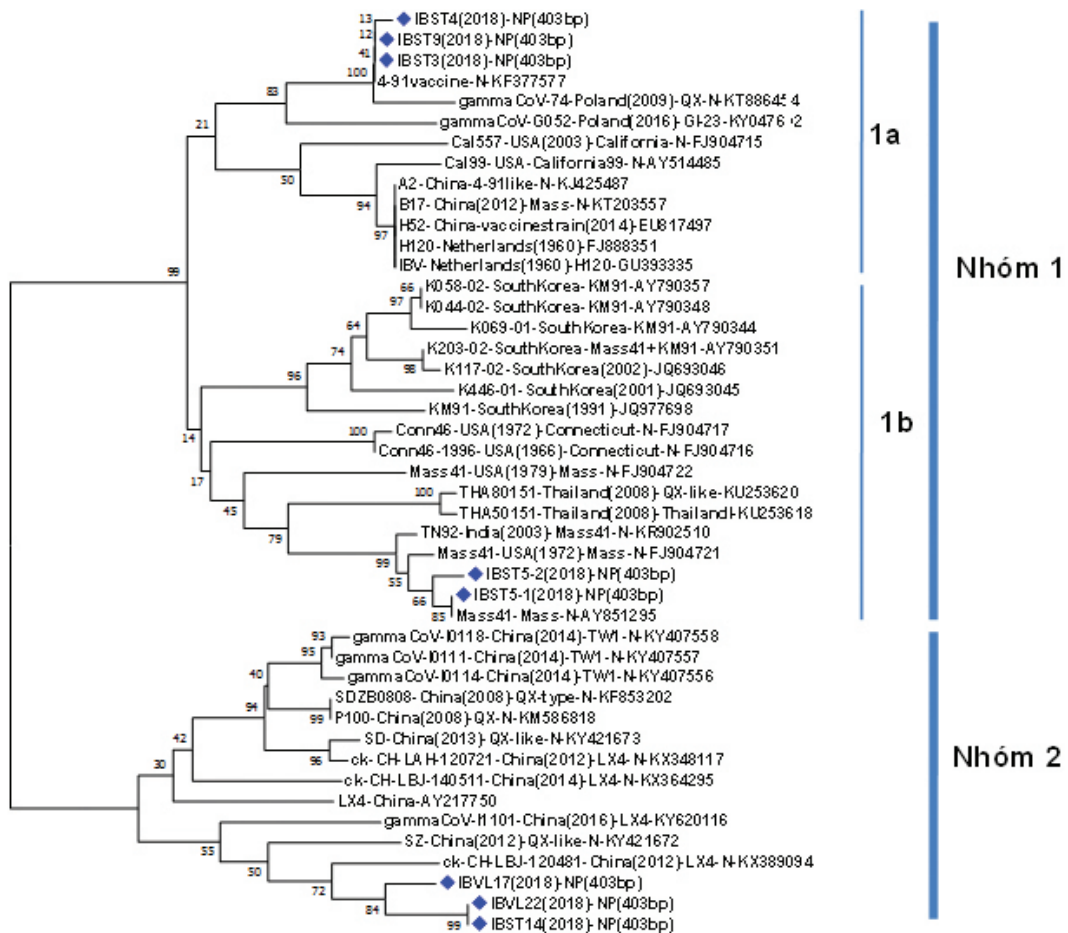
phương pháp đơn giản (khoảng cách p-distance). Giữa các chủng Việt Nam, một số nhóm chủng có khoảng cách di truyền rất thấp, cụ thể 0-0,2% giữa 3 chủng IBST3, IBST4, IBST9 (số 1-3), 0,5% giữa 2 chủng IBST5-1 và IBST5-2 (số 4-5)

và 0% giữa IBST14 và IBVL22 (số 7-8).

So sánh với các chủng của thế giới chúng tôi thấy, 3 chủng IBST3, IBST4, IBST9 là các chủng vacxin giống với chủng 4-91 vacxin (KF377577) của Trung Quốc do độ sai khác chỉ là 0-0,2%. Hai chủng song nhiễm trên gà là IBST5-1 và IBST5-2 do có khoảng cách di truyền thấp, chỉ là 0-0,5% với chủng Mass41 nên có khả năng dẫn xuất từ chủng này và lưu cữu trong đàn (bảng 2).

3.3. Phân tích phả hệ và phân nhóm độc lực của các chủng nghiên cứu

Bằng chương trình MEGA7 (Kumar et al., 2016), trình tự chuỗi nucleotide gen N của 8 chủng IBV trong nghiên cứu này, cùng với 17 chủng khác của thế giới (bảng 2) được sử dụng để phân tích mối quan hệ phả hệ, từ đó, xác định phân nhóm dựa trên sắp xếp các chủng trong phân nhóm tương ứng (hình 2).



Hình 2. Cây phả hệ xác định phân nhóm giữa chủng IBV Việt Nam và thế giới

Phân tích dựa trên so sánh trình tự một phần nucleotide gen N bằng chương trình MEGA7, sử dụng phương pháp “tiếp cận cực đại” (maximum likelihood, ML) với độ tin cậy bootstrap 1000 lần lặp lại (Kumar et al., 2016). Hệ số tin tưởng (bootstrap) được ghi ngay tại mỗi nhóm phân nhánh. Ghi chú: sau tên chủng là tên quốc gia mà chủng đó xuất xứ/phân lập và năm phân lập (nếu có), sau cùng là số đăng ký Ngân hàng gen (xem bảng 1); biểu tượng hình vuông chỉ dẫn các chủng IBV phân lập ở Sóc Trăng và Vĩnh Long trong nghiên cứu này.

Kết quả phân tích phả hệ thể hiện ở hình 2 cho thấy, tất cả 25 chủng (Việt Nam và thế giới) được chia thành 2 nhóm chính. Nhóm 1 bao gồm các mẫu của thế giới, và 3 mẫu IBV phân lập năm 2018 tại Sóc Trăng (IBST4; IBST3; IBST9) cùng với chủng vacxin 4-91 (KF377577) trong nhóm phụ 1a; và 2 mẫu khác (IBST5-1; IBST5-2) cùng với Mass41 (AY851295) thuộc dòng Mass41 nhóm phụ 1b. Nhóm 2 bao gồm các chủng có nguồn gốc hoàn toàn từ Trung Quốc, và 2 mẫu của Vĩnh Long (IBVL17, IBVL22) và 1 mẫu của Sóc Trăng (IBST14) trong phân nhóm phụ 2a, cùng với QX và LX4 (QX-like) của Trung Quốc (hình 2). Các mẫu của Việt Nam nằm trong cùng nhóm với các chủng cường độc IBV thuộc các dòng mới xuất hiện gần đây là QX, QX-like, LX4 cho thấy, rất có thể các mẫu IBV này của Việt Nam có xuất xứ xâm nhập từ Trung Quốc.

3.4. Một số thảo luận

Một số chủng IBV đã được phát hiện, phân lập và khảo sát đặc điểm sinh học phân tử trên gà tại Sóc Trăng và Vĩnh Long và bước đầu genotype/dòng xuất xứ đã được xác định. Như vậy, trong 8 mẫu nghiên cứu, có 3 mẫu tương đồng cao với chủng 4-91, 2 mẫu với Mass41 và 3 mẫu có xu hướng thuộc các loại IBV mới cùng với LX4 và QX-like của Trung Quốc.

Ba mẫu ở Sóc Trăng (IBST3, IBST5, IBST9) mặc dù phân lập từ đàn bệnh (bảng 1), có sai khác rất thấp (0-0,2%) hay nói cách khác, có mức độ đồng nhất gần như tuyệt đối với chủng vacxin 4-91 (Ngân hàng gen: KF377577) và phân tích phả hệ (hình 2) cũng cho thấy các chuỗi nucleotide có sự sắp xếp cùng một phân nhánh với chủng vacxin 4-91. Đây là loại vacxin nhược độc do công ty Intervet sản xuất (Nobilis IB 4-91) (www.thepoultrysite.com/focus/contents/IB491.pdf). Do loại vacxin này được sử dụng tại Việt Nam, nên có thể đã tăng độc lực do lưu trữ trong tự nhiên và có khả năng gây bệnh trở lại. Mặc dù có mức độ đồng nhất cao, nhưng chúng tôi chưa xác định 3 chủng này

thuộc loại vacxin hoàn toàn hay là các chủng vacxin 4-91 đã “tái độc” (cường độc hóa trở lại).

Hai chủng song nhiễm (IBST5-1, IBST5-2) ở Sóc Trăng thuộc dòng Mass41, trong đó dòng Mass41 cung cấp nhiều chủng vacxin đang được sử dụng trên toàn thế giới. Với sự đồng nhất cao với chủng cường độc Mass41 (AY851295), 2 chủng IBV song nhiễm này ở Sóc Trăng có khả năng là chủng cường độc đang gây bệnh. Điều đặc biệt chú ý là 3 chủng ở Sóc Trăng và Vĩnh Long (IBST14; IBVL17; IBVL22) có sự đồng nhất cao và tập hợp cùng nhóm với một số chủng Trung Quốc được xác định có xu hướng thuộc về dòng LX4 hay còn gọi là QX-like (Li và Chen, 2017). Như vậy, khả năng đây là các chủng có xuất xứ từ LX4 và từ Trung Quốc xâm nhập vào Việt Nam. Nhiều chủng/genotype IBV của Việt Nam có xuất xứ từ Trung Quốc và các nước trong vùng được xác định trong các công bố gần đây (Trần Ngọc Bích et al., 2017; Nguyễn Thị Loan et al., 2017; Nguyễn Thị Loan, 2019).

Tuy số lượng mẫu còn ít và địa bàn chỉ là 2 tỉnh ở Đồng bằng sông Cửu Long, nhưng nghiên cứu của chúng tôi đã bước đầu chỉ ra rằng có ít nhất 3 nhóm virus IB đang nhiễm trên đàn gà và sự đa nhiễm trên cùng một cá thể gà bệnh. Trong đó, ghi nhận nhóm 4-91 và Mass41 tương tự kết quả của Võ Thị Trà An và cộng sự (2012) và phát hiện nhóm LX4 hay QX-like tại các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long khẳng định sự lưu hành của chúng như Trần Ngọc Bích et al. (2017) cho thấy sự gây bệnh phức tạp gồm nhiều dòng IBV khác nhau có nguồn gốc Trung Quốc. IB vẫn là vấn đề dịch bệnh khá phức tạp trên toàn thế giới và IBV không ngừng tiến hóa, phát sinh nhiều genotype và phân dòng mới (Lin và Chen, 2017) càng làm cho IB trở nên nghiêm trọng hơn. Kết quả của nghiên cứu này góp phần làm sáng tỏ IBV tại các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long có sự đa dạng di truyền cao với sự xuất hiện của các chủng thuộc các dòng IBV cường độc có thể có nguồn gốc xuất xứ từ Trung Quốc.

IV. KẾT LUẬN

Tám chủng IBV của Việt Nam, phân lập tại Sóc Trăng và Vĩnh Long năm 2018 được xác định thuộc 3 nhóm 4-91; Mass41 và LX4 (QX-like), nhóm này có thể xuất xứ từ Trung Quốc từ kết quả phân tích khoảng cách di truyền và phả hệ dựa trên chuỗi gen nucleoprotein (N). Kết quả của nghiên cứu này góp phần làm sáng tỏ các chủng và nhóm IBV đang lưu hành tại một số tỉnh đồng bằng sông Cửu Long có sự đa dạng di truyền cao để lưu ý về dịch tễ học và truy xuất nguồn gốc.

Lời cảm ơn: Cảm ơn tài trợ kinh phí của Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ quốc gia (NAFOSTED) cho đề tài “Nghiên cứu đặc điểm hệ gen và xác định genotype (genotyping) một số virus RNA gây bệnh truyền nhiễm ở gia cầm tại Việt Nam”, mã số 106-NN.02-2013.37 để thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bande F, Arshad SS, Bejo MH, Moeini H and Omar AR (2015). Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *Journal of Immunology Research*: 424860.
2. Cavanagh D (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Veterinary Research* 38: 281–297.
3. Feng J, Hu Y, Ma Z, Yu Q, Zhao J, Liu X, Zhang G (2012). Virulent avian infectious bronchitis virus, People's Republic of China. *Emerg Infect Dis* 18(12):1994–2001.
4. Hemida MG, Al-Hammadi MA, Daleb AHS, Gonsalves CR (2017). Molecular characterization and phylogenetic analyses of virulent infectious bronchitis viruses isolated from chickens in Eastern Saudi Arabia. *Virus Disease* 28(2):189–199.
5. Huang YP, Lee HC, Cheng MC, Wang CH (2004). S1 and N gene analysis of avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. *Avian Dis* 48(3):581–589.
6. Ignjatovic J and Sapats S (2005). Identification of previously unknown antigenic epitopes on the S and N proteins of avian infectious bronchitis virus. *Arch Virol* 150:1813–1831.
7. Ignjatovic J, Ashton DF, Reece R, Scott P, Hooper P (2002). Pathogenicity of Australian strains of Avian infectious bronchitis virus. *J Comp Pathol* 126(2–3):115–123.
8. Jackwood MW (2012). Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis* 56:634–641.
9. Jackwood MW, Hilt DA and Brown TP (2003). Attenuation, safety, and efficacy of an infectious bronchitis virus GA98 serotype vaccine. *Avian Dis* 47(3): 627–632.
10. Jungherr EI, Chomiak TW, Luginbuhl RE (1956). Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. In: Proceedings 60th Annual Meeting US Livestock Sanitary Association; Chicago, IL, pp. 203–209.
11. Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33(7):1870–1874
12. Lee HJ, Youn HN, Kwon JS, Lee YJ, Kim JH, Lee JB, Park SY, Choi IS and Song CS (2010). Characterization of a novel live attenuated infectious bronchitis virus vaccine candidate derived from a Korean nephropathogenic strain. *Vaccine* 28:2887–2894.
13. Lee SW, Markham PF, Coppo MJ, Legione AR, Markham JF, Noormohammadi AH, Browning GF, Ficorilli N, Hartley CA and Devlin JM (2012). Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. *Science* 337:188.
14. Lin SY and Chen (2017). Infectious Bronchitis Virus Variants: Molecular Analysis and Pathogenicity Investigation. *Int J Mol Sci* 18(10).

15. McKinley ET, Hilt DA, Jackwood MW (2008). Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. *Vaccine* 26:1274–1284.
 16. McKinley ET, Jackwood MW, Hilt DA, Kissinger JC, Robertson JS, Lemke C, Paterson AH (2011). Attenuated live vaccine usage affects accurate measures of virus diversity and mutation rates in avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virus Res* 158(1-2):225–234.
 17. Mo ML, Li M, Huang BC, Fan WS, Wei P, Wei TC, Cheng QY, Wei ZJ, Lang YH (2013). Molecular characterization of major structural protein genes of avian coronavirus infectious bronchitis virus isolates in Southern China. *Viruses* 5(12):3007–3020.
 18. Nguyễn Thị Loan, Lê Trần Bắc, Lại Thị Lan Hương, Lê Huỳnh Thanh Phương, Thân Văn Thái, Lê Văn Phan (2017). Phân tích trình tự gen S1 của chủng virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm phân lập được tại huyện Ba Vì - Hà Nội năm 2014. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 15(8):1002–1013.
 19. Nguyễn Thị Loan (2019). “Nghiên cứu dịch tễ học bệnh viêm phế quản truyền nhiễm (infectious bronchitis- IB) ở gà nuôi tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam”. Luận án Tiến sĩ chuyên ngành Dịch tễ thú y. Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Hà Nội, 2019.
 20. Sharma JM (1999). Introduction to poultry vaccines and immunity. *Adv Vet Med* :41:481–494.
 21. Sjaak de Wit JJ, Cook JK and van der Heijden HM (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol* 40(3):223–235.
 22. Toro H, Van Santen VL, Jackwood MW (2012). Genetic diversity and selection regulates evolution of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 56:449–455.
 23. Tran Ngoc Bich, Nguyen Phuc Khanh, Pham Hoang Dung, Nguyen Thi Cam Loan (2017). Molecular characterization of infectious bronchitis virus (IBV) isolated from commercial chicken farms. *Can Tho University Journal of Science* 6: 56–62.
 24. Valastro V, Holmes EC, Britton P, Fusaro A, Jackwood MW, Cattoli G, Monne I (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: an attempt to harmonize virus classification. *Infect Genet Evol* 39:349–364.
 25. Võ Thị Trà An, Nguyễn Thị Kim Yến, Hồ Hoàng Dũng (2012). Phân lập, định serotype virus viêm phế quản truyền nhiễm từ gà thịt. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y* 19:5–9.
 26. You JH, Reed ML and Hiscox JA (2007). Trafficking motifs in the SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 358(4):1015–1020.
- Ngày nhận 21-12-2018
 Ngày phản biện 31-3-2019
 Ngày đăng 1-7-2019