

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Thu Hiền

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ GEN *MEQ*
CỦA VIRUS GÂY BỆNH MAREK TRÊN GÀ
TẠI MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM**

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8 42 01 14

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

TS. Đoàn Thị Thanh Hương

Hà Nội -2022

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. 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 toàn chịu trách nhiệm.

Tác giả

Nguyễn Thị Thu Hiền

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, em xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới TS. Đoàn Thị Thanh Hương, người đã hướng dẫn trực tiếp và cảm ơn cô đã tạo điều kiện tốt nhất cho tôi học tập và nghiên cứu. Cảm ơn cô đã cho em những kiến thức, những lời khuyên và giải thích cho em những vấn đề thực tiễn và lý thuyết bổ ích.

Em xin được chân thành cảm ơn tới TS. Nguyễn Thị Khuê, ThS. Đỗ Thị Roan, ThS. Phạm Thị Khánh Linh, cùng các cô, chú, anh, chị, em Phòng Miễn dịch học - Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình giảng dạy và giúp đỡ em để em có thể có đủ kiến thức để hoàn thành luận văn của mình.

Đồng thời em cũng xin trân trọng cảm ơn Ban Giám hiệu nhà trường, Ban Chủ nhiệm Khoa Công nghệ Sinh học – Học viện Khoa học và Công nghệ đã tạo điều kiện trong suốt thời gian em học tập tại trường.

Tiếp theo em xin gửi lời cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Nhà nước (NVQG) “Nghiên cứu khai thác và phát triển nguồn gen vi rút gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm (Infectious bronchitis virus –IBV) và Marek (Marek Disease Virus-MDV) ở gà”, mã số : NVQG-2019/ĐT.03 do TS. Nguyễn Thị Khuê làm chủ nhiệm (thời gian thực hiện đề tài từ tháng 3/2019 – 3/2023) đã giúp tôi thực hiện luận văn này.

Lời sau cùng, em xin được gửi lời cảm ơn đến gia đình, đặc biệt là bố, mẹ, bạn bè, những người luôn sẵn sàng chia sẻ, giúp đỡ em trong học tập và cuộc sống.

Em xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày tháng năm 2022

Nguyễn Thị Thu Hiền

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	vii
MỞ ĐẦU	1
1. Tính cấp thiết của đề tài	1
2. Mục đích nghiên cứu	2
3. Nội dung nghiên cứu.....	2
4. Ý nghĩa của đề tài	3
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	4
1.1. Tổng quan về bệnh Marek.....	4
1.1.1 Phân loại virus gây bệnh	5
1.1.2. Hình thái, cấu trúc của virus MDV.....	6
1.1.3. Tuổi mắc bệnh, tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong	9
1.1.4. Cơ chế sinh bệnh.....	10
1.1.5. Triệu chứng, bệnh tích	11
1.1.6. Phương pháp chẩn đoán	13
1.1.7. Phòng bệnh	15
1.2. Gen gây ung thư của MDV	16
1.2.1. Gen Marek's EcoRI-Q	16
1.2.2. Vùng BamHI-H.	25
1.3. Tình hình nghiên cứu MDV trên thế giới và Việt Nam.....	19
1.3.1. Tình hình nghiên cứu MDV trên thế giới	26
1.3.2. Tình hình nghiên cứu MDV ở Việt Nam	21
CHƯƠNG: ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	23
2.1. Đối tượng, vật liệu và phạm vi và thời gian nghiên cứu.....	23
2.1.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu	23
2.1.2. Phạm vi nghiên cứu	23
2.1.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu.....	23

2.2. Cơ sở vật chất và trang thiết bị nghiên cứu	24
2.2.1. Các dụng cụ và thiết bị.....	24
2.2.2. Hóa chất.....	24
2.3. Phương pháp nghiên cứu	24
2.3.1. Sơ đồ nghiên cứu	24
2.3.2. Phương pháp thu thập mẫu bệnh phẩm.....	25
2.3.3. Phương pháp tách chiết DNA tổng số	25
2.3.4. Phương pháp thiết kế môi	26
2.3.5. Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction).....	28
2.3.6. Phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR	29
2.3.7. Phương pháp giải trình tự Sanger	30
2.3.8. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu.....	31
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	32
3.1. Thu nhận và giải trình tự gen <i>Meq</i> từ mẫu bệnh phẩm	32
3.1.1. Sàng lọc mẫu có chứa virus Marek.....	39
3.1.2. Kết quả thu nhận trình tự nucleotide toàn bộ gen <i>Meq</i>	34
3.2. Kết quả phân tích đặc điểm phân tử gen <i>Meq</i>	38
3.2.1. Một số đặc điểm phân tử gen <i>Meq</i>	38
3.2.2. Kết quả so sánh tỷ lệ (%) đồng nhất về nucleotide và amino acid giữa các chủng GaHV2 nghiên cứu với trình tự gen tương ứng trên thế giới.....	53
3.3. Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc	55
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	60
TÀI LIỆU THAM KHẢO	61

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
MDV	Marek's Disease Virus	Vi rút gây bệnh Marek
bp	Base pair	Cặp base
DNA	Deoxyribonucleic acid	Phân tử DNA
GaHV-2	Gallid anphaherpesvirus-2	Vi rút Marek serotype 1
GaHV-3	Gallid anphaherpesvirus-3	Vi rút Marek serotype 2
MeHV1	Meleagrid herpesvirus-1	Vi rút Marek serotype 3
<i>Meq</i>	Marek's disease virus EcoRI fragment Q	Gen <i>Meq</i>
att	Attenuated	Nhược độc
m	Mild	Độc lực yếu
v	Virulent	Độc lực
vv	Very virulent	Độc lực cao
vv+	Very virulent plus	Độc lực cực cao
pp38	Phosphoprotein 38	Protein pp38
US	Unique Short	Vùng ngắn duy nhất
UL	Unique Long	Vùng dài duy nhất
TRL	Terminal repeat long	Vùng lặp lại giới hạn dài
IRL	Internal repeat long	Vùng lặp lại nội bộ dài
TRS	Terminal repeat short	Vùng lặp lại giới hạn ngắn
IRS	Internal repeat short	Vùng lặp lại nội bộ ngắn
BR1	Basic region 1	Vùng có tính bazơ 1
BR2	Basic region 2	Vùng có tính bazơ 2
PCR	Polymesase Chain Reaction	Phản ứng tạo chuỗi do polymerase
TAE	Tris-acetate-EDTA	Dung dịch đệm TAE
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphate	
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis	Chương trình MEGA
Epp:	Eppendorf	Ống Eppendorf
NCBI	National Centre for Biotechnology Information	Trung tâm thông tin CNSH

DANH MỤC CÁC BẢNG BIỂU

Bảng 1.1. Đặc điểm phân biệt bệnh Marek và bệnh Leuko	14
Bảng 2.1. Danh sách các mẫu sử dụng trong nghiên cứu	23
Bảng 2.2. Trình tự các môi sử dụng trong nghiên cứu	27
Bảng 2.3. Thành phần và chu trình nhiệt phản ứng PCR thu nhận gen <i>Meq</i>	28
Bảng 3.1. Danh sách các chủng MDV của Việt Nam và thế giới sử dụng trong nghiên cứu	38
Bảng 3.2. Phân tích đặc tính phân tử protein <i>Meq</i> của các chủng GaHV-2	41
Bảng 3.3. Các vị trí sai khác amino acid trong gen <i>Meq</i> giữa các chủng GaHV-2 nghiên cứu so với các chủng trên thế giới	51
Bảng 3.4. Tỷ lệ (%) đồng nhất về thành phần nucleotide và amino acid toàn bộ gen <i>Meq</i> của 08 chủng GaHV-2 (Việt Nam) với các chủng đại diện trên thế giới	54

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1: Cấu tạo virus MDV	7
Hình 1.2. Cấu trúc bộ gen MDV ở dạng thẳng và dạng vòng [30].	8
Hình 1.3: Sơ đồ giải mã bộ gen chủng Md5 của GaHV-2 [4].	9
Hình 1.4: Mắt gà khi nhiễm Marek	20
Hình 1.5: Khối u hình thành trên da	12
Hình 1.6: Lách xuất huyết.....	21
Hình 1.7: Gan sưng, hình thành khối u.....	13
Hình 1.8: Vị trí của gen <i>Meq</i> nằm trong bộ gen [57]	18
Hình 2.1: Sơ đồ nghiên cứu	25
Hình 2.2: Kết quả BLAST trình tự mỗi GaHV2 - MeqF trên NCBI.....	28
Hình 3.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR bằng cặp mồi Marek-F – Marek-R.....	32
Hình 3.2. Kết quả truy cập Ngân hàng gen của các chủng nghiên cứu	33
Hình 3.3: Sản phẩm PCR được khuếch đại bằng cặp mồi GaHV2-MeqF/GaHV2-MeqR. Phân tích sản phẩm trên gel agarose 1%.	35
Hình 3.4: Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen <i>Meq</i> của 8 chủng GaHV-2 nghiên cứu.....	37
Hình 3.5: Sự sai khác về vị trí amino acid của các chủng trong nghiên cứu.....	45
Hình 3.6: Sự gián đoạn motif PPPP của các chủng nghiên cứu	48
Hình 3.7: Cây phả hệ xác định mối quan hệ nguồn gốc của các chủng GaHV-2 dựa trên trình tự amino acid của toàn bộ gen <i>Meq</i>	57

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Marek là một trong những bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, gây thiệt hại lớn về kinh tế cho ngành chăn nuôi gia cầm trên toàn thế giới và được gọi là căn bệnh của thế kỷ XX [1]. Bệnh Marek (Marek's disease – MD) do nhà khoa học Hungary phát hiện lần đầu tiên năm 1907, sau đó được phát hiện ở nhiều nước trên thế giới. Theo thống kê của Tổ chức dịch tễ Thú y thế giới (Office International des Epizooties – OIE), tính từ năm 2005 đến năm 2016 bệnh Marek đã xuất hiện ở 93 quốc gia trên thế giới, bao gồm các nước phát triển mạnh về chăn nuôi như: Mỹ, Anh, Canada, Hà Lan Việt Nam [2].

Virus gây bệnh Marek (Marek's disease virus – MDV) là virus DNA, thuộc họ *Herpesviridae*, chi *Mardivirus*, có khả năng điều khiển làm tăng sinh tế bào gây nên các dạng khối u ở cơ quan nội tạng của gia cầm [3]. Dựa trên các đặc điểm huyết thanh học, bệnh được chia thành 3 serotype khác nhau: serotype 1 được gây ra bởi *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2) là loại virus có độc lực mạnh, gây thiệt hại về kinh tế nặng nề; serotype 3 được gây ra bởi *Meleagrid herpesvirus 1* (MeHV-1 hay HVT), có độc lực yếu hơn; serotype 2 do *Gallid herpesvirus 3* (GaHV-3) không có khả năng gây bệnh cho gà nên không được quan tâm nhiều [4, 5]. Trong 3 loại serotype trên, bộ gen của GaHV-2 có kích thước lớn nhất (174,046 bp), sau đó là GaHV-3 (164,270 bp) và MeHV-1 (160,673 bp) [6]. Trong hệ gen của GaHV-2, gen *Meq* được coi là gen kháng nguyên của virus, vừa quyết định tính kháng nguyên, vừa quyết định tính độc lực của virus [7]. Các báo cáo trước đây cho thấy số lượng motif PPPP và các đa ình và đột biến điểm khác nhau trong vùng gen *Meq* có tương quan với độc lực của virus [8, 9]. Dựa trên tỷ lệ tử vong ở các đàn, tần suất mắc bệnh và khả năng bảo hộ của vaccine hiện có, các chủng GaHV-2 đã được chia thành 5 pathotypes là:

nhược độc (att), độc lực vừa (mMDV), độc lực (vMDV), độc lực cao (vvMDV), và độc lực cực cao (vv+ MDV) [10].

Ở Việt Nam, bệnh Marek lần đầu tiên được báo cáo vào năm 1978 với tên gọi “teo chân gà”, “ung thư gà”, “hội chứng khối u”... .Đến năm 1980, tại miền Bắc, bệnh bùng phát mạnh, nhiều trang trại gà giống phải tiêu hủy cả đàn mặc dù các trại gà này đã dùng chủng virus vaccine HVT hoặc CVI988/Rispens để phòng bệnh [11, 12, 13]. Chủng virus gây bệnh tại các ổ dịch đã được phân lập và xác định là chủng có độc lực cao. Thực tế trên cho thấy đã có nhiều biến chủng virus MDV mới tại Việt Nam mà các chủng virus vaccine không còn phù hợp nữa. Cho đến khi đề tài này tiến hành, chỉ mới có một vài nghiên cứu về sinh học phân tử nhằm xác định chính xác genotype của chủng virus MDV đang gây bệnh. Nhu cầu nghiên cứu gen, đặc điểm phân tử của các chủng virus MDV đang lưu hành là rất cần thiết nhằm phục vụ nghiên cứu, ứng dụng trong chẩn đoán, phân định type, dịch tễ học và đa dạng sinh học.

Xuất phát từ nhu cầu và mục tiêu trên chúng tôi thực hiện đề tài “**Nghiên cứu đặc điểm phân tử gen *Meq* của virus gây bệnh Marek trên gà tại một số tỉnh Miền Bắc Việt Nam**”.

2. Mục đích nghiên cứu

- Thu nhận và giải trình tự toàn bộ gen kháng nguyên *Meq* của các chủng virus gây bệnh Marek ở một số tỉnh miền Bắc Việt Nam.
- Phân tích được một số đặc điểm phân tử, phá hệ nguồn gốc của virus và xác định chủng gây bệnh.

3. Nội dung nghiên cứu

- Giải trình tự toàn bộ vùng gen *Meq*
- Phân tích phá hệ nguồn gốc của các chủng GaHV-2 Việt Nam và thế giới dựa trên dữ liệu gen *Meq* từ đó xác định chủng virus đang lưu hành tại Việt Nam
- Phân tích đặc điểm phân tử vùng gen *Meq* của các chủng Việt Nam và so

sánh với các chủng trên thế giới.

4. Ý nghĩa của đề tài

4.1. Ý nghĩa khoa học

- Cung cấp dữ liệu khoa học về gen kháng nguyên *Meq*, đặc điểm phân tử và phả hệ nguồn gốc của virus MDV gây bệnh Marek trên gà.

- Cung cấp thêm thông tin về thành phần, đặc điểm, cấu trúc gen *Meq* của virus MDV nhằm phục vụ nhu cầu phát triển vaccine.

4.2. Ý nghĩa thực tiễn

- Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học để có thể lựa chọn vaccine phòng bệnh Marek đạt hiệu quả nhất.

- 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 MDV từ đó có thể lựa chọn các chủng vaccine phù hợp và có hiệu quả hơn trong công tác phòng bệnh.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về bệnh Marek

Bệnh Marek (Marek's disease - MD) là một bệnh truyền nhiễm ở gà do virus thuộc nhóm Herpes gây ra. Đặc trưng của bệnh là tăng sinh tế bào lympho, thâm nhiễm tế bào đơn nhân dưới hình thức khối u thần kinh ngoại biên và các cơ quan nội tạng, móng mắt và da [14].

Virus gây bệnh có tên gọi chung là Marek's Disease Virus (MDV) thuộc họ *Herpesviridae*, thuộc phân họ *α -Herpesvirinae*; chi *Mardivirus*. Hệ gen là DNA sợi đôi có kích thước xấp xỉ khoảng 175 kb, kích thước hạt virus dao động từ 100 đến 120 nm. MDV được chia thành 3 loại: *Meleagrid herpesvirus 1* (MeHV-1 hay HVT), *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), *Gallid herpesvirus 3* (GaHV-3). Trong đó, GaHV-2 thuộc serotype 1 là tác nhân gây bệnh Marek, biểu hiện thành u lympho ác tính ở gà bị nhiễm bệnh. MeHV-1 thường lây bệnh trên gà tây, được phát triển và sử dụng như một vaccine Marek tiềm năng. Cho đến nay, chủng virus GaHV-2 nhược độc CVI988 (còn được gọi là Rispens) vẫn được sử dụng làm vaccine tiêu chuẩn trên toàn thế giới. Theo Lachheb *et al.*, 2020, ở nhiều quốc gia trên thế giới bệnh Marek liên tục bùng phát ngay cả trên các đàn gà đã được phòng bệnh bằng vaccine, điều này cho thấy MDV đã xuất hiện nhiều biến chủng và có khả năng vượt qua các đáp ứng miễn dịch do vaccine gây ra [15].

Bệnh Marek do MDV serotype 1 (*Gallid herpesvirus 2* - GaHV-2) gây ra, là một bệnh truyền nhiễm có nguy cơ lây lan cao, gây tổn thất lớn cho ngành chăn nuôi gà công nghiệp trên toàn thế giới. Ngoài gây chết gà bệnh còn gây tổn thất gián tiếp như: tăng chi phí vệ sinh, chi phí vaccine cho tiêm phòng, gây ức chế miễn dịch ở gà và tăng tính nhạy cảm với bệnh nên gà dễ bị nhiễm các mầm bệnh khác [16]. Virus gây ra các tổn thương thần kinh, ức chế miễn dịch và sự

tăng sinh các khối u ở các cơ quan nội tạng và mô. Cơ sở phân tử cho sự gia tăng độc lực của MDV hiện nay vẫn chưa được biết, nhưng đột biến ở một số vùng của bộ gen, bao gồm: gen *Meq* (Marek's disease virus EcoRI fragment Q), phosphoprotein 38 (pp38), viral interleukin-8 (vIL-8), UL1 và UL44 trong đó đột biến ở gen *Meq* được coi là yếu tố độc lực của virus, là một trong các nguyên nhân quan trọng nhất [8,17]. Sự khác biệt di truyền của các chủng MDV trong gen *Meq* rõ ràng hơn so với các gen vIL-8, pp38, UL1 và UL4 làm cho gen *Meq* trở thành gen được dùng nhiều nhất để phân tích phát sinh loài và dự đoán xu hướng tiến hóa của virus.

Trong hệ gen của virus, gen *Meq* được coi là yếu tố chính gây ra khối u của gà [18]. Thêm vào đó gen *Meq* còn chịu trách nhiệm trực tiếp cho sự biến đổi kháng nguyên pp38 đã được báo cáo liên quan đến việc tăng cường độc và biểu hiện nhiều trong quá trình truyền nhiễm và hình thành ung thư hạch [19, 20].

Mức độ nghiêm trọng của bệnh khác nhau giữa các chủng GaHV-2 là do đột biến trong bộ gen của virus, dẫn đến các pathotype luôn thay đổi làm giảm hiệu quả của vaccine. Từ đó, những nỗ lực đã được thực hiện để xác định các pathotype mới xuất hiện để đảm bảo sự bảo vệ của vaccine [21]. Các đợt bùng phát lẻ tẻ đã được báo cáo trên toàn thế giới, ngay cả những đàn gà đã được tiêm vaccine [22] cho thấy rằng độc lực của các chủng MDV đã tăng lên trong những thập kỉ gần đây và một số các chủng phân lập dễ gây bệnh cho gà hơn các chủng cũ [23,24]. Do đó, việc sử dụng vaccine đã dẫn đến virus phát triển theo hướng độc lực cao hơn, có thể vượt qua sự bảo vệ được tạo bởi các vaccine hiện có [25].

1.1.1 Phân loại virus gây bệnh

Phân loại khoa học: Virus gây bệnh (Marek's disease virus- MDV)

Family (Họ): *Herpesviridae*

Subfamilies (Phân họ): *α -Herpesvirinae*

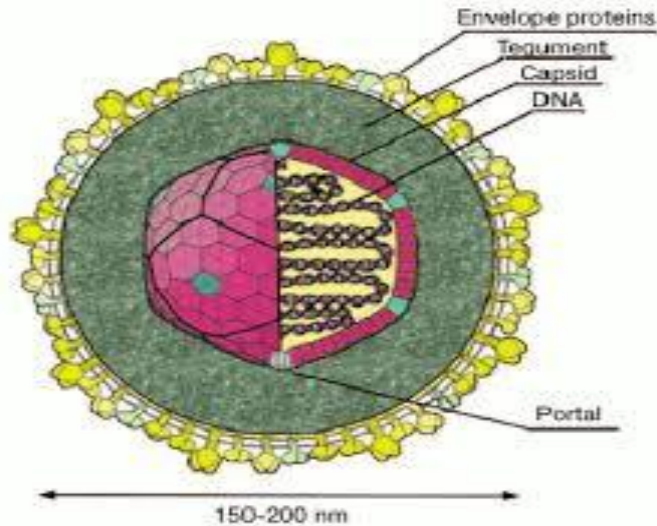
Genus (Chi): *Mardivirus*

Species (Loài): *Gallid alphaherpesvirus 2* [26].

Đến nay đã phân lập được ba serotype MDV: i) MDV serotype 1 (MDV 1) hay *Gallid herpesvirus 2* (GaHV 2): phân lập trên gà, độc lực cao và biến đổi nhanh chóng. Các chủng MDV 1 còn được phân loại theo 5 kiểu hình dựa vào độc lực thành: chủng nhược độc (att- attenuaed), chủng có độc lực trung bình (mild - mMDV), chủng độc (virulent - vMDV), chủng rất độc (very virulent - vvMDV) và chủng cực độc (very virulent plus - vv+MDV); ii) MDV serotype 2 (MDV 2) hay *Gallid herpesvirus 3* (GaHV 3): phân lập trên gà, hầu như không có độc lực; iii) MDV serotype 3 (MDV 3) hay *Herpesvirus of tukey* (HVT) tên theo phân loại chính thức gần đây nhất là *Meleagrid Herpesvirus 1* (MeHV 1): được phân lập trên gà tây, độc lực thấp. Các chủng thuộc serotype 2 và 3 không có hoặc có độc lực thấp được sử dụng làm vaccine [27].

1.1.2. Hình thái, cấu trúc của virus MDV

MDV là virus DNA sợi đôi, vỏ bọc là một khối lục giác 6 cạnh. Virus trưởng thành được bao bởi 2 lớp màng mỏng, hạt virus hoàn chỉnh có kích thước 80 - 100 nm, trong đó nhân khoảng 40 - 50 nm, virus chưa hoàn chỉnh trong tế bào chủ được tìm thấy có kích thước 70 - 80 nm [28]. MDV được tìm thấy ở ribosom sau đó virus bắt đầu di chuyển. Khi di chuyển virus MDV gắn chặt vào nhân của tế bào vật chủ. Nếu ra khỏi vật chủ virus MDV rất dễ bị phá hủy. Tại nhân của tế bào vật chủ virus bắt đầu quá trình sinh sản của mình bằng phương pháp nảy chồi.

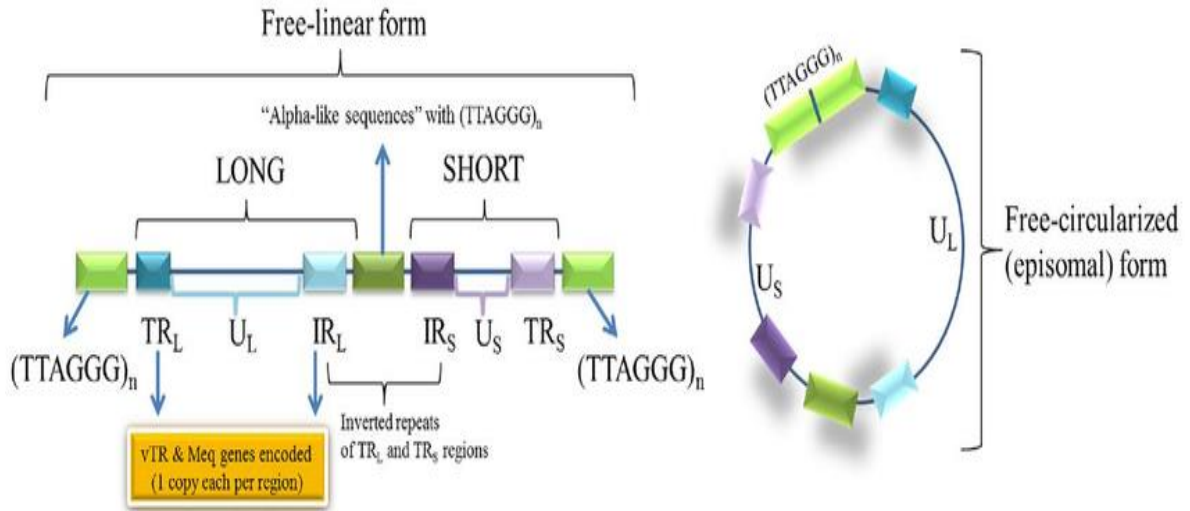


Hình 1.1: Cấu tạo virus MDV

Các hạt Herpesvirus truyền nhiễm bao gồm hơn 30 protein khác nhau, được tập hợp theo một cấu trúc phức tạp gồm:

- (1) Một capsid trung tâm chứa bộ gen của virus.
- (2) Một lớp protein gọi là tegument (ngoại biên), bao gồm hơn 15 protein.
- (3) Một lớp lipid kép trên đó có gắn khoảng 10 glycoprotein vỏ [29].

Bộ gen của MDV có kích thước từ 175 đến 180 kb, tùy thuộc vào chủng, với cấu trúc từng đoạn hoặc hình tròn khi nó độc lập với bộ gen của vật chủ. Bộ gen của virus bao gồm vùng dài (Unique long - UL) và vùng ngắn (Unique short - US), được bao bọc bởi các vùng lặp lại giới hạn dài (TRL) và ngắn (TRS) cùng với các vùng lặp lại nội bộ dài (IRL) và ngắn (IRS) (Hình 1.2). Cấu trúc bộ gen và hàm lượng gen của mỗi vùng tương tự nhau giữa tất cả các serotype của MDV. MDV serotype 1 (GaHV-2) mã hóa hơn 100 gen, phần lớn trong số đó có mặt ở các vùng UL và US [4].



Hình 1.2. Cấu trúc bộ gen MDV ở dạng thẳng và dạng vòng [30].

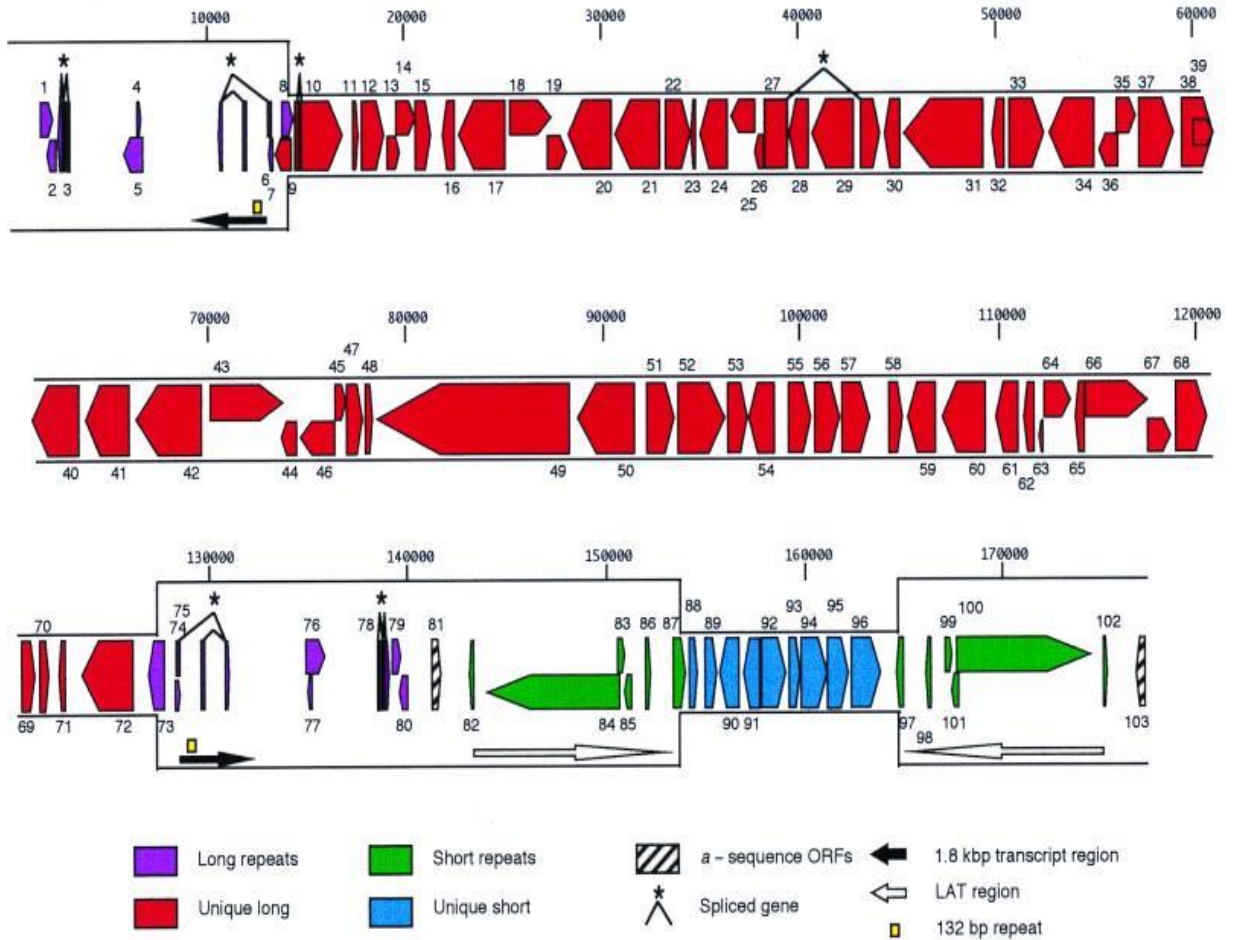
Cụ thể, bộ gen của Md5 dài 177.874 bp và chứa 44% G+C. Md5 có cấu trúc bộ gen tổng thể tương tự như các alphaherpesvirus khác gồm có :

Vùng dài: dài 113.562 bp và chứa 64 gen bao gồm: các protein lớn như protein tegument, protein envelope, capsid, protein nhân, các glycoprotein và các enzyme được mã hóa trong UL [4].

Vùng ngắn: dài 10.847 bp và chứa 9 gen bao gồm: US1, US2, US3, US6, US7, US8 và US10 cùng với các gen khác. Mỗi vùng unique được giới hạn bởi các vùng repeat đảo ngược giống hệt nhau [4].

Vùng Long repeat: dài 13.065 bp và chứa 16 gen, tất cả chúng là những gen duy nhất của MDV1. Protein được mã hóa bởi 3 gen sau liên quan đến quá trình chuyển hóa vật chất của virus trong tế bào, chúng bao gồm: Marek's *EcoRI* Q fragment protein (*Meq*), pp38 và pp24. Cùng với một số gen khác như các gen trong họ của các RNA 1,8 kb (đóng vai trò điều hướng và kích hoạt hoạt động của một số gen chuyển hóa như pp38, pp24) [4].

Vùng Short repeat: dài 12.264 bp và chứa 12 gen, nhiều gen tương tự với HSV1, như quan trọng nhất là gen chuyển hóa ngay trong giai đoạn lây nhiễm sớm, mã hóa cho protein ICP4 và nhiều gen khác mã hóa cho các protein đóng vai trò trong quá trình lây nhiễm [4].



Hình 1.3: Sơ đồ giải mã bộ gen chủng Md5 của GaHV-2 [4].

Cũng như các loại herpesvirus khác, thành phần G+C trong các vùng repeat cao hơn trong các vùng unique (49 - 50% đối với vùng repeat và 41 - 42% đối với các vùng unique) [4].

1.1.3. Tuổi mắc bệnh, tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong

Các nghiên cứu đã chứng minh mối liên quan giữa lứa tuổi của gà và độc lực của virus, cụ thể, gà càng nhỏ tuổi càng có nguy cơ mắc cảm với virus và dễ dàng phát triển thành bệnh. Gà con 1 ngày tuổi có khả năng nhạy cảm với mầm bệnh cao gấp 1.000 - 10.000 lần so với gà 14 - 26 ngày tuổi [26]. Tỷ lệ mắc bệnh Marek khá thay đổi. Trước khi sử dụng vaccine, tổn thất ở các đàn gia cầm bị ảnh hưởng ước tính đến 25-30% và có đôi khi lên tới 60% [31].

Theo nghiên cứu của Bùi Trần Anh Đào (2013) trên gà Ri tại trại gà giống Liên Ninh (Thanh Trì – Hà Nội) cho thấy: lứa tuổi mắc bệnh của gà từ 3,5 đến 10 tháng tuổi và có tỷ lệ mắc bệnh cao nhất trong khoảng thời gian từ 6 -7 tháng tuổi. Tỷ lệ tử vong cao lên tới 68,97% [32].

1.1.4. Cơ chế sinh bệnh

Theo Davidson và cộng sự (2004), MDV sao chép tương tự như các herpesvirus khác. Sự lây nhiễm ban đầu bắt đầu bằng cách virus liên kết với các thụ thể của tế bào bằng cách sử dụng glycoprotein B, C và D và xâm nhập vào tế bào đích [33]. Virus trải qua quá trình mở lớp vỏ với sự hỗ trợ của các enzym tế bào giải phóng DNA của virus để vận chuyển đến nhân. RNA được tổng hợp trong nhân và sau đó được vận chuyển vào tế bào chất để dịch mã. Virus xâm nhập vào tế bào và lây nhiễm sang các tế bào khác bằng cách tiếp xúc trực tiếp có thể thông qua việc hình thành các cầu nối nội bào [34].

Cơ chế sinh bệnh của MDV dựa trên mô hình của Cornell [35,36,37] gồm có 4 giai đoạn cơ bản như sau:

+ Giai đoạn phân giải tế bào sớm từ 2 đến 7 ngày sau nhiễm trùng: Nhiễm trùng ly giải có thể được phát hiện trong lách, tuyến ức, túi Fabricius và đạt cực đại sau 3 – 6 ngày. Shek và cộng sự (1983) phát hiện ra rằng tế bào đích chính ở cả ba cơ quan đều là tế bào B, mặc dù một số tế bào T được hoạt hóa trở thành tế bào bị nhiễm trùng và đi đến quá trình thoái hóa [37].

+ Giai đoạn tiềm ẩn từ sau 7-10 ngày sau nhiễm trùng: nhiễm trùng chuyển sang giai đoạn tiềm ẩn trùng với sự phát triển của các phản ứng miễn dịch. Hầu hết các tế bào bị nhiễm tiềm ẩn là tế bào T đã hoạt hóa [37]. Sự nhiễm trùng tiềm ẩn diễn ra dai dẳng và có thể kéo dài suốt đời [38].

+ Ly giải tế bào muộng và ức chế miễn dịch sau 18 ngày: Sau khoảng 3 tuần, các cơ quan bạch huyết tham gia và các ổ nhiễm trùng có thể tìm thấy ở mô có nguồn gốc biểu mô ở các cơ quan nội tạng khác nhau đặc biệt là ở da –

nơi xảy ra nhiễm trùng của biểu mô nang lông. Thời gian này là thời gian diễn ra sự sao chép hoàn toàn của virus [39].

+ Giai đoạn tăng sinh sau 28 ngày: những thay đổi tăng sinh bạch huyết tạo thành phản ứng cuối cùng bệnh có thể tiến triển thành khối u. Thành phần của khối u bạch huyết bao gồm một hỗn hợp của ung thư, viêm... Tỷ lệ gà chết rất cao ở giai đoạn này [40].

1.1.5. Triệu chứng, bệnh tích

1.1.5.1. Triệu chứng

Bệnh Marek có 4 dạng khác nhau đó là: thể thần kinh, thể mắt, thể da, thể nội tạng [41].

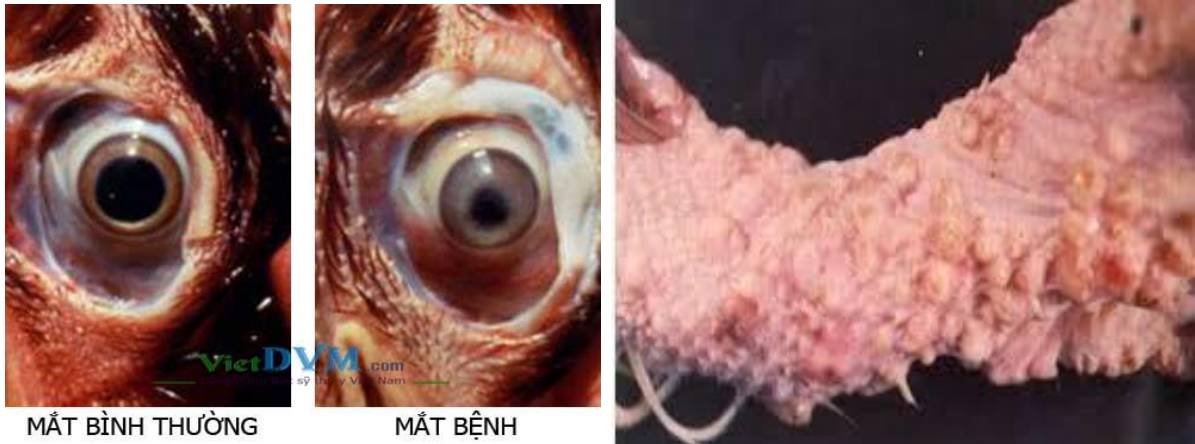
- *Thể thần kinh*: Dấu hiệu đặc trưng khi gà mắc thể thần kinh là gà không còn khả năng vận động như bình thường mà đi lại khập khiễng, gà có thể bị liệt một nửa người, một chân duỗi thẳng về phía trước, chân kia lùì lại, cánh và cổ rũ xuống, gà có thể bị liệt hoàn toàn do các dây thần kinh bị tổn thương [42].

- *Thể mắt*: Khi bị nhiễm thể bệnh này mắt gà mất dần khả năng thích ứng với ánh sáng, bệnh nặng mắt có thể bị mù; nguyên nhân do móng mắt bị dính vào tròng mắt (Hình 1.4). Khám lâm sàng cho thấy có những thay đổi ở móng mắt của gà bệnh như giảm sắc tố hình khuyên và đốm đồng tâm chuyển sang màu xám [43].

- *Thể da*: Ở thể này quan sát rõ nhất ở nhất ở đùi, ngực, hai cánh...Phần da ở những vùng trên xuất hiện những khối u hình tròn với kích thước khác nhau. Đặc biệt khi vặt lông những khối u này hiện rõ lên trên bề mặt và bám chắc vào da ở cơ đùi, ngực, vai...Những khối u này đóng vai trò quan trọng trong việc lây truyền bệnh MD (Hình 1.5).

- *Thể nội tạng*: Triệu chứng này xuất hiện trên những đàn gà mắc bệnh cấp tính. Biểu hiện của thể này là sự hình thành khối u ở các cơ quan nội tạng như gan, lá lách, thận, tim, buồng trứng ...(Hình 1.6). Trong các cơ quan trên thì gan

là cơ quan có triệu chứng rõ ràng nhất [43].



Hình 1.4: Mắt gà khi nhiễm Marek **Hình 1.5. Khối u hình thành trên da**

1.1.5.2. Bệnh tích

Bệnh tích của gà mắc bệnh MD thay đổi do tuổi, giống, sức đề kháng của từng cá thể; đặc biệt phụ thuộc nhiều vào độc lực của virus, đường xâm nhập của virus. Bệnh tích chủ yếu ở các u lympho và các cơ quan nội tạng.

+ Các dây thần kinh ngoại biên ở gà mắc bệnh Marek khi kiểm tra thấy bị mất các vân chéo, dây thần kinh chuyển thành màu xám hoặc màu vàng. Đặc điểm bệnh tích thường thấy là dây thần kinh sưng to có kích thước tăng gấp 2-3 lần so với ở gà bình thường (Hình 1.7) [42].

+ Các khối u nội tạng: MDV gây ra ức chế miễn dịch và tạo ra các khối u ở gà [44]. Các khối u có thể xảy ra ở một hoặc nhiều cơ quan khác nhau. Nhiều nghiên cứu đã công bố các tổn thương ở hạch bạch huyết, tuyến sinh dục (đặc biệt là buồng trứng), gan, lách, thận, tim, ruột, móng mắt, da, cơ...[42]. Theo nghiên cứu của Benton và Cover (1957), bệnh MD cấp tính ở gà thịt thường xuất hiện nhiều khối u ở cơ, da và phủ tạng [45].

+ Bệnh tích ở gan: Gan là một trong những cơ quan bị tổn thương nghiêm trọng khi gà bị nhiễm MDV. Sự xâm nhập virus ở gan dẫn tới mất cấu trúc tiêu thụ của gan làm cho gan bị hoại tử. Các khối u quan sát thấy ở 3 dạng chính: (i)

gan sưng to, bề mặt gan xuất hiện các khối u có kích thước khác nhau, các khối u có thể có màu trắng, màu xám hoặc màu vàng. Các khối u có thể nổi rõ ra bên ngoài hay chìm sâu trong nhu mô gan. (ii) Gan nhạt màu, mềm, dễ vỡ, nhu mô gan không đồng nhất. (iii) gan sưng to, dễ vỡ, các khối u nhỏ bằng đầu đinh ghim trên gan [46].

+ Các tổn thương ở tim: tim có màu nhợt nhạt, kích thước tim to hơn bình thường, khối u thường xuất hiện ở đỉnh tim.

+ Lách: Khối u ở lách làm cho kích thước lách sưng to từ 3-8 lần, nhạt màu.



Hình 1.6: Lách xuất huyết



Hình 1.7: Gan sưng, hình thành khối u

+ Tổn thương da thường liên quan đến các nang lông. Các khối u ở nang lông có màu hồng sẫm, cứng, nổi rõ trên da. Khối u có thể trở thành vảy tạo thành một lớp vỏ màu nâu trong những trường hợp bệnh nặng [45].

+ Những thay đổi ở mắt: Những thay đổi ở mắt bao gồm mất sắc tố trong móng mắt và sự bất thường của đồng tử. Ficken và cộng sự [43] đã mô tả trường hợp quan sát thấy viêm kết mạc, phù giác mạc và xuất huyết.

1.1.6. Phương pháp chẩn đoán

- *Chẩn đoán lâm sàng:*

Đàn gà khi mắc bệnh MD có những đặc trưng như sau:

+ Móng mắt có màu xám do sự tổn thương của các tế bào lympho. Có các khối u lympho ở nội tạng như: tim, cơ quan sinh dục, da, cơ, dạ dày tuyến..

+ Các dây thần kinh sưng to đặc biệt là dây thần kinh tọa và dây thần kinh ở cánh. Tổn thương dạng nốt ở các nang lông, mào tái và xoắn lại. Gà bỏ ăn, xác gầy, lông xù, phân trắng, loãng [32].

- *Chẩn đoán phân biệt:*

Các phương pháp chẩn đoán bệnh nhằm phân biệt với một số bệnh dễ nhầm lẫn, đặc biệt hai bệnh Marek và Leuko thường xảy ra trong cùng một đàn gà và ghép trong cùng một cá thể, có nhiều triệu chứng và bệnh tích giống nhau.

Bảng 1.1. Đặc điểm phân biệt bệnh Marek và bệnh Leuko

Đặc điểm	Bệnh Marek	Bệnh Leuko
Tuổi mắc bệnh	Bất kỳ độ tuổi nào, thường từ 6 tuần tuổi trở lên	Không dưới 6 tuần tuổi
Phương thức lây truyền	Truyền ngang	Truyền dọc
Triệu chứng liệt	Có	Không
Tỷ lệ mắc bệnh	Thường xuyên, > 5% đối với các đàn gà chưa tiêm phòng	Tỷ lệ mắc bệnh dưới 5%
Tỷ lệ tử vong	Tỷ lệ chết cao có thể lên tới 70%	Tỷ lệ chết thấp
Tế bào bạch huyết	Lympho T	Lympho B
Bệnh tích ở mắt và dây thần kinh	-Móng mắt có màu xám, đồng tử không đều nhau, có thể bị mù - Dây thần kinh sưng to	-Không có - Dây thần kinh không sưng
Khối u	Khối u nổi rõ tạo thành ranh giới đối với các tổ chức bình	Khối u chìm không có ranh giới rõ ràng

- *Chẩn đoán cận lâm sàng:* Khối u, dây thần kinh, lông vũ, mắt.... có thể dùng để phân lập virus trên môi trường tế bào, tế bào xơ phôi, tế bào thận gà... Đây là các phương pháp thường được sử dụng trong chẩn đoán bệnh Marek. Tuy

nhiên, phương pháp này có nhược điểm là thời gian chẩn đoán lâu và tốn kém. Phương pháp này thường được sử dụng để phân lập virus cho các nghiên cứu chuyên sâu để đánh giá đặc tính sinh học, lưu giữ giống.

Để chẩn đoán nhanh bệnh MD, người ta sử dụng các phương pháp huyết thanh học. Xác định kháng thể bằng các phương pháp như: ELISA, miễn dịch huỳnh quang, phương pháp kết tủa khuếch tán trên thạch. Xác định kháng nguyên bằng phương pháp PCR.

Trong các phương pháp chẩn đoán, phương pháp PCR có ưu điểm là thời gian chẩn đoán nhanh, chính xác. Đặc biệt phương pháp này có thể phân biệt được chủng virus nhược độc và chủng độc lực thực địa; đồng thời có thể xác định được chính xác chủng virus gây bệnh thông qua giải trình tự gen.

1.1.7. Phòng bệnh

1.1.7.1. Vệ sinh phòng bệnh

Vệ sinh phòng bệnh bằng cách ngăn ngừa sự tiếp xúc gà với mầm bệnh:

+ Cần xử lý nghiêm ngặt việc nhập giống gà, trứng gà : Xử lý sát trùng trước và sau khi vận chuyển từ trang trại này sang trang trại khác bằng fomoxon và thuốc tím...

+ Vệ sinh chuồng trại, dụng cụ, máng ăn,bằng các loại thuốc khử trùng. Sử dụng nguồn nước sạch, thức ăn đầy đủ dinh dưỡng và sạch sẽ.

1.1.7.2. Phòng bệnh bằng vaccine

Bệnh Marek là do virus gây nên, hiện nay vẫn chưa có thuốc đặc trị. Vì vậy, giải pháp tiêm vaccine là biện pháp được thực hiện đầu tiên. Cho đến nay MDV được kiểm soát về cơ bản dựa vào việc sử dụng vaccine sống giảm độc lực [29]. Vaccine phòng bệnh Marek được tiêm cho phôi gà 17 -18 ngày tuổi [47] hoặc tiêm dưới da khi gà được một ngày tuổi [48].

Loại vaccine được sử dụng rộng rãi ở nhiều quốc gia hiện nay là vaccine HVT do có giá thành rẻ. Loại vaccine này được sử dụng hiệu quả ở nơi virus

thực địa có độc lực vừa và các ổ dịch xảy ra không nghiêm trọng [49]

Vaccine HVT và SB-1 là vaccine thương mại đầu tiên dựa trên sự kết hợp giữa serotype 2 và 3 [50].

Vaccine R2 / 23 là một chủng MDV serotype 1 giảm độc lực có nguồn gốc từ chủng MDV Md1(vv) được phân lập ở Hoa Kỳ [51]

Chủng vaccine CVI988 được mô tả có nguồn gốc từ một loại virus có khả năng gây bệnh thực địa được phân lập ở Netherland [52]. Cho đến nay, vaccine CVI988 vẫn đang được sử dụng trên toàn thế giới.

Theo báo cáo của các chi cục thú y ở Việt Nam, việc tiêm phòng Marek cho gà được thực hiện khá nghiêm túc, hầu hết các trang trại đều ưu tiên sử dụng vaccine trong công tác phòng bệnh. Tuy nhiên, dù đã được tiêm phòng vaccine đầy đủ nhưng dịch bệnh Marek vẫn xảy ra, do hiệu quả phòng bệnh của vaccine chưa cao. Các chủng virus vaccine chưa hoàn toàn tương đồng với các chủng virus gây bệnh ở thực địa. Từ đó cho thấy yêu cầu cấp bách cần phát triển thêm các chủng giống virus vaccine từ các chủng virus đang lưu hành từ thực địa.

Tại Việt Nam, bệnh Marek vẫn rất phức tạp và gây thiệt hại nặng nề về kinh tế cho các hộ chăn nuôi. Điều đáng chú ý là một số trại đã sử dụng vaccine, tuy nhiên bệnh vẫn nổ ra. Điều này cho thấy các chủng virus vaccine và các chủng virus gây bệnh thực địa có sự tương đồng về kháng nguyên không cao. Từ đó đặt ra yêu cầu cần điều tra, đánh giá nghiêm túc về các chủng virus đang lưu hành tại Việt Nam hiện nay.

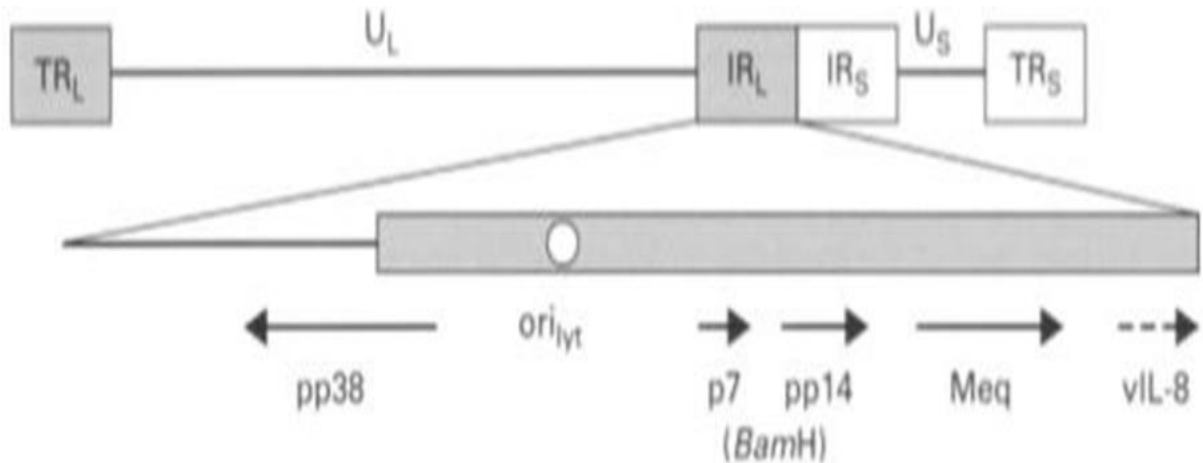
1.2. Gen gây ung thư của MDV

1.2.1. Gen Marek's EcoRI-Q

Gen Marek's EcoRI-Q (*Meq*) có kích thước 1020 bp mã hóa 339 axit amin [53]. Gen này có liên quan đến khả năng gây ung thư và là một trong những gen mục tiêu được đưa vào phân tích về phả hệ nguồn gốc và phát triển vaccine [54]. Các nghiên cứu sinh hóa và di truyền được thực hiện trong những

năm gần đây cho thấy *Meq* là gen gây ung thư chính của MDV. *Meq* linh hoạt liên kết với DNA, RNA và nhiều loại protein. Gen *Meq* có nhiều vị trí hoạt động trong tế bào và biến đổi theo chu kỳ tế bào, cho phép nó tương tác với các phân tử tín hiệu khác nhau của tế bào.

Protein *Meq*, được biểu hiện nhiều trong các dòng tế bào nhiễm MDV và các mẫu khối u, là một oncoprotein của MDV. Cấu trúc của protein *Meq* gồm vùng giàu Proline – glutamine ở tận cùng phía đầu N (Pro / Gln), tiếp đó là 2 vùng có tính bazơ (basic region BR1 và BR2). Tiếp theo là vùng leucine zipper và tận cùng đầu C là vùng hoạt hóa trans. Vùng basic region có hai cụm là BR1 và BR2 mang các gốc axit amin là R và K. BR2 còn được phân chia thành vùng BR2N và BR2C ngăn cách nhau bởi 5 axit amin là NDRAA. Vùng hoạt hóa trans có các vùng lặp lại giàu proline. Motif này gồm 3 đơn vị lặp lại trong vùng PRR. Vùng hoạt hóa trans có nhiều motif liên kết với SH3 [55]. *Meq* có thể hình thành dimer thông qua dây kéo leucine và tương tác với vùng khởi động của các gen mục tiêu thông qua vùng có tính bazơ do đó điều chỉnh sự biểu hiện gen trong tế bào chủ và MDV. Ngoài ra, *Meq* có thể tương tác với p53 thông qua vùng motif, dẫn tới điều hòa quá trình apoptotic và biểu hiện gen [56]. Có thể *Meq* hoạt động cả với tư cách là chất kích hoạt và chất ức chế, tùy thuộc vào việc đoạn lặp lại giàu proline có được biểu hiện hay không. Các chủng MDV với mức độ độc lực khác nhau, mang đột biến cụm hoặc chèn vào các đoạn lặp giàu proline, liên quan đến *Meq* trong cơ chế sinh bệnh của virus. Thực tế, các chủng có độc lực cao hơn, mang ít đoạn lặp lại giàu proline hơn hoặc có đột biến ở phần còn lại của đoạn lặp giàu proline, có khả năng kích hoạt cao hơn và khả năng ức chế thấp hơn [57].



Hình 1.8: Vị trí của gen *Meq* nằm trong bộ gen [57]

Vì vậy, gen *Meq* đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh bệnh của virus MDV. Các nghiên cứu đã chứng minh MDV thiếu gen *Meq* không gây ung thư như đối với serotype 2 và 3, sự xóa bỏ của gen này trong các chủng gây bệnh sẽ làm mất khả năng gây ung thư [58].

1.2.2. Vùng *BamHI-H*.

Vùng *BamHI - H* của MDV là vùng chứa gen cảm ứng sinh ung thư hoạt hóa[58]. Người ta cho rằng mất khả năng gây ung thư liên quan đến sự mở rộng 132-bp có thể là do sự ảnh hưởng trực tiếp trên bản sao của họ gen *BamHI-H*. Khi MDV bị suy giảm độc lực bởi quá trình nuôi cấy tế bào liên tục, số sao chép 132 bp lặp lại ở vùng *BamHI-H* thường tăng lên từ hai đến hơn 20 bản [59]. Do đó, 132-bp của bộ gen GaHV-2 cũng có thể được sử dụng làm gen mục tiêu PCR để phân biệt MDV thực địa và MDV vaccine [54].

1.2.3 Phosphoprotein 38 (*pp38*)

Phosphoprotein đặc hiệu của MDV (*pp38*) ban đầu được xác định là một kháng nguyên trên các tế bào khối u và các dòng tế bào lympho sơ cấp, cho thấy vai trò trong sự phát sinh ung thư. *pp38* được biểu hiện trong các giai đoạn phá vỡ xâm nhập tế bào cũng như trong biểu mô nang lông. Mặc dù *pp38* có thể được phát hiện trong các dòng tế bào lympho và u lympho gây ra bởi MDV, biểu

hiện thường bị giới hạn ở một số ít tế bào. Điều này cho thấy rằng pp38 chủ yếu liên quan đến các giai đoạn xâm nhập hơn là biến đổi tế bào. Hơn nữa, việc loại bỏ pp38 trong bộ gen chủng virus rất độc Md5, dẫn đến kết quả là virus bị hạn chế nghiêm trọng sự sao chép *in vivo* đầu giai đoạn xâm nhập cá thể bị gây nhiễm, nhưng sự nhân lên *in vitro* không bị ảnh hưởng. Cuối cùng, các nghiên cứu đã sử dụng sợi bổ sung với các sản phẩm phiên mã của pp38 đã chỉ ra rằng pp38 có vai trò trong sự tăng sinh của các tế bào lympho sơ cấp [57].

1.2.4. Gen vIL-8 (viral interleukin-8)

Gen vIL - 8 mã hóa hóa cytokine CXC, nằm trong vùng TRL ngay sau gen MEQ. vIL - 8 là một gen ghép và được biểu hiện như một gen tiềm ẩn, mặc dù biểu hiện của nó đôi khi cũng được tìm thấy trong các dòng tế bào T và các khối u. Phân tích chức năng đã chỉ ra rằng vIL - 8 được tiết ra nhằm thu hút các tế bào bạch cầu ngoại vi như tế bào lympho và đại thực bào, và các tế bào khác - ở mức độ thấp hơn. vIL - 8 có chức năng thu nhận các tế bào mục tiêu cho MDV *in vivo*, từ đó gia tăng số tế bào bị nhiễm và làm tăng khả năng phát triển ung thư hạch [57].

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

1.3.1. Tình hình nghiên cứu MDV trên thế giới

Bệnh MD là một bệnh ung thư ở gà có khả năng lây nhiễm cao, được bác sĩ thú y người Hungary mô tả lần đầu tiên vào năm 1907 [60]. Theo thời gian, bệnh đã gia tăng mức độ nghiêm trọng ở gà con do thay đổi điều kiện chăn nuôi quy mô công nghiệp và đặc biệt là do sự tiến hóa của virus [57]. Hàng năm, bệnh Marek gây thiệt hại về kinh tế lên tới hàng tỷ đô la [42]. Các đợt bùng phát MDV được báo cáo ở Hoa Kỳ vào năm 1914. Những đợt bùng phát dịch tiếp theo được báo cáo ở Hà Lan, Anh và nhiều quốc gia khác. Theo Tổ chức Thú Y Thế giới (OIE, 2016), tính từ năm 2005 trở lại đây, có đến 93 nước và vùng lãnh thổ ở các châu lục trên thế giới đã phát hiện có lưu hành bệnh Marek [2].

Ở Ethiopia, bệnh Marek được chẩn đoán lần đầu tiên vào năm 1983 [61]. Năm 2014, kết quả điều tra ở trang trại gà quy mô 8500 con đã được tiêm vaccine cho thấy tỉ lệ gà chết do MDV rất cao, đặc biệt tới 46% ở gà 14 tuần tuổi [62].

Tại Trung Quốc, có ít nhất 191 trại gà phân bố ở 17 tỉnh đã trải qua đợt bùng phát MD từ năm 2011 – 2021. Tỷ lệ tử vong cao nhất được ghi nhận tại trang trại ở tỉnh Shandong vào năm 2013 ở một trang trại gà 3000 con đã được tiêm phòng vaccine FC126 lúc 1 ngày tuổi [22] nhưng bệnh vẫn có tỷ lệ tử vong lên tới 38,3%. Báo cáo tại tỉnh Cát Lâm năm 2017 được ghi nhận là trường hợp dễ lây lan nhất với tỷ lệ mắc bệnh MD là 66,7% mặc dù đã được tiêm phòng bằng vaccine CVI988 [24].

Nghiên cứu năm 2018 tại Meghalaya, Ấn Độ, đã ghi nhận hai đợt bùng phát gây tử vong, một đợt có tỷ lệ tử vong là 5,5% và đợt bùng phát khác với tỷ lệ tử vong là 34% [63]. Trong một cuộc điều tra tại một khu vực ở Andhra Pradesh, Ấn Độ, nơi nghi ngờ MD, tổng cộng 27 mẫu máu gà từ gà sống và 84 mẫu mô từ gà chết đã được phân tích, và tất cả đều cho kết quả dương tính với phát hiện MDV [64].

Thổ Nhĩ Kỳ là một trong những quốc gia bị bùng phát dịch bệnh Marek. Hai nghiên cứu khác đã phân lập MDV ở 206 con gà khác nhau trong 752 mẫu máu và lá lách bị bệnh [65, 66]. Một nghiên cứu được thực hiện trong một trang trại với 10.000 con gà cho thấy tỷ lệ chết từ 1% đến 2%, mặc dù đã được bảo vệ bằng vaccine CVI988, HVT, và FC-126. Do đó, tình hình bệnh Marek có thể được bảo vệ tốt với vaccine ở Thổ Nhĩ Kỳ, nhưng nguy cơ lây truyền và tiến hóa tiềm ẩn vẫn tồn tại.

Mặc dù các chương trình tiêm chủng đã được áp dụng rộng rãi, các đợt dịch do MDV gây ra vẫn được báo cáo ở nhiều quốc gia, lý do là các chủng GaHV-2 từ thực địa vẫn tiếp tục biến đổi, từ đó tăng độc lực và làm giảm hiệu

quả của các loại vaccine. Vì vậy, các nhà khoa học trên thế giới đều nhận định cần phải phát triển các loại vaccine có hiệu quả cao hơn [10].

1.3.2. Tình hình nghiên cứu MDV ở Việt Nam

Ở Việt Nam, bệnh Marek rất phổ biến và gây thiệt hại nặng nề cho kinh tế. Tuy nhiên, các công bố về bệnh và virus mới chỉ dừng lại ở các nghiên cứu về tình hình dịch tễ, triệu chứng lâm sàng và bệnh tích, một số nghiên cứu về đánh giá hiệu quả sử dụng vaccine tại Việt Nam. Những nghiên cứu về sinh học phân tử của MDV vẫn chưa nhiều và rất hiếm. Do bệnh không thể điều trị được bằng kháng sinh nên việc tiêm phòng vaccine và sử dụng các biện pháp an toàn sinh học được đặt lên hàng đầu. Mặc dù vậy, thực tế hiện nay cho thấy bệnh vẫn là mối nguy hiểm lớn trong chăn nuôi gà ở trên thế giới và ở Việt Nam, nhiều trang trại đã sử dụng vaccine nhưng vẫn xảy ra dịch.

Về lịch sử bệnh, bệnh Marek được phát hiện ở Việt Nam lần đầu tiên trên các đàn gà công nghiệp vào năm 1978. Sau đó, bệnh bùng phát mạnh ở nhiều tỉnh miền Bắc, nhiều xí nghiệp gà giống phải tiêu hủy cả đàn. Từ năm 1993, do có biện pháp phòng bệnh hiệu quả, kết hợp với sử dụng vaccine mà bệnh có xu hướng giảm đi rõ rệt. Mặc dù vậy, gà mắc bệnh và chết vẫn chiếm 3% đến 5% làm ảnh hưởng đến chất lượng con giống [67].

Năm 2007 dịch nổ ra nghiêm trọng tại một số tỉnh phía Nam; trong đó làm chết gần 40.000 con gà ở hai tỉnh Tiền Giang và Long An, dù đã được tiêm phòng vaccine. Từ đó cho thấy, sự khác biệt giữa chủng vaccine đang sử dụng và chủng gây bệnh trên thực địa ở các đàn gà nhiễm virus là nguyên nhân quan trọng nhất làm giảm sự bảo vệ của vaccine [68].

Nghiên cứu của Huỳnh Ngọc Giàu (2020) đã ghi nhận tỷ lệ nhiễm virus gây bệnh Mark trên gà ở huyện Chợ Gạo tỉnh Tiền Giang là 38,0% và tỷ lệ nhiễm trên gà cũng có sự khác nhau giữa các xã trong huyện. Theo nghiên cứu của Huỳnh Ngọc Trang và cộng sự năm 2021 với 353 mẫu bệnh phẩm từ 50 đàn

gà thả vườn tại Cần Thơ, nghiên cứu cho thấy tỷ lệ nhiễm MDV là 7,37% trên toàn đàn và sự lây nhiễm giữa các cá thể trong đàn khoảng 33,5% [69].

Cho đến nay trên thế giới đã có 34 hệ gen của MDV serotype 1 (GaHV2) và 3 hệ gen của MDV serotype 3 (MeHV1) được giải mã toàn bộ hệ gen. Bên cạnh đó nhiều gen/hợp phần gen quan trọng như gen *Meq* đã được giải mã và công bố trên Ngân hàng gen. Tuy nhiên trong đó chưa có nhiều dữ liệu về nghiên cứu về gen học của Việt Nam.

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 MDV có trong các mẫu bệnh phẩm gan của gà nghi mắc bệnh Marek tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam gồm: Hà Nội, Bắc Giang, Quảng Ninh, Hải Dương, Bắc Ninh. Mẫu vaccine là mẫu vaccine sống Prevexxion RN do công ty VIPHAVET phân phối.

Địa điểm và thời gian thu mẫu các mẫu bệnh phẩm sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở bảng 2.1.

Bảng 2.1: Danh sách các mẫu sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên mẫu	Nơi lấy mẫu	Thời gian
1	MRBG	Bắc Giang	1/2022
2	MRHD9	Hải Dương	3/2022
3	MRHD10	Hải Dương	3/2022
4	MRBN1	Bắc Ninh	3/2022
5	MRHN1	Hà Nội	5/2022
6	MRDH3	Quảng Ninh	5/2022
7	MRHT2	Hà Nội	5/2022
8	MRVX	VIPHAVET	3/2022

2.1.2. Phạm vi nghiên cứu

- Thu nhận và giải trình tự toàn bộ gen *Meq* của các mẫu virus MDV cường độc tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam và chủng virus vaccine Prevexxion RN.

2.1.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm thu mẫu: một trang trại gà tại 1 số tỉnh miền Bắc Việt Nam, gồm Hà Nội, Bắc Giang, Quảng Ninh, Hải Dương, Bắc Ninh.

- 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 3/2022 đến tháng 11/2022.

2.2. Cơ sở vật chất và trang thiết bị nghiên cứu

2.2.1. Các dụng cụ và thiết bị

Máy móc, dụng cụ và thiết bị dùng trong sinh học phân tử thuộc 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, đĩa petri, cối, chày sứ, kẹp, phan, kéo cắt mẫu, ống falcol, lam kính. ...Ngoài ra còn có các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu bao gồm : Nồi hấp khử trùng (Nhật Bản); Tủ an toàn sinh học (Esco (Đức)); Máy PCR (Astec (Mỹ)); 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, 40°C, 80°C (Sanyo (Nhật Bản)); Bể điện di (Bio - rad (Mỹ)); Lò vi sóng (Samsung (Hàn Quốc))...

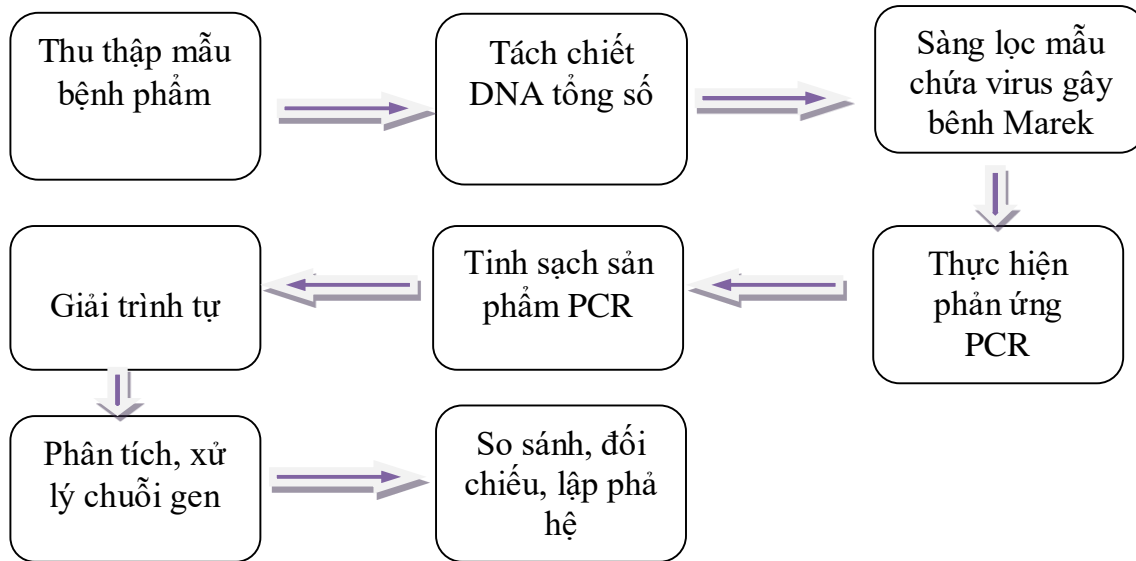
2.2.2. Hóa chất

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).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Sơ đồ nghiên cứu

Để thu nhận toàn bộ vùng gen *Meq* chúng tôi tiến hành các thí nghiệm theo sơ đồ sau đây:



Hình 2.1: Sơ đồ nghiên cứu

2.3.2. Phương pháp thu thập mẫu bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm là gan của gà bị nghi nhiễm Marek từ một số trại gà ở một số tỉnh Miền Bắc và được bảo quản ở nhiệt độ thấp hơn 4°C khi đưa về phòng thí nghiệm. Mẫu bệnh phẩm là gà nghi mắc bệnh Marek thường bao gồm các cơ quan chính của hệ miễn dịch (nơi các tế bào lympho - tế bào mục tiêu của marek, hình thành, phân hóa và thường xuyên tập trung tại đó) như: gan, thận, lách, ... Mẫu được dùng để tách thường được lấy từ các vị trí bệnh tích trên cơ quan nội tạng hoặc toàn bộ u cục hình thành trong nội tạng (thường là gan). Phần mẫu bệnh phẩm còn lại được bảo quản ở - 80°C.

2.3.3. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Để thu nhận DNA tinh sạch, cần loại bỏ những thành phần tạp nhiễm, quan trọng nhất là protein. DNA tổng số được tách chiết bằng bộ kit GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific™, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Quy trình tách chiết DNA tổng số được trình bày như sau:

Bước 1: Nghiền nhỏ mẫu bằng cối và chày sứ trong nito lỏng. Sau đó lấy lượng mẫu nhỏ bằng hạt đậu xanh đem tách DNA tổng số.

Bước 2 : Bổ sung 180 μ L dung dịch Digestion Solution vào ống eppendorf chứa sẵn mẫu. Bổ sung 20 μ L Proteinase K (20mg/ml) sau đó vortex và ủ 56⁰C. Sau 30 phút vortex một lần cho tới khi tan hết.

Bước 3 : Bổ sung 20 μ L RNase A (10mg/ml), vortex trong 15 giây sau đó ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút

Bước 4 : Bổ sung 200 μ L dung dịch Lysis Solution sau đó vortex trong 30 giây

Bước 5 : Bổ sung 450 μ L EtOH 50%, đảo nhẹ nhàng

Bước 6 : Chuyển toàn bộ hỗn dịch cột có màng lọc, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch ly tâm phía dưới cột lọc

Bước 7 : Bổ sung 500 μ l dung dịch Wash Buffer I (đã bổ sung cồn), ly tâm 10.000 vòng/phút trong 1 phút rồi bỏ dịch ly tâm phía dưới cột lọc

Bước 8 : Bổ sung 500 μ l dung dịch Wash buffer II, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút và bỏ dịch bỏ dịch ly tâm phía dưới cột lọc

Bước 9 : Làm khô cột bằng cách ly tâm 12.000 vòng/phút trong 2 phút

Bước 10 : Bổ sung 30 μ l dịch Elution Buffer vào giữa màng lọc của cột, để cột ở nhiệt độ phòng 2 phút, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 2 phút để thu DNA.

Bước 11 : Ghi ký hiệu và bảo quản DNA tổng số ở -80⁰C.

2.3.4. Phương pháp thiết kế môi

Cặp môi thu nhận gen *Meq* được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide của các chủng MDV đăng kí trên Ngân hàng gen (qua địa chỉ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Môi được thiết kế nằm bên ngoài gen *Meq* nhằm thu được trọn vẹn vùng gen này. Để thiết kế được cặp môi đặc hiệu, trước tiên các chuỗi trình tự nucleotide sẽ được phân tích và so sánh bằng chương trình GENEDOC, từ đó tìm kiếm những vị trí trình tự gen bảo thủ, tương đồng giữa tất cả các chủng virus. Các trình tự môi sẽ được đánh giá để đồng thời đảm bảo các điều kiện tối ưu cho phản ứng PCR như: Trình tự môi tỷ lệ tương đồng cao với các trình tự gen của các chủng virus đã nghiên cứu,

có vị trí bám mỗi đảm bảo để lấy được toàn bộ gen đích và kích thước PCR không quá lớn; trình tự mỗi có chiều dài từ 18 - 22 nucleotide và có tỉ lệ G+C từ 50 - 55%, nhiệt độ nóng chảy của mỗi xuôi và mỗi ngược không chênh lệch nhiều, mỗi thường bắt đầu bằng A/T ở đầu 5' và kết thúc bằng G/C ở đầu 3'. Mỗi phải đặc hiệu cho loài và đoạn gen mục tiêu. Các mỗi không tạo thành dạng kẹp tóc và không xảy ra hiện tượng tự bắt cặp. Từ kết quả sau khi so sánh, phân tích trình tự gen trên GENEDOC, chúng tôi thu được cặp mỗi đặc hiệu thu nhận đoạn DNA có kích thước khoảng 1,6 kb chứa đoạn gen *Meq* mục tiêu như sau:

Bảng 2.2. Trình tự các mỗi sử dụng trong nghiên cứu

Tên mỗi	Trình tự (5'-3')	Độ dài đoạn gen	Chú thích
Marek-F	YGACGGCCTATCTGAGGAGG	0.7kb	Chẩn đoán và xác định MDV1
Marek-R	GGATCCTCGGTAAGACGAGC		
GaHV2-MeqF	AATTGTGACCGTTCGCGAACG	1.6kb	Giải trình tự vùng gen <i>Meq</i>
GaHV2-MeqR	TTCCGAGTCTAAGCTACACGG		

Để kiểm tra tính đặc hiệu của mỗi, trình tự mỗi sẽ được đưa vào chương trình BLAST của NCBI. Kết quả BLAST thể hiện đúng loài virus đồng thời đúng vị trí mỗi đã thiết kế chứng tỏ trình tự mỗi đã thiết kế có độ đặc hiệu cao. Dưới đây là hình ảnh BLAST trình tự mỗi GaHV2-MeqF (Hình 2.2). Kết quả cho thấy mỗi tương đồng 100% các chủng virus Gallid anphahersvirus-2.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Gallid alphaherpesvirus 2 strain HNL C503_complete genome	42.1	84.2	100%	0.11	100.00%	MG518371.1
<input type="checkbox"/>	Gallid alphaherpesvirus 2_complete genome	42.1	84.2	100%	0.11	100.00%	MG432697.1
<input type="checkbox"/>	Gallid alphaherpesvirus 2 strain Polen5_partial genome	42.1	84.2	100%	0.11	100.00%	MF431496.1
<input type="checkbox"/>	Gallid alphaherpesvirus 2 strain MD70/13_complete genome	42.1	84.2	100%	0.11	100.00%	MF431495.1
<input type="checkbox"/>	Gallid alphaherpesvirus 2 strain EU-1_partial genome	42.1	84.2	100%	0.11	100.00%	MF431494.1
<input type="checkbox"/>	Gallid alphaherpesvirus 2 strain ATE2539_partial genome	42.1	84.2	100%	0.11	100.00%	MF431493.1
<input type="checkbox"/>	TPA: Gallid alphaherpesvirus 2 strain RB-1B ERL lncRNA_complete sequence	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	BK009383.1
<input type="checkbox"/>	Synthetic construct Gallid herpesvirus 2 clone pC12/130-15_complete sequence	42.1	84.2	100%	0.11	100.00%	FJ436097.1
<input type="checkbox"/>	Synthetic construct Gallid herpesvirus 2 clone pC12/130-10_complete sequence	42.1	84.2	100%	0.11	100.00%	FJ436096.1
<input type="checkbox"/>	Gallid alphaherpesvirus 2 isolate HS/1412_complete genome	42.1	84.2	100%	0.11	100.00%	KU744561.1
<input type="checkbox"/>	Gallid alphaherpesvirus 2 isolate CC/1409_complete genome	42.1	84.2	100%	0.11	100.00%	KU744560.1
<input type="checkbox"/>	Gallid alphaherpesvirus 2 isolate JL/1404_complete genome	42.1	84.2	100%	0.11	100.00%	KU744559.1
<input type="checkbox"/>	Gallid alphaherpesvirus 2 isolate WC/1203_complete genome	42.1	84.2	100%	0.11	100.00%	KU744558.1
<input type="checkbox"/>	Gallid alphaherpesvirus 2 isolate LTS_complete genome	42.1	84.2	100%	0.11	100.00%	KU744557.1
<input type="checkbox"/>	Gallid alphaherpesvirus 2 isolate ICC_complete genome	42.1	84.2	100%	0.11	100.00%	KU744556.1
<input type="checkbox"/>	Gallid alphaherpesvirus 2 isolate J-1_complete genome	42.1	84.2	100%	0.11	100.00%	KU744555.1
<input type="checkbox"/>	Gallid herpesvirus 2 strain BC-1 14kD transcript variant kd5 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	KU196821.1
<input type="checkbox"/>	Gallid herpesvirus 2 strain BC-1 ERL lncRNA as5 variant (ERL)_complete sequen	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	KT948984.1
<input type="checkbox"/>	Gallid herpesvirus 2 strain BC-1 ERL lncRNA as4 variant (ERL)_complete sequen	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	KT948983.1

Hình 2.2: Kết quả BLAST trình tự môi GaHV2 - MeqF trên NCBI

2.3.5. Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)

DNA thu được sẽ được dùng làm khuôn để khuếch đại gen đích bằng phương pháp PCR với máy PCR (PTC-100). Trong nghiên cứu này chúng tôi dùng bộ kit DreamTaq PCR Master mix (2X) do hãng Thermo Scientific (Mỹ) cung cấp và các cặp môi thu nhận gen *Meq* với thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng PCR được trình bày trong bảng 2.3.

Bảng 2.3: Thành phần và chu trình nhiệt phản ứng PCR thu nhận gen *Meq*

Thành phần	Thể tích	Nhiệt độ	Số chu kỳ
Dream Taq master mix 2X	25 μ L	94°C - 5 phút	1
Môi xuôi (10 mM)	2 μ L	94°C - 1 phút	35
Môi ngược (10mM)	2 μ L	52°C - 1phút	
DMSO	2 μ L	72°C - 2 phút	
Khuôn DNA (~50g/ μ L)	4 μ L	72°C - 10 phút	1
Nước	15 μ L	Bảo quản ở 4°C - không quá 24h hoặc ở - 20°C.	
Tổng thể tích	50 μL		

Sản phẩm PCR được bảo quản ở -20°C . Kết quả phản ứng PCR được đánh giá bằng điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1%. Sản phẩm chất lượng tốt sẽ được tinh sạch và dùng để giải trình tự trực tiếp.

2.3.6. Phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR

Mục đích của quá trình nhằm loại bỏ các tạp chất có trong sản phẩm PCR ngoài DNA mục tiêu như đệm, enzyme, mồi thừa... Sản phẩm PCR sau tinh sạch sẽ giải trình tự trực tiếp bằng phương pháp Sanger truyền thống.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit GeneJET PCR Purification và bộ kit GeneJET Gel PCR Purification của hãng Thermo (Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các bước tinh sạch sản phẩm PCR được trình bày dưới đây :
(Thực hiện sau khi điện di sản phẩm PCR trên thạch agarose 1% và cắt phần gel chứa sản phẩm DNA cần thu nhận)

- Bước 1** Thêm dung dịch Binding Buffer vào ống có chứa sản phẩm PCR với tỉ lệ 1 : 1 (w/v). Đun nóng ở 65°C cho đến khi gel tan hết.
Chuyển toàn bộ dung dịch thu được từ bước 1 vào cột tinh sạch
- Bước 2** GeneJET. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 30-60 giây. Loại bỏ phần dịch phía dưới ống hứng.
- Bước 3** Bổ sung 700 μL dung dịch rửa Wash Buffer, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút. Loại bỏ dịch phía dưới ống hứng.
- Bước 4** Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút để loại bỏ hoàn toàn dung dịch rửa.
Chuyển cột sang ống eppendorf 1,5ml sạch.
- Bước 5** Bổ sung 30 μL dung dịch Eluted Buffer, để nhiệt độ phòng 2 phút, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 1 phút.
- Bước 6** Thu DNA, bảo quản ở -20°C

Các bước tinh sạch sản phẩm PCR bằng bộ kit GeneJET PCR Purification

- Bước 1** Thêm dung dịch Binding Buffer vào ống có chứa sản phẩm PCR với tỉ lệ 1 : 1 (v/v).
Chuyển toàn bộ dung dịch thu được từ bước 1 vào cột tinh sạch
- Bước 2** GeneJET. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 30-60 giây. Loại bỏ phần dịch phía dưới ống hứng.
- Bước 3** Bổ sung 700 μ L dung dịch rửa Wash Buffer, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút. Loại bỏ dịch phía dưới ống hứng.
- Bước 4** Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút để loại bỏ hoàn toàn dung dịch rửa.
Chuyển cột sang ống eppendorf 1,5mL sạch.
- Bước 5** Bổ sung 30 μ L dung dịch Eluted Buffer, để nhiệt độ phòng 2 phút, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 1 phút.
- Bước 6** Thu DNA, bảo quản ở -20°C

2.3.7. Phương pháp giải trình tự Sanger

Nguyên tắc của phương pháp dideoxy là dựa vào sự tổng hợp mạch bổ sung cho trình tự cần xác định nhờ hoạt động của enzyme DNA - polymerase. Với việc sử dụng thêm các dideoxynucleotide (ddNTP) với các deoxynucleotide (dNTP) thông thường, kết quả tổng hợp cũng là sự hình thành một tập hợp nhiều đoạn DNA có kích thước khác nhau.

Chuỗi DNA cuối cùng thu nhận được xác định theo chiều $5' \rightarrow 3'$. Trình tự DNA thu nhận được từ máy giải trình tự, được cung cấp ở hai dạng: chuỗi nucleotide thô ở dạng chữ (.txt) và chuỗi nucleotid ở dạng giản đồ chromatogram (.ab1). Chuỗi ở dạng .ab1 cho phép nhận biết chuỗi giải trình tự có đạt yêu cầu không, còn chuỗi nucleotide ở dạng .txt cho phép đưa vào các chương trình chuyên biệt (ví dụ: Chromas, BioEdit, SeqEd) để phân tích, biên tập với mục đích xác định chính xác từng nucleotide để có chuỗi cuối cùng (chuỗi tinh hay

chuỗi đã biên tập). Cuối cùng, chuỗi đã được biên tập (edition) được sử dụng ở dạng .txt, vì ở dạng này, tất cả các chương trình phân tích gen (ví dụ: MEGA, GeneDoc, MacVector) đều có thể nhận biết.

2.3.8. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Sau khi có chuỗi cuối cùng cần xác định độ chính xác chuỗi nucleotide thu được. Việc giám định chuỗi được thực hiện bằng cách truy cập vào Ngân hàng gen sử dụng chương trình BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**** Chương trình so sánh và phân tích chuỗi gen - GeneDoc***

GeneDoc là một chương trình nối (interface application) được lập trình cho máy tính PC sử dụng hệ Window, dùng để mở file, đọc và phân tích file ở dạng .msf (multiple sequence file) [70]. GeneDoc cho phép xác định trình tự amino acid của gen nhân và gen ty thể, đưa ra cấu hình của các chuỗi đã được so sánh để chuyển nạp vào MEGA cho phân tích phả hệ. Trình tự nucleotide (nt) và amino acid (aa) của các chủng GaHV2 và các chủng tham chiếu được phân tích, so sánh bằng phần mềm Gendoc 2.7.

**** Chương trình phân tích di truyền tiến hóa phân tử (MEGA)***

MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) là một hệ chương trình nối giao diện (interface application) được lập trình giúp các nhà nghiên cứu dễ phân tích di truyền học phân tử với mục đích so sánh đối chiếu các chuỗi gen đồng chức năng từ các chủng cùng loài, từ các chủng khác loài trong cùng giống/chi thuộc cùng một họ từ đó suy ra mối quan hệ nguồn gốc và phả hệ ở góc độ tiến hóa phân tử [71]. Trong nghiên cứu sử dụng chương trình MEGA 7 với tham số Kimura-2 parameter mô phỏng sự thay đổi nt và Bootstrap là 1000 lần.

CHƯƠNG 3

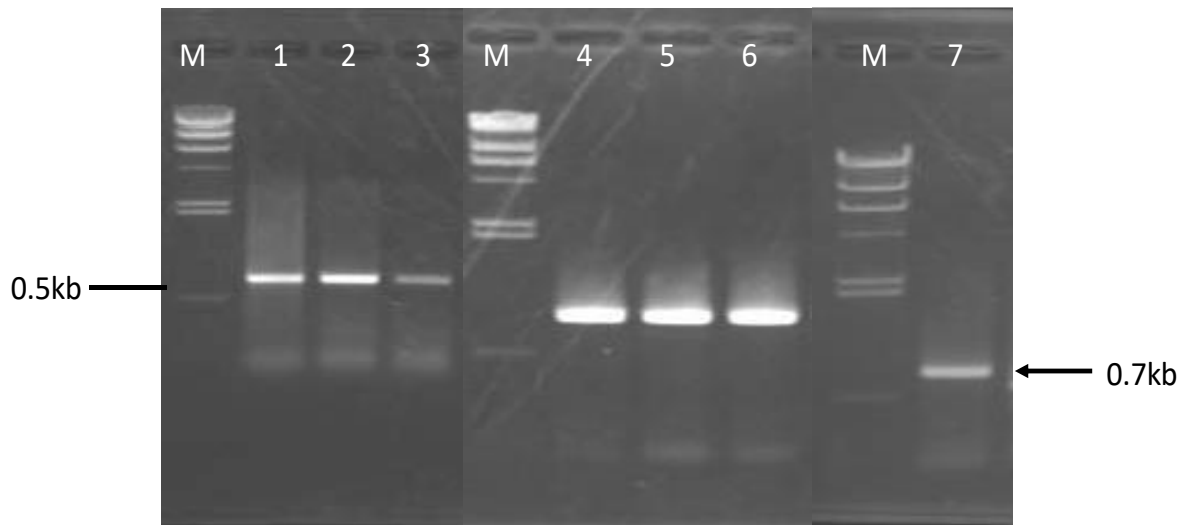
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thu nhận và giải trình tự gen *Meq* từ mẫu bệnh phẩm

3.1.1. Sàng lọc mẫu có chứa virus Marek

Bảy mẫu bệnh phẩm thu nhận ở các địa danh khác nhau của miền Bắc, Việt Nam (bao gồm Hà Nội, Bắc Giang, Quảng Ninh, Hải Dương, Bắc Ninh), được tiến hành tách chiết để thu nhận DNA tổng số. DNA tổng số này được sử dụng làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR chẩn đoán virus Marek serotype 1 bằng cặp mồi Marek-F – Marek-R (Bảng 2.2). Các mẫu dương tính với cặp mồi chẩn đoán sẽ được tiến hành PCR để thu nhận gen *Meq*.

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR thu được cho thấy: cả 7 mẫu bệnh phẩm thu nhận đều dương tính với cặp mồi Marek-F – Marek-R. Sản phẩm PCR thu nhận có kích thước khoảng 0,7 kb đúng như tính toán ban đầu; băng DNA có chất lượng tốt, sáng và đơn băng (Hình 3.1).



Hình 3.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR bằng cặp mồi Marek-F – Marek-R

Chú thích: M: Thang chuẩn λ HindIII được cắt bằng enzyme giới hạn. 1.MRBG (thu nhận tại Bắc Giang), 2.MRHD9 (thu nhận tại Hải Dương), 3.MRHD10 (thu nhận tại Hải Dương), 4.MRBN1 (thu nhận tại Bắc Ninh), 5.MRHN1 (thu nhận tại Hà Nội), 6. MRDH3 (thu nhận tại Quảng Ninh), 7.MRHT2 (thu nhận tại Hà Nội).

Kết quả PCR ban đầu khẳng định: thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng PCR hoàn toàn phù hợp, cả 7 mẫu virus thu được đều là virus MDV serotype 1.

Sản phẩm PCR của 7 mẫu nghiên cứu được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp bằng phương pháp Sanger trên máy giải trình tự ABI3500 Applied Biosystems® (Mỹ).

Trình tự nucleotide thu được của các mẫu nghiên cứu được BLAST lên website của NCBI. Kết quả cho thấy trình tự nucleotide thu được thuộc gen *Meq* của các chủng virus MDV thuộc serotype 1 (GaHV2) do có tỷ lệ tương đồng cao (trên 99%) so với các trình tự gen *Meq* của GaHV2 đã được đăng ký trên Ngân hàng gen (Hình 3.2)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid alphaherpesvirus 2 strain HNGS101	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	4346	100%	0.0	99.90%	175888	MG432697.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid alphaherpesvirus 2 isolate CC/1409	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	4346	100%	0.0	99.90%	175561	KU744560.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid alphaherpesvirus 2 isolate JL/1404	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	4346	100%	0.0	99.90%	176083	KU744559.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid alphaherpesvirus 2 isolate WC/1203	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	4346	100%	0.0	99.90%	176057	KU744558.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid alphaherpesvirus 2 isolate LTS	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	4346	100%	0.0	99.90%	176023	KU744557.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 isolate GX0101 complete genome	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	4346	100%	0.0	99.90%	178101	JX844666.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 isolate LMS complete genome	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	4346	100%	0.0	99.90%	177526	JQ314003.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 Meq gene for Meq oncoprotein isolate HNGS206	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	2173	100%	0.0	99.90%	1020	HF546086.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid alphaherpesvirus 2 isolate 2014055.MEQ gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1873	2167	100%	0.0	99.80%	1020	KU382456.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 isolate GX36.MEQ gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1873	2167	100%	0.0	99.80%	1020	KT229640.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 isolate OD/1311.MEQ gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1873	2167	100%	0.0	99.80%	1020	KP888856.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 isolate FY/1303.MEQ gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1873	2167	100%	0.0	99.80%	1020	KP888847.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 isolate DQ/1310.MEQ gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1873	2167	100%	0.0	99.80%	1020	KP888846.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 isolate CF/1312.MEQ gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1873	2167	100%	0.0	99.80%	1020	KP888844.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 isolate LTS.MEQ gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1873	2167	100%	0.0	99.80%	1020	KP888838.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 isolate HT/1207.MEQ gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1873	2167	100%	0.0	99.80%	1020	KP888837.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 isolate HT/1211.MEQ gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1873	2167	100%	0.0	99.80%	1020	KP888832.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 isolate LLY.MEQ gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	2173	100%	0.0	99.90%	1020	KP888822.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 isolate CY/1111.MEQ gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	2026	100%	0.0	99.90%	1020	KP888816.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 isolate LCC.MEQ gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	2173	100%	0.0	99.90%	1020	KP888815.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 strain QD2014.MEQ protein (MEQ) gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	2173	100%	0.0	99.90%	1247	KP144354.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 Meq gene for Meq oncoprotein isolate HNXZ106	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	2173	100%	0.0	99.90%	1020	HF546099.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 Meq gene for Meq oncoprotein isolate HNL107	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	2173	100%	0.0	99.90%	1020	HF546091.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 Meq gene for Meq oncoprotein isolate HNGS101	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	2173	100%	0.0	99.90%	1020	HF546084.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid alphaherpesvirus 2 strain GX20NN2 meq protein (meq) gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	2173	100%	0.0	99.90%	1020	MT799511.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 strain GXYL1 meq protein gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	2173	100%	0.0	99.90%	1020	HQ290415.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid alphaherpesvirus 2 isolate GX17NNM3 Meq oncoprotein (Meq) gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	2173	100%	0.0	99.90%	1020	MN943267.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid alphaherpesvirus 2 clone RB1B-N meq	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	4346	100%	0.0	99.90%	177995	MT797631.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 isolate LCC(JL/08/1) Meq (Meq) gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	2173	100%	0.0	99.90%	1020	HQ658610.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 strain MS67 Meq gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	2173	100%	0.0	99.90%	1020	HQ638146.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 strain MS57 Meq gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	2173	100%	0.0	99.90%	1020	HQ638145.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gallid herpesvirus 2 strain MS01 Meq gene complete cds	Gallid alphaherpesvirus 2	1879	2173	100%	0.0	99.90%	1020	HQ638143.1

Hình 3.2. Kết quả truy cập Ngân hàng gen của các chủng nghiên cứu

Kết quả trong hình 3.2 cho thấy, trình tự nucleotide của các chủng MDV nghiên cứu có tỉ lệ tương đồng rất cao (từ 99,8% đến 99,9%) với trình tự gen *Meq* của các chủng MDV thuộc GaHV-2 trên Ngân hàng gen. Điều này chứng tỏ trình tự nucleotide của các chủng nghiên cứu được chúng tôi thu nhận, chính xác là gen *Meq* của virus gây bệnh Marek thuộc serotype 1.

Từ đây chúng tôi tiến hành thiết kế mồi để thực hiện các phản ứng PCR thu nhận toàn bộ gen kháng nguyên *Meq*.

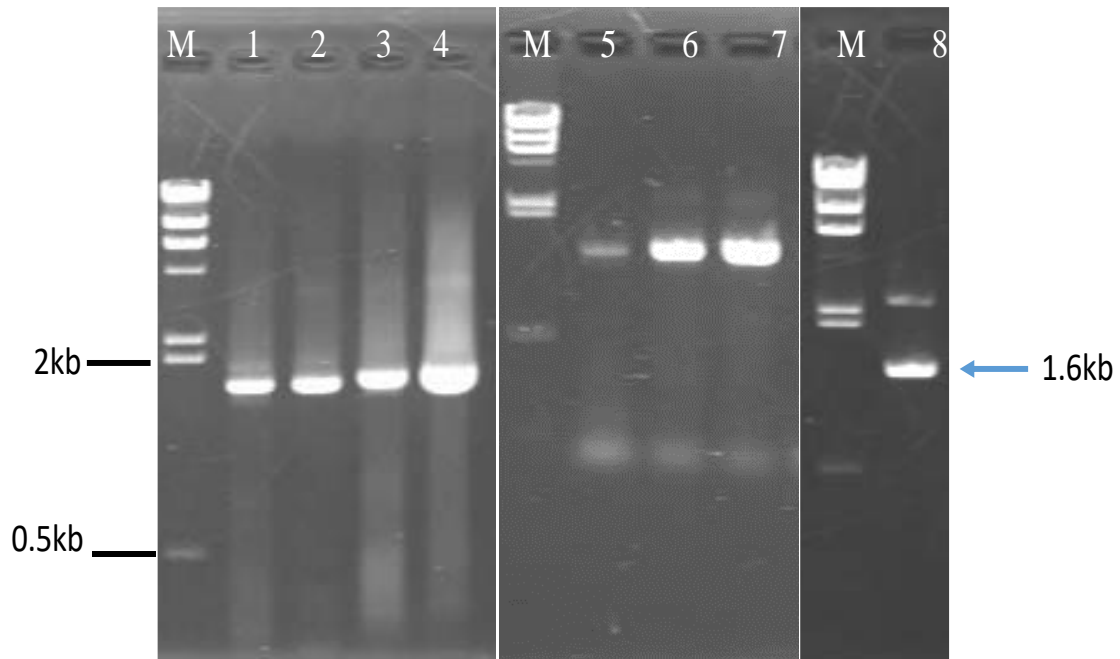
3.1.2. Kết quả thu nhận trình tự nucleotide toàn bộ gen *Meq*

Sau khi thực hiện tối ưu điều kiện cho phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen mã hóa kháng nguyên *Meq*, chúng tôi tiến hành PCR khuếch đại đoạn gen này ở bảy mẫu dương tính với cặp mồi chẩn đoán và một mẫu vaccine đang được sử dụng tại Việt Nam.

Để thu nhận toàn bộ gen *Meq*, chúng tôi tiến hành thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi GaHV2-MeqF – GaHV2-MeqR (Bảng 2.2). Thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng đã được tối ưu (Bảng 2.3).

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên thạch agarose 1%. Kết quả được trình bày ở hình 3.3. Mồi GaHV2-MeqF thuộc gen pp14 nằm trước gen *Meq*, GaHV2-MeqR thuộc gen viL-8 nằm sau gen *Meq*. Sản phẩm PCR thu được có kích thước khoảng 1,6 kb chứa toàn bộ gen *Meq*. Các sản phẩm PCR tốt sẽ được tinh sạch bằng bộ kit GeneJET PCR Gel purification hoặc kit GeneJET PCR purification của hãng Thermo.

Trong số 7 mẫu kiểm tra có 5 mẫu cho sản phẩm PCR có chất lượng tốt; 1 mẫu (mẫu số 5 -MRBN1) cho sản phẩm PCR có hàm lượng DNA thấp nên cần thực hiện lại phản ứng PCR để tăng hàm lượng; 1 mẫu (mẫu MRHT2) có thêm DNA băng phụ do đó phải cất thu băng DNA đích bằng bộ sinh phẩm GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo) (Hình 3.3).



Hình 3.3: Sản phẩm PCR được khuếch đại bằng cặp mồi GaHV2-MeqF/GaHV2-MeqR. Phân tích sản phẩm trên gel aragose 1%.

Chú thích: M: Thang chuẩn λ HindIII. Giếng 1: MRVX (chủng vaccine đang được sử dụng tại Việt Nam (Nobilis Rimavac)). Giếng từ 2-8 là sản phẩm PCR của 7 chủng nghiên cứu: (2. MRBG, 3. MRHD9, 4. MRHD10, 5. MRBN1, 6. MRHN1, 7. MRDH3, 8. MRHT2).

Sản phẩm PCR của 8 mẫu nghiên cứu sau khi tinh sạch được gửi đi giải trình tự trực tiếp tại The First Base (Singapore) bằng phương pháp Sanger bằng mồi xuôi và mồi ngược của phản ứng PCR.

Kết quả đã thu nhận được toàn bộ gen *Meq* của 8 mẫu nghiên cứu, trong đó 7 mẫu thu nhận thực địa có kích thước 1020 nucleotide mã hóa 339 amino acid và 01 mẫu vaccine có kích thước 1197 nucleotide mã hóa 398 amino acid.

Trình tự nucleotide của 8 chủng mà chúng tôi thu nhận được đưa vào so sánh bằng phần mềm Genedoc 2.7. Kết quả cho thấy, các chủng virus cường độc tương đối giống nhau. Kết quả so sánh các chủng cường độc với chủng vaccine cho thấy, gen *Meq* của chủng cường độc ngắn hơn gen *Meq* của chủng vaccine do chủng vaccine (MRVX) có chèn thêm 177 nucleotide vào vị trí từ 574 đến

750 của gen *Meq* serotype 1 cường độc thông thường. Các sai khác còn lại chủ yếu là các đột biến điểm (Hình 3.4).

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	
MDVVX	:	ATGTCTCAGGAGCCAGAGCCGGCGCTATGCCCTACAGTCCCGCTGACGATCCGTC	CCCCCTCGATCTTCTCTCGGGTCGACTTCGAGACGGAAAAAAA	:	100						
MRBG	:	:	100						
MRHD9	:	:	100						
MRHD10	:	:	100						
MRBN1	:	:	100						
MRHN1	:	:	100						
MRHT2	:	:	100						
MRDH3	:G.....	:	100						
	*	120	*	140	*	160	*	180	*	200	
MDVVX	:	GGAAAAGTCACGACATCCCCAACAGCCCTCCAACACCCCTTCCCTGACGGCCTATCTGAGGAGGAGAAAACAGAAGCTGGAAGGAGGAGAAAAGGAA	:	200							
MRBG	:	:	200						
MRHD9	:	:	200						
MRHD10	:	:	200						
MRBN1	:G.....	:	200						
MRHN1	:	:	200						
MRHT2	:T.....	:	200						
MRDH3	:T.....	:	200						
	*	220	*	240	*	260	*	280	*	300	
MDVVX	:	TCGTGACGCCCTCTCGGAGAAGACGCAGGGAGCAGACGGACTATGTAGACAAACTCCATGAAGCATGTGAAGAGCTGCAGAGGGCCAATGAACACCTACGT	:	300							
MRBG	:G.....T.....	:	300						
MRHD9	:G.....T.....T.....	:	300						
MRHD10	:G.....T.....	:	300						
MRBN1	:G.....T.....	:	300						
MRHN1	:G.....G.T.....	:	300						
MRHT2	:G.....G.T.....	:	300						
MRDH3	:G.....T.....	:	300						
	*	320	*	340	*	360	*	380	*	400	
MDVVX	:	AAGGAAATTCGAGATCTAAGGACTGAGTGCACGTCCTCGGTGTACAGTTGGCTTGTTCATGAGCCAGTTTGCCTATGGCGGTACCCCTAACGGTGACCC	:	400							
MRBG	:C.....	:	400						
MRHD9	:C.....	:	400						
MRHD10	:C.....	:	400						
MRBN1	:C.....	:	400						
MRHN1	:C.....	:	400						
MRHT2	:C.....	:	400						
MRDH3	:C.....	:	400						
	*	420	*	440	*	460	*	480	*	500	
MDVVX	:	TTGGACTGCTTACCACCCCGCACGATCCCGTTCCTGAACCTCCCATTTGCACTCCTCCACCTCCCTCACCGGATGAACCTAACGCTCCACATTGCTCCGG	:	500							
MRBG	:G.....	:	500						
MRHD9	:G.....	:	500						
MRHD10	:G.....	:	500						
MRBN1	:G.....	:	500						
MRHN1	:G.....	:	500						
MRHT2	:G.....	:	500						
MRDH3	:G.....	:	500						
	*	520	*	540	*	560	*	580	*	600	
MDVVX	:	TTCCCAACCTCCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATACGGAGGAACTTGCGCCAGCTCTGCTCGACCCCACTCCCATCTCTACTCCCATATT	:	597							
MRBG	:G.....	-----	:	573					
MRHD9	:G.....	-----	:	573					
MRHD10	:G.....	-----	:	573					
MRBN1	:G.....	-----	:	573					
MRHN1	:G.....	-----	:	573					
MRHT2	:G.....	-----	:	573					
MRDH3	:G.....	-----	:	573					
MDVVX	:	ATCTACGCTCCGGGGCCTTCCCCCTCCAACCTCCTATCTGTACCCCCCTCCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTCGCGCCAGCTCTGCTCGACCCACCAC	:	697							
MRBG	:	-----	-----	-----	:	-					
MRHD9	:	-----	-----	-----	:	-					
MRHD10	:	-----	-----	-----	:	-					
MRBN1	:	-----	-----	-----	:	-					
MRHN1	:	-----	-----	-----	:	-					
MRHT2	:	-----	-----	-----	:	-					
MRDH3	:	-----	-----	-----	:	-					

```

*      720      *      740      *      760      *      780      *      800
MDVVX : CTCCCATCTCTACTCCCCATATTTTCTACGCTCCGGGGCTCTGCTCGACCCACCACCTCCCATCTCTACTCCCCATATTATCTACGGTCCGGGGCCTTC : 797
MRBG  : ----- : 620
MRHD9 : ----- : 620
MRHD10 : ----- : 620
MRBN1 : ----- : 620
MRHN1 : ----- : 620
MRHT2 : ----- : 620
MRDH3 : ----- : 620

*      820      *      840      *      860      *      880      *      900
MDVVX : CCCCCTCCAACCTCCTATCTGTACCCCCCTCCCTCCCGATGCGGAGGAGCTTTGCGCCAGCTCTGCTCGACCCACCACCTCCCATCTGTACTCCCCAT : 897
MRBG  : .....G..... : 720
MRHD9 : .....G..... : 720
MRHD10 : .....G..... : 720
MRBN1 : .....G..... : 720
MRHN1 : .....G..... : 720
MRHT2 : .....G..... : 720
MRDH3 : .....G..... : 720

*      920      *      940      *      960      *      980      *      1000
MDVVX : TCCCTCTTCTGCCCTCCCAGCTCCATCTCCGGAGGGCATCTTCCCTGCATTGTCTCCTGTTACCGAGCCGTGTACCCCTCCATCGCCGGGGACGGTT : 996
MRBG  : ..... : 819
MRHD9 : ..... : 819
MRHD10 : ..... : 819
MRBN1 : ..... : 819
MRHN1 : ..... : 819
MRHT2 : ..... : 819
MRDH3 : ..... : 819

*      1020     *      1040     *      1060     *      1080     *      1100
MDVVX : TACGCTCAGCTTTGTCTGTGGCCAGGCTCCCTTTTACCCCATCTCCCCACATCCGGCTCCGGAGCCGGAGAGGCTTTATGCTCGTCTTACCGAGG : 1096
MRBG  : .....A..... : 919
MRHD9 : ..... : 919
MRHD10 : ..... : 919
MRBN1 : ..... : 919
MRHN1 : ..... : 919
MRHT2 : ..... : 919
MRDH3 : ..... : 919

*      1120     *      1140     *      1160     *      1180     *      1200
MDVVX : ATCCCGAACAGGATTCCTTGTATTCCGGCCAGATTTATATTCAGTTTCCCTCCGATACTCAGTCTACGGTCTGGTGGTTTCCAGGTGACGGGAGACCCCTG : 1196
MRBG  : ..... : 1019
MRHD9 : ..... : 1019
MRHD10 : ..... : 1019
MRBN1 : .....C..... : 1019
MRHN1 : ..... : 1019
MRHT2 : ..... : 1019
MRDH3 : ..... : 1019

MDVVX : A : 1197
MRBG  : . : 1020
MRHD9 : . : 1020
MRHD10 : . : 1020
MRBN1 : . : 1020
MRHN1 : . : 1020
MRHT2 : . : 1020
MRDH3 : . : 1020

```

Hình 3.4: Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen *Meq* của 8 chủng GaHV-2 nghiên cứu.

Ghi chú: Dấu (.) biểu thị nucleotide của chủng cường độ giống với nucleotide của chủng MRVX; sai khác của 7 chủng so với chủng MRVX biểu thị bằng chính ký hiệu nucleotide/chữ cái (1 chữ cái) của chúng.

Kết quả cho thấy đã thu nhận được toàn bộ trình tự gen đích cần nghiên cứu của các chủng MDV. Quá trình thiết kế mồi, thực hiện phản ứng PCR và giải trình tự DNA của đoạn gen đích nghiên cứu đã được thực hiện thành công.

Kết quả so sánh hình 3.4 cho thấy giữa 7 chủng GaHV-2 lưu hành tại Việt Nam trong nghiên cứu này tuy có mức độ tương đồng khá cao về nucleotide nhưng vẫn tồn tại một số sai khác tại các vị trí 47(A>G), 132 (C>T), 141(C>T), 167(A>G), 236 (C>G), 250 (A>T), 270 (A>G), 884(C>A), 982 (T>C).

So sánh với chủng virus vaccine, các chủng virus đang lưu hành có sự thay đổi nucleotide ở các vị trí 211(T>G), 238(G>T), 344(T>C), 415(A>G), 527(C>G) và 649 (C>G); đồng thời có đột biến mất đoạn nucleotide (gồm 177 nucleotide, từ vị trí 573 đến vị trí 750). Đây là sai khác rất lớn giữa các virus chủng cường độc và chủng virus vaccine.

3.2. Kết quả phân tích đặc điểm phân tử gen *Meq*

3.2.1. Một số đặc điểm phân tử gen *Meq*

Bệnh Marek đã gây ra tổn thất to lớn trong chăn nuôi gà trên toàn thế giới và sự gia tăng độc lực của virus gây bệnh Marek (MDV) đã trở thành một vấn đề nghiêm trọng trên toàn thế giới. Các nghiên cứu đã tập trung vào phân tích đặc điểm phân tử và phá hệ nguồn gốc của các chủng virus độc lực và các chủng virus vaccine.

Bảng 3.1. Danh sách các chủng MDV của Việt Nam và thế giới sử dụng trong nghiên cứu

STT	Kí hiệu chủng	Số đăng kí NHG	Genotype	Nước	Năm phân lập
1	MDV-VX		-	Hà Lan	2021
2	CVI988	DQ534538	att	Hà Lan	-
3	3004	EU032468	att	Nga	-
4	GX060167	EU697887	m	Trung Quốc	2006
5	814	AF493551	m	Trung Quốc	1980
6	CU-2	AY362708	m	Mỹ	1970

STT	Kí hiệu chủng	Số đăng kí NHG	Genotype	Nước	Năm phân lập
7	LCGZ	HQ658612	m	Trung Quốc	2007
8	Tokachi-w1	AB638846	m	Nhật Bản	2005
9	Tokachi-s2	AB638845	m	Nhật Bản	2005
10	584a	DQ534532	vv+	Mỹ	-
11	648A	AY362725	vv+	Mỹ	1994
12	660-A	AY362726	vv+	Mỹ	-
13	L	AY362717	vv+	Mỹ	-
14	New	AY362719	vv+	Mỹ	-
15	N	AY362718	vv+	Mỹ	-
16	RL	AY362720	vv+	Mỹ	-
17	TK	AY362721	vv+	Mỹ	-
18	X	AY362724	vv+	Mỹ	-
19	W	AY362723	vv+	Mỹ	1999
20	U	AY362722	vv+	Mỹ	-
21	Md5	AF243438	vv	Mỹ	1977
22	GX0101	JX844666	vv	Trung Quốc	2001
23	YA	HQ638156	vv	Trung Quốc	-
24	643P	AY362716	vv	United States	1994
25	MS57	HQ638145	vv	Trung Quốc	-
26	LMS	JQ314003	vv	Trung Quốc	2007
27	WS03	HQ638152	vv	Trung Quốc	-
28	GX070060	EU427303	vv	Trung Quốc	2008
29	YLO40920	DQ174459	vv	Trung Quốc	2005
30	GXY2	EF546430	vv	Trung Quốc	2007
31	0297	AF493553	vv	Trung Quốc	2002
32	JL-1404	KU744559	vv	Trung Quốc	2014
33	WC-1203	KU744558	vv	Trung Quốc	2012
34	GX070079	EU427304	vv	Trung Quốc	2008
35	HNLC401	HF546094	vv	Trung Quốc	-
36	LTS	KP888838	vv	Trung Quốc	2012
37	MDJ3-1301	KP888849	vv	Trung Quốc	2013
38	1409	KU744560	vv	Trung Quốc	2014
39	HNGS101	MG432697	vv	Trung Quốc	2011

STT	Kí hiệu chủng	Số đăng kí NHG	Genotype	Nước	Năm phân lập
40	HNGS206	HF546086	vv	Trung Quốc	-
41	MRBG	Nghiên cứu này	-	Bắc Giang/VN	2022
42	MRHD9	Nghiên cứu này	-	Hải Dương/VN	2022
43	MRHD10	Nghiên cứu này	-	Hải Dương/VN	2022
44	MRBN1	Nghiên cứu này	-	Bắc Ninh/VN	2022
45	MRHN1	Nghiên cứu này	-	Hà Nội/VN	2022
46	MRHT2	Nghiên cứu này	-	Hà Nội /VN	2022
47	MRDH3	Nghiên cứu này	-	Quảng Ninh/VN	2022
48	Ck-487-15-IT	MK139660	GaHV-2	Ý	2015
49	Ck-625-16-IT	MK139666	GaHV-2	Ý	2016
50	Ck-801-17-IT	MK139670	GaHV-2	Ý	2017
51	02LAR	EF523772	vv	Australia	2002
52	FT158	EF523771	vv	Australia	2002
53	Woodlands1	EF523775	vv	Australia	1992
54	04CRE	EF523773	v	Australia	2004
55	MPF57	EF523774	v	Australia	1994

Việc xác định pathotype của các chủng GaHV-2 thường được dựa trên trình tự amino acid của gen *Meq*; cụ thể bao gồm số lần lặp lại của proline (PPPP), chiều dài gen *Meq*, kích thước chèn, số lượng motif PPPP trong miền biến đổi của gen *Meq*, tỷ lệ phần trăm proline [3,15].

Các chủng MDV độc lực (vMDV), độc lực cao (vvMDV) và độc lực cực cao (vv+MDV) được đặc trưng bởi sự có mặt của nhiều lần lặp lại motif PPPP, trong đó các chủng độc lực cao có số lượng motif PPPP ít hơn so với các chủng độc lực thấp và nhược độc [72]. Cụ thể gen *Meq* của các chủng nhược độc (att-MDV) CVI988 có số lượng motif PPPP cao (8 motif) và các chủng có độc lực vừa (mMDV) có 7 motif PPPP gồm chủng vaccine đang sử dụng tại Việt Nam, chủng CU-2 [AY362708]. Các chủng vvMDV của Trung Quốc có 3 motif PPPP trong gen *Meq*, như (GX070079 [EU427304]; YA [EU427304];

LTS [KP888838]. Các chủng độc lực cực cao (vv+MDV) có nguồn gốc từ Mỹ và Ý chỉ gồm có 2 motif PPPP như chủng (584a [DQ534532]; 648A [AY362725], GaHV-2/Italy/Ck/855/17 [MK139678]).

Bảng 3.2: Phân tích đặc tính phân tử protein *Meq* của các chủng GaHV-2

Tên chủng	Chiều dài gen <i>Meq</i>	Số lượng (aa) chèn	Số lượng motif PPPP	Phần trăm Proline (%)
CVI988 (att)	399	60	8	23.25
MRVX	398	59	7	23.06
CU-2 (m)	398	59	7	23.06
MPF57 (v)	398	59	5	22.56
04CRE (v)	398	59	5	22.56
GA (v)	339	0	4	21.47
RB1B (vv)	339	0	5	21.47
Md5 (vv)	339	0	4	21.24
Italy-Ck-487-660 (vv)	339	0	4	21.47
584a (vv+)	339	0	2	20.59
648A (vv+)	339	0	2	20.88
GX070079 (vv)	339	0	3	20.88
YA (vv)	339	0	3	20.88
LTS (vv)	339	0	3	20.88
MRBG	339	0	3	20.59
MRHD9	339	0	3	20.88
MRHD10	339	0	3	20.88
MRBN1	339	0	3	21.18
MRHN1	339	0	3	20.88
MRHT2	339	0	3	20.88
MRDH3	339	0	3	20.88

Toàn bộ gen *Meq* của tất cả các chủng GaHV-2 Việt Nam thu nhận từ thực địa trong nghiên cứu này đều có mã hóa cho 339 amino acid, và được so sánh với chiều dài của các chủng tham chiếu trên ngân hàng gen (Bảng 3.2). Theo các công bố của thế giới, kích thước protein *Meq* của các chủng độc lực cao (vvMDV) đều gồm 339 amino acid.

Về cấu trúc phân tử, gen *Meq* của các chủng của Việt Nam gồm có 3 motif PPPP, giống như phần lớn các chủng vvMDV của Trung Quốc. Tỷ lệ proline thấp đã được chứng minh là tương quan với độc lực cao [3].

Các tiêu chí xác định độc lực của các chủng GaHV-2 nghiên cứu bao gồm kích thước gen, số lượng motif PPPP và tỷ lệ phần trăm proline được trình bày ở bảng 3.2.

Wajid và cộng sự [72] đã đề xuất một mối tương quan giữa hàm lượng proline và độc lực của các chủng mới xuất hiện. Phân tích các chủng đối chứng cho thấy tỉ lệ này nghịch với độc lực. Protein *Meq* của 7 chủng Việt Nam có kích thước 339 amino acid, chứa đựng ba motif PPPP và có tỷ lệ proline tương đối thấp so với chủng độc lực thấp (mMDV), các chủng độc lực (vMDV) và ngay cả với phần lớn của các chủng độc lực cao (vvMDV), từ 20,59 – 21,18%. Điều này cho thấy các chủng của Việt Nam là các chủng có độc lực cao.

Trình tự protein *Meq* chủng vaccine (MRVX) đang được sử dụng tại Việt Nam hoàn toàn tương đồng với chủng vaccine CU-2 (AY362708), và đều gồm 398 amino acid với số lượng motif PPPP cao (7 motif). So với các chủng độc lực cao, các chủng vaccine đặc trưng bởi sự chèn thêm 59 amino acid trong gen *Meq*. Các trình tự amino acid chèn thêm này còn được tìm thấy ở các chủng độc lực thấp ở Trung Quốc (chủng 814) và Nga (chủng 3004), không có ở các chủng độc lực cực cao có nguồn gốc từ Mỹ và các chủng thực địa của Việt Nam.

Các vị trí sai khác amino acid trong gen *Meq* của 8 chủng nghiên cứu và các chủng MDV tham chiếu trên ngân hàng gen được trình bày trong (Bảng 3.2, Hình 3.5). Kết quả phân tích đặc điểm phân tử này cho thấy 7 chủng phân lập từ thực địa của Việt Nam trong nghiên cứu này đã có sai khác ở các vị trí 66, 71, 77, 80, 115, 139, 176, 217, 326 so với các chủng vaccine CVI988 (Hình 3.5).

Công bố trước đây đã chỉ ra rằng sự thay đổi amino acid ở vị trí 71 (serine thành alanin) và vị trí 77 (glutamate thành lysine) là đặc điểm của chủng độc

lực cao [8]. Trong nghiên cứu này, đột biến tương tự tại vị trí 71 cũng được quan sát thấy ở tất cả các chủng hoang dã từ Trung Quốc, các chủng thực địa của Việt Nam và các chủng vv+ của Mỹ. Tuy nhiên, một số chủng vv, chẳng hạn như 02LAR (EF523772), Woodlands1 (EF523775), FT158 (EF523771) là các chủng có độc lực cao (vv), không có sự thay đổi amino acid ở vị trí này, gây ra sự nghi ngờ về việc liệu sự có mặt của đột biến này có phải là tiêu chí đáng tin cậy để phân loại các pathotype của MDV serotype 1 hay không.

Tuy nhiên đột biến ở vị trí 77 không được quan sát thấy ở các chủng phân lập Trung Quốc và các chủng của Việt Nam. Đột biến này xảy ra ở các chủng độc lực cực cao của Mỹ. Điều này đã được quan sát thấy trong các chủng vv+ phân lập được ở Mỹ. Các chủng độc lực cực cao (vv+) của Mỹ chứa các đột biến riêng ở các vị trí 80D, 115V, 119R, 139T, 153Q và 176A.

Các thay đổi amino acid ở vị trí 80, 115, 139 và 176 đều tồn tại trong hầu hết các chủng loại từ Trung Quốc và các chủng của Việt Nam trong nghiên cứu này bao gồm: sự thay thế ở vị trí 80 (aspartate thành tyrosine), 115 (valine thành alanin), 139 (threonine thành alanine) và 176 (proline thành arginine). Những thay thế amino acid này tương ứng này được nghi ngờ là góp phần làm tăng khả năng vận chuyển protein *Meq* [73]. Các đột biến này có thể được sử dụng làm đặc điểm di truyền độc lực của các chủng MDV đang lưu hành tại Trung Quốc và Việt Nam. Ba sự thay thế làm cho đặc tính amino acid thay đổi đó là vị trí G66R từ Glycine (béo, trung tính) trở thành arginine (ưa nước, phân cực, mang điện tích dương), S71A từ serin (phân cực, trung tính) thành alanin (kị nước, không phân cực, điện tích trung tính) và T180M từ asparatate (có tính axit điện tích âm) thành tyrosine (phân cực, trung tính). Sự khác biệt về amino acid này có thể có ý nghĩa đối với đặc điểm của virus [74]. So sánh với các chủng thực địa ở Việt Nam chỉ có hai sự khác biệt ở vị trí 66 (G→R) và 71 (S→A) (Hình 3.6).

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	
att-CVI988	:	MSQEPEPGAMPYSPADDPSPDLLSLGTSRKRKRKSHDIPNSPSKHFPDGLSEEKQKLERRRRIGNRDA	:	SRRRRREQTDYVOKLHEACEELQRA	:	95				
MDV-VX2	:	R	:	R	:	95				
vv-plus-58	:	R	:	A	:	95				
vv-plus-64	:	R	:	A	:	95				
vv-plus-66	:	R	:	A	:	95				
vv-plus-L	:	R	:	A	:	95				
vv-plus-Ne	:	R	:	A	:	95				
vv-plus-N	:	R	:	A	:	95				
vv-plus-RL	:	R	:	A	:	95				
vv-plus-TK	:	R	:	A	:	95				
vv-plus-X	:	R	:	A	:	95				
vv-plus-U	:	R	:	A	:	95				
vv-GX0101	:	R	:	A	:	95				
vv-YA-CN (H	:	R	:	A	:	95				
vv-LMS-CN	:	R	:	A	:	95				
vv-WS03-CN	:	R	:	A	:	95				
GX070060	:	R	:	A	:	95				
YLO40920	:	R	:	A	:	95				
GXY2-CN	:	R	:	A	:	95				
JL-1404-CN	:	R	:	A	:	95				
WC-1203-CN	:	R	:	A	:	95				
vv-GX070079	:	R	:	A	:	95				
LTS-CN-201	:	R	:	A	:	95				
MDJ3-1301	:	R	:	A	:	95				
CC-1409-CN	:	R	:	A	:	95				
MRBG	:	R	:	A	:	95				
MRHD9	:	R	:	A	:	94				
MRHD10	:	R	:	A	:	95				
MRHN1	:	R	:	A	:	95				
MRHN1	:	R	:	A	:	95				
MRHT2	:	R	:	A	:	95				
MRDH3	:	R	:	A	:	95				
BBBB	:	R	:	A	:	95				

		100	*	120	*	140	*	160	*	180	*
att-CVI988	:	NEHLRKEIRDLRTECTSLRVQLACEPVCPMAVPLTVLGLLTPHDVPEPPICTPPPSPDEPNAPHC	:	SGSQPPICTPPPEIDTELCALQLCST	:	190					
MDV-VX2	:	R	:	R	:	190					
vv-plus-58	:	R	:	Q	:	190					
vv-plus-64	:	R	:	Q	:	190					
vv-plus-66	:	R	:	Q	:	190					
vv-plus-L	:	R	:	Q	:	190					
vv-plus-N	:	R	:	Q	:	190					
vv-plus-RL	:	R	:	Q	:	190					
vv-plus-TK	:	R	:	Q	:	190					
vv-plus-X	:	R	:	Q	:	190					
vv-GX0101	:	A	:	A	:	190					
vv-YA-CN (H	:	A	:	A	:	190					
vv-LMS-CN	:	A	:	A	:	190					
vv-WS03-CN	:	A	:	A	:	190					
v-GX070060	:	A	:	A	:	190					
v-YLO40920	:	A	:	A	:	190					
v-GXY2-CN	:	A	:	A	:	190					
JL-1404-CN	:	A	:	A	:	190					
WC-1203-CN	:	A	:	A	:	190					
v-GX070079	:	A	:	A	:	190					
LTS-CN-201	:	A	:	A	:	190					
MDJ3-1301	:	A	:	A	:	190					
CC-1409-CN	:	A	:	A	:	190					
MRBG	:	A	:	A	:	190					
MRHD9	:	A	:	A	:	189					
MRHD10	:	A	:	A	:	190					
MRHN1	:	A	:	A	:	190					
MRHN1	:	A	:	A	:	190					
MRHT2	:	A	:	A	:	190					
MRDH3	:	A	:	A	:	190					

		200	*	220	*	240	*	260	*	280
att-CVI988	:	PPPPISTPHIIYAGPSPLOPPICTPPPPDAEELCAQLCSTPPPPISTPHIYAPGLCSTPPPPISTPHIIYAGPSPLOPPICTPPPPDAEELC	:		:		:		:	
MDV-VX2	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
vv-plus-58	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
vv-plus-64	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
vv-plus-66	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
vv-plus-L	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
vv-plus-Ne	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
vv-plus-N	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
vv-plus-RL	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
vv-plus-TK	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
vv-plus-X	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
vv-plus-U	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
vv-GX0101	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
vv-YA-CN (H	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
vv-LMS-CN	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
vv-WS03-CN	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
v-GX070060	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
v-YLO40920	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
v-GXY2-CN	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
JL-1404-CN	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
WC-1203-CN	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
v-GX070079	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
LTS-CN-201	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
MDJ3-1301	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
CC-1409-CN	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----
MRBG	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----	:	-----

Ngoài sự sai khác ở các vị trí trên các chủng được phân lập ở thực địa cũng thiếu phần chèn 60 amino acid ở vị trí 195-254 thường được công nhận ở dòng virus có độc lực thấp hơn [74]. Sự sai khác này được biểu thị bằng dấu gạch ngang (Hình 3.5). Tuy nhiên, hai nghiên cứu cũng báo cáo rằng sự chèn 60 axit amin cũng được tìm thấy ở một số chủng độc lực [9].

Mức độ độc lực của virus còn có thể liên quan đến sự gián đoạn số lượng motif vùng lặp lại giàu proline [PPPP đến P (Q/A/R)PP] trong protein *Meq* [3]. Vùng lặp lại giàu proline ở đầu C có liên quan đến gen ức chế khối u WT-1 [33]. Các virus có độc lực cao có số lần gián đoạn nhiều nhất [8]. Sau đó, Rentz *et al.*, (2012) đã kiểm tra vùng lặp lại giàu proline ở một số chủng MDV-1 đặc trưng. Các nhà khoa học công nhận chủng vaccine CVI988 có số lượng motif vùng lặp lại giàu proline cao nhất (tám motif). Rõ ràng, số lượng các motif gián đoạn của proline dần ít đi cùng với mức độ độc lực tăng lên [9].

Các chủng giảm độc lực có nhiều motif PPPP hơn, trong khi hầu hết các chủng độc lực có nhiều motif gián đoạn hơn. Các chủng siêu độc lực có số lượng motif này thấp và số lượng nhỏ nhất được quan sát thấy ở chủng vv+ có nguồn gốc từ Mỹ chỉ có hai motif PPPP. Các chủng vv và vv+ chứa các đoạn gián đoạn motif PPPP trong vùng giàu proline lặp lại ở vị trí thứ hai (P>Q153, P>A176 và P>A276) và số lượng lớn nhất của các gián đoạn ở các chủng độc nhất vv+ [72].

```

584a-US (DQ) : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTDYVDKLHEACEELQRA : 95
648A-US-19 : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTDYVDKLHEACEELQRA : 95
660-A-US (A) : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTDYVDKLHEACEELQRA : 95
L-US (AY362) : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTDYVDKLHEACEELQRA : 95
New-US (AY3) : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTDYVDKLHEACEELQRA : 95
N-US (AY362) : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTDYVDKLHEACEELQRA : 95
RL-US (AY36) : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTDYVDKLHEACEELQRA : 95
TK-US (AY36) : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTDYVDKLHEACEELQRA : 95
X-US (AY362) : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTDYVDKLHEACEELQRA : 95
U-US (AY362) : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTDYVDKLHEACEELQRA : 95
Md5-US-197 : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTDYVDKLHEACEELQRA : 95
GX0101-CN- : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95
YA-CN (HQ63) : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95
MS57-CN (HQ) : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95
LMS-CN-200 : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95
WS03-CN (HQ) : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95
GX070060-C : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95
YLO40920-C : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95
GXY2-CN-20 : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95
0297-CN-20 : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95
JL-1404-CN : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95
WC-1203-CN : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95
GX070079-C : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95
LTS-CN-201 : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95
MDJ3-1301- : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEGKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95
CC-1409-CN : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95
HNGS101-CN : MSQPEPEGAMPYSPADDPSPDLLSLGSTRRKKRSHDIPNSPKHFPFDGLSEEEKQLERRRKNRDAARRRRRQTYVDKLHEACEELQRA : 95

```



```

MS57-CN (HQ) : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
LMS-CN-200 : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
WS03-CN (HQ) : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
GX070060-C : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
YL040920-C : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
GXY2-CN-20 : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
0297-CN-20 : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
JL-1404-CN : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
WC-1203-CN : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
GX070079-C : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
LTS-CN-201 : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
MDJ3-1301- : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
CC-1409-CN : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
HNGS101-CN : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
MRBG : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
MRHD9 : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 338
MRHD10 : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
MRBN1 : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
MRHN1 : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
MRHT2 : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339
MRDH3 : FFPSPPHFAPEPERLYARLTEDPEQDSL YSGQIYIQFSDTQSTVWVWFPDGRP : 339

```

Hình 3.6. Sự gián đoạn motif PPPP của các chủng nghiên cứu

Ghi chú: Sự sai khác Amino acid sai khác được biểu thị bằng chữ cái kí hiệu của chúng.

Phân tích trình tự amino acid của protein *Meq* của các chủng phân lập từ thực địa ở Việt Nam có 3 motif gián đoạn nên dự đoán độc lực của các chủng phân lập từ thực địa sẽ là các chủng có độc lực cao (vv). Sự gián đoạn của motif PPPP trong vùng giàu proline ở các chủng ở Việt Nam cho thấy sự thay thế ở vị trí 176 làm gián đoạn một đoạn proline ở vị trí 2 (PPPP→PRPP), vị trí 217 ở vị trí hai (PPPP→PAPP), vị trí 289 làm ngắt chuỗi PPPP ở vị trí 2 (PPPP→PSPP) (Hình 3.6).

Kết quả so sánh đặc điểm phân tử (Hình 3.6) đã xác định được chính xác các chủng GaHV-2 gây bệnh tại các tỉnh miền Bắc Việt Nam thuộc nhóm độc lực cao (vvMDV) và có mối quan hệ gần gũi với các chủng độc lực cao của Trung Quốc.

Nhóm GaHV-2 độc lực cực cao (vv+MDV) mới chỉ được công bố tại Mỹ. Không phát hiện thấy các chủng độc lực cực cao này ở châu Á.

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy giữa các chủng virus cường độc đang lưu hành và các chủng vaccine đang sử dụng tại Việt Nam không chỉ có tỷ lệ tương đồng thấp mà có sự sai khác ở các vị trí amino acid trong gen kháng nguyên *Meq*. Sự sai khác này có thể dẫn đến sự sai khác về tính kháng nguyên – miễn

dịch. Đây có thể là một trong những nguyên nhân quan trọng làm giảm khả năng bảo hộ của vaccine.

Trên thế giới bệnh Marek phần lớn được kiểm soát thông qua hàng loạt chương trình tiêm chủng với các loại vaccine chủng GaHV-2 sống giảm độc lực. Cho dù các quốc gia đã rất nỗ lực để kiểm soát sự lây lan của bệnh Marek thông qua các chiến lược tiêm chủng hàng loạt, tuy nhiên có nhiều bằng chứng cho thấy GaHV-2 đã phát triển để tăng độc lực [75]. Mối lo ngại và quan tâm lớn nhất của ngành công nghiệp gia cầm là vaccine hiện tại không bảo vệ được gà chống lại nhiều chủng virus thực địa mới.

Để xác định cơ sở phân tử cho độc lực của các chủng GaHV-2, một loạt các nghiên cứu đã được tiến hành. Các nhà khoa học đã chứng minh sự đột biến trong một số gen, và đặc biệt là gen *Meq* có liên quan đến độc lực của virus [76].

Trong nghiên cứu này của chúng tôi, dựa trên phân tích đặc điểm phân tử của gen *Meq* cho thấy tất cả các chủng virus gây bệnh Marek đang lưu hành tại Việt Nam trong nghiên cứu này đều là các chủng virus độc lực cao. Đồng thời không có sự tương đồng cao giữa các chủng virus thực địa và chủng virus vaccine. Điều này cho thấy cần áp dụng sớm các biện pháp phòng bệnh hiệu quả cũng như lựa chọn sử dụng các loại vaccine phù hợp với các chủng virus đang lưu hành.

Trong những năm 1980, ở Trung Quốc chỉ sử dụng hai loại vaccine MDV serotype 2 và 3, chưa áp dụng vaccine MDV serotype 1. Sau đó, dịch bệnh Marek đã bùng phát ở đông bắc Trung Quốc tại một trang trại gà không có bất kỳ bằng chứng nào về dịch bệnh trong nhiều năm. Từ đó các nhà khoa học đã phân lập được chủng MDV 814 thực địa để tạo chủng vaccine MDV serotype 1 đầu tiên được sử dụng ở Trung Quốc và đã được sử dụng thành công ở Trung Quốc trong hai mươi năm. Điều này cho thấy sự tương đồng kháng

nguyên – miễn dịch giữa chủng virus thực địa và chủng virus vaccine là điều vô cùng quan trọng.

Việc ứng dụng PCR để chẩn đoán MDV có thể nâng cao đáng kể sự hiểu biết của chúng ta về dịch tễ học, sự lây lan, chẩn đoán và vaccine kiểm soát MD ở nước ta. Bên cạnh đó việc xác định các pathotype cũng cần thiết để thiết lập các tiêu chuẩn trong an toàn sinh học của các trang trại, và để thiết kế các chương trình tiêm chủng cũng giám sát mức độ lây lan của virus.

Các vị trí sai khác nucleotide dẫn đến sự sai khác trình tự amino acid. Khi so sánh giữa các chủng virus nghiên cứu và các chủng virus đã được phân lập trước đây chúng tôi nhận thấy có 11 vị trí sai khác lớn, có thể ảnh hưởng đến tính độc lực của virus (Bảng 3.3).

Bảng 3.3. Các vị trí sai khác amino acid trong gen *Meq* giữa các chủng GaHV-2 nghiên cứu so với các chủng trên thế giới

Chủng	Serotype	Nước	Số NHG	Vị trí										
				66	71	77	80	115	119	139	153	176	217/276	320/379
MDV-VX2		Việt Nam	N/C này	R	S	E	D	V	C	T	P	P	P	I
CVI988	att	Hà Lan	DQ534538	G	S	E	D	V	C	T	P	P	P	I
3004	m	Nga	EU032468	R	S	E	D	V	C	T	P	P	P	I
GX060167	m	Trung Quốc	EU697887	R	S	E	D	V	C	T	P	P	P	I
CU-2	m	Mỹ	AY362708	R	S	E	D	V	C	T	P	P	P	I
814	m	Trung Quốc	AF493551	R	S	E	D	A	C	T	P	P	P	I
LCGZ-CN	m	Trung Quốc	HQ658612	R	S	E	D	V	C	T	P	P	P	I
Tokachi-w1	m	Nhật Bản	AB638846	R	S	E	D	V	C	T	P	P	P	I
Tokachi-s2	m	Nhật Bản	AB638845	R	S	E	D	V	C	T	P	P	P	I
04CRE	v	Úc	EF523773	R	S	A	Y	A	C	T	P	A	A	I
MPF57	v	Úc	EF523774	R	S	A	Y	A	C	T	P	A	A	I
vv-02LAR	vv	Úc	EF523772	R	S	A	D	A	C	T	P	A	A	I
FT158	vv	Úc	EF523771	R	S	A	A	A	C	T	P	A	A	I
Woodlands1	vv	Úc	EF523775	R	S	A	Y	A	C	T	P	A	A	I
GX0101	vv	Trung Quốc	JX844666	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
YA	vv	Trung Quốc	HQ638156	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
MS57	vv	Trung Quốc	HQ638145	R	A	E	C	A	C	A	P	R	A	I
LMS	vv	Trung Quốc	JQ314003	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
WS03	vv	Trung Quốc	HQ638152	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
GX070060	vv	Trung Quốc	EU427303	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
YLO40920	vv	Trung Quốc	DQ174459	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
GXY2	vv	Trung Quốc	EF546430	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
0297	vv	Trung Quốc	AF493553	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
JL-1404	vv	Trung Quốc	KU744559	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I

WC-1203	vv	Trung Quốc	KU744558	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
GX070079	vv	Trung Quốc	EU427304	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
HNLC401	vv	Trung Quốc	HF546094	R	A	E	Y	A	C	T	P	R	A	I
LTS	vv	Trung Quốc	KP888838	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
MDJ3-1301	vv	Trung Quốc	KP888849	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
CC-1409	vv	Trung Quốc	KU744560	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
HNGS101	vv	Trung Quốc	MG432697	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
MRBG	-	Việt Nam	NC này	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
MRHD9	-	Việt Nam	NC này	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
MRHD10	-	Việt Nam	NC này	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
MRBN1	-	Việt Nam	NC này	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
MRHN1	-	Việt Nam	NC này	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
MRHT2	-	Việt Nam	NC này	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
MRDH3	-	Việt Nam	NC này	R	A	E	Y	A	C	A	P	R	A	I
584a	vv+	Mỹ	DQ534532	R	A	K	D	V	R	T	Q	A	A	T
648A	vv+	Mỹ	AY362725	R	A	K	D	V	R	T	Q	A	A	I
660-A	vv+	Mỹ	AY362726	R	A	K	D	V	R	T	Q	A	A	I
L	vv+	Mỹ	AY362717	R	A	K	D	V	R	T	Q	A	A	I
New	vv+	Mỹ	AY362719	R	A	K	D	V	R	T	Q	A	A	T
N	vv+	Mỹ	AY362718	R	A	K	D	V	R	T	Q	A	A	I
RL	vv+	Mỹ	AY362720	R	A	K	D	V	R	T	Q	A	A	I
TK	vv+	Mỹ	AY362721	R	A	K	D	V	R	T	Q	A	A	I
X	vv+	Mỹ	AY362724	R	A	K	D	V	R	T	Q	A	A	I
W	vv+	Mỹ	AY362723	R	A	K	D	V	C	T	P	P	A	T
Md5	vv	Mỹ	AF243438	R	A	K	D	V	C	T	P	P	A	T
643P	vv	Mỹ	AY362716	R	A	K	D	V	R	T	Q	A	A	I

Mặc dù gen *Meq* chủ yếu được biểu hiện ở trạng thái tiềm ẩn, nhưng các nghiên cứu đã chỉ ra rằng gen *Meq* cũng có thể biểu hiện ra sớm khi nhiễm bệnh. Tuy nhiên, các nghiên cứu giải trình tự gen trước đây đã không phát hiện ra các đột biến ở các gen khác có tương quan nhất quán với độc lực [3]. Phát hiện của chúng tôi cho thấy rằng có sự đa hình đáng kể trong gen *Meq* của MDV, là gen quan trọng trong việc hình thành các khối u bạch huyết. Các chủng phân lập được ở Việt Nam có hai thay thế amino acid trong protein *Meq* có thể liên quan đến độc lực. Ngoài ra hàm lượng proline tổng thể là kiểu lặp lại PPPP cho thấy mối tương quan chặt chẽ đến độc lực. Mặc dù độc lực của một số chủng phân lập cụ thể khó có thể chỉ được xác định bởi các đột biến trong một gen đơn lẻ, nhưng kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy rằng việc phân tích trình tự gen và protein *Meq* có thể cung cấp một dấu hiệu hữu ích về độc lực của các chủng phân lập này. Tuy nhiên, sự đồng nhất của pathotype đòi hỏi các thí nghiệm *in vivo* tiếp theo trên số lượng thu nhận lớn.

3.2.2. Kết quả so sánh tỷ lệ (%) đồng nhất về nucleotide và amino acid giữa các chủng GaHV2 nghiên cứu với trình tự gen tương ứng trên thế giới

Trình tự nucleotide và amino acid gen *Meq* của 7 mẫu GaHV-2 phân lập từ thực địa trong nghiên cứu này và 01 chủng vaccine đang sử dụng tại Việt Nam được so sánh với các chủng trên thế giới được đăng ký trên ngân hàng gen, đại diện cho các nhóm độc lực khác nhau. Kết quả được trình bày ở bảng 3.4.

Kết quả so sánh cho thấy, giữa các chủng của Việt Nam trong nghiên cứu và giữa các chủng của Việt Nam với Trung Quốc có tỷ lệ đồng nhất cao về nucleotide và amino acid tương ứng từ 99.2 - 100% và 98.2 – 100%, thậm chí đạt tuyệt đối 100% khi so với 2 chủng YA-CN (HQ638156); GX070079-CN (EU427304), các chủng này cùng nằm trong nhóm I khi phân tích cây phả hệ. Điều này cung cấp thêm dữ liệu góp phần chỉ ra rằng, các chủng GaHV2 phân lập tại Việt Nam có quan hệ rất gần gũi và có nguồn gốc từ Trung Quốc.

Khi so sánh chủng Việt Nam với các chủng của Ý GaHV-2-Italy-Ck-487-15-IT-2015(MK139660); GaHV-2-Italy-Ck-625-16-IT-2016(MK139666) tỉ lệ đồng nhất về nucleotide và amino acid tương ứng lần lượt là từ 98.7 - 99.5% và 97.0 – 98.5%.

Khi so sánh với các chủng thuộc các châu lục khác bao gồm Mỹ và Úc, các chủng của Việt Nam có tỷ lệ tương đồng thấp cả về nucleotide và amino acid, lần lượt là 98.3-99.3% và 84.3-84.6%.

Chủng vaccine (VX) đang được sử dụng ở Việt Nam hoàn toàn tương đồng về nucleotide và amino acid gen *Meq* với chủng vaccine CU-2 được sử dụng ở Mỹ. Tuy nhiên mức độ tương đồng giữa chủng vaccine và các chủng thực địa tại Việt Nam trong nghiên cứu này đạt mức thấp từ 84.2-84.6% về nucleotide và 82.5 -83.7% về amino acid.

Bảng 3.4. Tỷ lệ (%) đồng nhất về thành phần nucleotide và amino acid toàn bộ gen *Meq* của 08 chủng GaHV-2 (Việt Nam) với các chủng đại diện trên thế giới

STT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1		100	99.9	99.7	99.3	99.7	99.6	99.6	99.9	99.9	99.8	99.7	99.4	99.3	99.2	98.8	98.8	84.5	84.4	84.6	84.2	84.6
2	99.7		99.9	99.7	99.3	99.7	99.6	99.6	99.9	99.9	99.8	99.7	99.4	99.3	99.2	98.8	98.8	84.5	84.4	84.6	84.2	84.6
3	100	99.7		99.8	99.4	99.8	99.7	99.7	100	100	99.9	99.8	99.5	99.4	99.3	98.9	98.9	84.6	84.5	84.7	84.3	84.7
4	99.4	99.1	99.4		99.2	99.6	99.5	99.5	99.8	99.8	99.7	100	99.3	99.2	99.10	98.7	98.7	84.4	84.3	84.5	84.1	84.5
5	98.5	98.2	98.5	97.9		99.4	99.3	99.3	99.4	99.4	99.3	99.2	98.9	98.8	98.7	98.3	98.30	84.1	84	84.2	83.8	84.2
6	99.7	99.4	99.7	99.1	98.2		99.9	99.7	99.8	99.8	99.7	99.6	99.3	99.2	99.1	98.7	98.7	84.40	84.30	84.5	84.1	84.5
7	99.7	99.4	99.7	99.1	98.2	100		99.6	99.7	99.7	99.8	99.5	99.2	99.1	99	98.6	98.6	84.3	84.2	84.4	84	84.4
8	99.7	99.4	99.7	99.1	98.2	99.4	99.4		99.7	99.7	99.6	99.5	99.2	99.1	99	98.6	98.6	84.3	84.2	84.4	84	84.4
9	100	99.7	100	99.4	98.5	99.7	99.7	99.7		100	99.9	100	100	99.4	99.3	99	98.9	84.6	84.5	84.7	84.3	84.7
10	100	99.7	100	99.4	98.5	99.7	99.7	99.7	100		99.9	99.8	99.5	99.4	99.3	98.90	99	84.6	84.5	84.7	84.3	84.7
11	100	99.7	100	99.4	98.5	99.7	99.7	99.7	100	100		99.7	99.4	99.3	99.2	98.8	98.8	84.5	84.4	84.6	84.2	84.6
12	99.4	99.1	99.4	100	97.9	99.1	99.1	99.1	99.4	99.4	99.4		99.3	99.2	99.1	98.7	98.7	84.4	84.3	84.5	84.1	84.5
13	98.5	98.2	98.5	97.9	97	98.2	98.2	98.2	98.5	98.5	98.5	97.9		100	99.4	99.0	99.0	84.5	84	84.9	84.5	84.9
14	98.2	97.9	98.2	97.6	96.7	97.9	97.9	97.9	98.2	98.2	98.2	97.60	99.7		99.3	98.9	98.9	84.4	84.3	84.8	84.5	84.8
15	98.5	98.2	98.5	97.90	97	98.2	98.2	98.5	98.5	98.5	97.90	98.8	98.5		99.6	99.2	84.5	84.4	84.7	84.4	84.7	
16	97.9	97.6	97.9	97.30	96.4	97.6	97.60	97.60	97.9	97.9	97.9	97.30	97.9	97.6	99.1		99.6	84.2	84	84.4	84.0	84.4
17	97.6	97.3	97.6	97.00	96.10	97.3	97.30	97.30	97.6	97.6	97.6	97.00	97.6	97.3	98.8	99.7		84.2	84.1	84.4	84	84.4
18	84	83.7	84.0	83.5	82.7	83.70	83.7	83.7	84.0	84.0	84.0	83.50	83.7	83.5	84.5	83.7	83.5		99.5	99.4	99.0	99.4
19	83.7	83.5	83.7	83.2	82.5	83.50	83.5	83.5	83.7	83.7	83.7	83.20	83.5	83.2	84.2	84	83.2	99.7		99.4	99.0	99.4
20	83.7	83.5	83.7	83.2	82.5	83.5	83.5	83.5	83.7	83.7	83.7	83.2	84.5	84.2	84.5	83.7	83.5	99	98.7		99.5	100
21	83.2	83.0	83.2	82.7	82	83	83	83	83.2	83.2	83.2	82.7	84	83.7	84	83.2	83	98.5	98.2	99.5		99.5
22	83.7	83.5	83.7	83.2	82.5	83.5	83.5	83.5	83.7	83.7	83.7	83.2	84.5	84.2	84.5	83.7	83.5	99	98.7	100	99.5	

Ghi chú: 1. MRBG; 2. MRHD9; 3. MRHD10; 4. MRBN1; 5. MRDH1; 6. MRHN1; 7. MRHT2; 8. HNGS206-CN(HF546086); 9. YA-CN(HQ638156); 10. GX070079-CN-2008(EU427304); 11. LTS-CN-2012(KP888838); 12. MDJ3-1301-CN-2013(KP888849); 13. GaHV-2-Italy-Ck-487-15-IT-2015(MK139660); 14. GaHV-2-Italy-Ck-625-16-IT-2016(MK139666); 15. Md5-US-1977(AF243438); 16. 584a-US(DQ534532); 17. 648A-US-1994(AY362725); 18. 04CRE-AU-2004(EF523773); 19. vv-02LAR-AU-2002(EF523772), 20. MDV-VX; 21. CVI988-NL(DQ534538); 22. CU-2-US-1970(AY362708).

Đặc biệt đối với chủng vaccine CVI988, có trình tự gốc chứa một đoạn giàu proline được lặp lại từ vị trí 574 đến vị trí 753 trong trình tự nucleotide gen *Meq*, đoạn giàu proline này gây mất hoạt tính của gen *Meq* từ đó làm mất độc lực của chủng vaccine CVI988, vì tính kháng nguyên nổi bật hơn các chủng thuộc GaHV-2 và MeHV-1 nên chủng CVI988 được sử dụng rộng rãi nhằm tạo cơ chế miễn dịch cho mục đích tiêm phòng mà lại không gây bệnh cho vật chủ. Chủng CVI988 có tỷ lệ đồng nhất nucleotide và amino acid so với các chủng phân lập tại Việt Nam lần lượt là từ 83,4 – 84.3% về nucleotide và 82 -83.2% về amino acid. Hai chủng vaccine CVI988 và MRVX đang được sử dụng tại Việt Nam tuy nhiên mức độ tương đồng thấp dẫn đến hiệu quả phòng bệnh vẫn chưa triệt để.

Kết quả so sánh tỷ lệ tương đồng gen *Meq* đã thống nhất với kết quả phân tích đặc điểm phân tử. Các chủng trong cùng nhóm di truyền có tỷ lệ tương đồng cao. Các chủng thuộc các nhóm di truyền khác nhau thì có tỷ lệ tương đồng thấp hơn. 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. Do đó cần có kế hoạch nghiên cứu chế tạo chủng vaccine mới, hiệu quả hơn và đặc biệt là cần phải đề ra những phương án dự phòng bệnh khả thi, hiệu quả trước tình hình biến đổi độc lực trong những năm gần đây của bệnh Marek nói chung và của GaHV-2 nói riêng, nhất là trong tình hình hiệu quả tiêm phòng của vaccine không ổn định như hiện nay.

3.3. Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc

Bộ gen của MDV chứa hơn 200 gen và trong số các gen này, Marek's EcoRI-Q (MEQ), phosphoprotein-38 (pp38) và viral interleukin 8 (vIL-8) có được báo cáo là đóng một vai trò quan trọng trong độc lực của GaHV-2. Trong

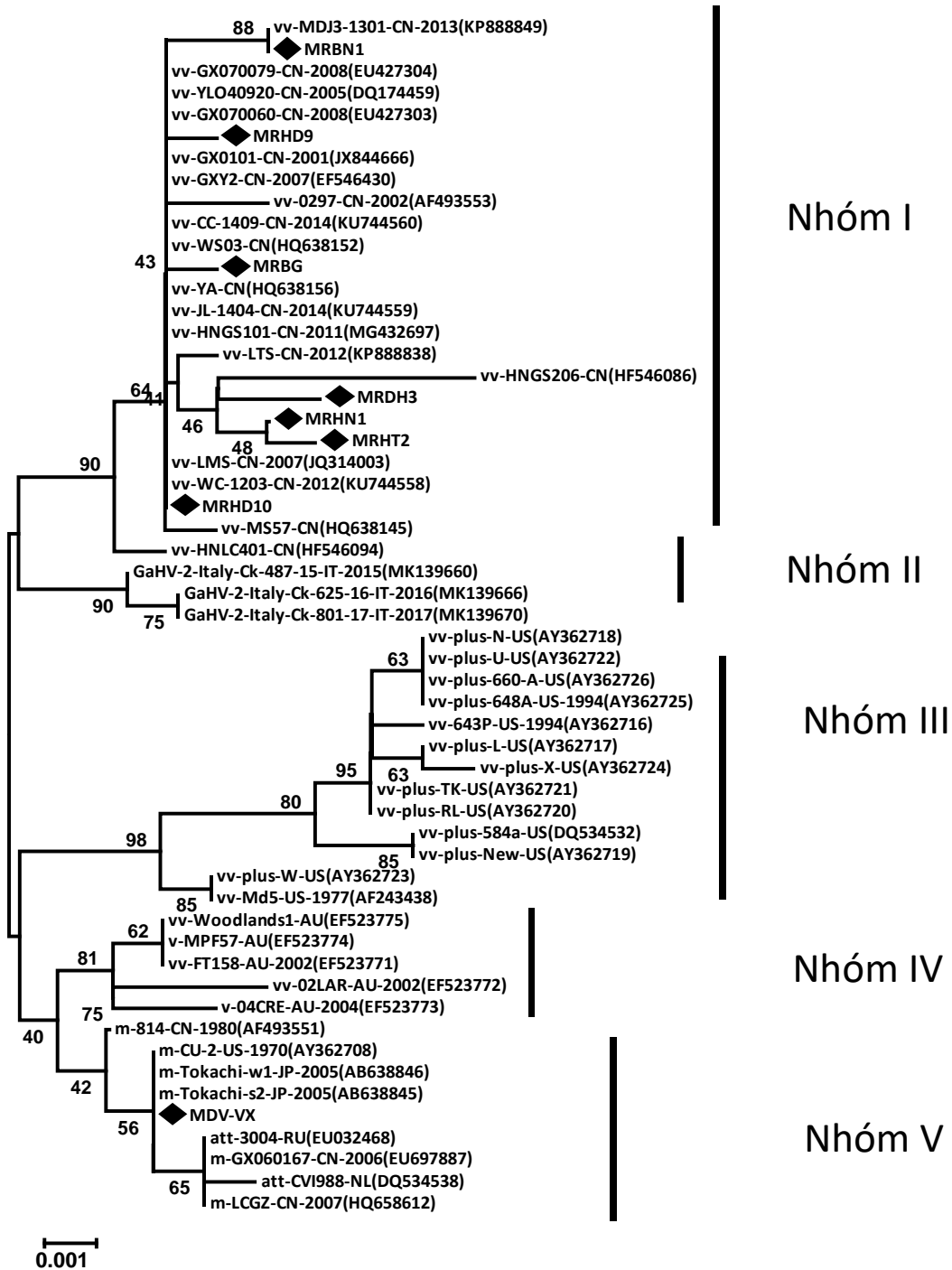
đó gen *Meq* mã hóa một axit amin 339 protein được coi là một trong những gen gây ra ung thư trên gà và cũng góp phần gây ức chế miễn dịch. Đồng thời gen này cũng đóng một vai trò quan trọng trong quá trình biến đổi của các tế bào lympho T. Virus thuộc nhóm GaHV-3 và MeHV-1 không mang gen *Meq*.

Trong nghiên cứu này trình tự nucleotide của toàn bộ gen kháng nguyên *Meq* của 08 chủng nghiên cứu được đưa phân tích phả hệ nguồn gốc cùng 47 chủng MDV-1 của thế giới có trên ngân hàng gen bằng phần mềm MEGA7 sử dụng phương pháp “kết nối liền kề” (Neighbor-Joining (NJ)), với hệ số tin tưởng (bootstrap) là 1000 lần [71]. Các chủng được đưa vào xây dựng nguồn gốc phả hệ là đại diện các chủng thuộc các nhóm độc lực khác nhau và có thời gian/địa điểm phân lập khác nhau (Bảng 3.1; Hình 3.7).

Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc cho thấy các chủng GaHV-2 đưa vào phân tích được chia thành 05 nhóm di truyền đại diện cho mức độ độc lực khác nhau:

i) Nhóm thứ nhất (I): Gồm 17 chủng độc lực cao (vvMDV) của Trung Quốc và 07 chủng GaHV-2 thực địa thu nhận tại các tỉnh miền Bắc của Việt Nam: Bắc Giang (MRBG), Hải Dương (MRHD9, MRHD10), Bắc Ninh (MRBN1), Hà Nội (MRHN1, MRHT2) và Quảng Ninh (MRDH3) ở các tỉnh Hà Nội, Bắc Giang, Quảng Ninh, Hải Dương, Bắc Ninh. Các chủng nghiên cứu có quan hệ gần gũi nhất với chủng MDJ3-1301-CN-2013-KP888849), GX070079-CN-2008-EU427304), HNGS206-CN-HF546086 và chủng YA-CM-HQ638156 từ Trung Quốc.

ii) Nhóm thứ hai (II): gồm các chủng GaHV-2 của Ý GaHV2-ck-487-15-IT-MK139660 phân lập năm 2015, GaHV2-ck-625-16-IT-2016-MK139666 và GaHV2-ck-801-17-IT-2017-MK139670, nhóm II sắp xếp ở vị trí đồng vị (monophyly) với nhóm I và lệch vị (paraphyly) với nhóm III, cho thấy mối quan hệ gần gũi giữa nhóm I và II.



Hình 3.7: Cây phả hệ xác định mối quan hệ nguồn gốc của các chủng GaHV-2 dựa trên trình tự amino acid của toàn bộ gen *Meq*.

Ghi chú: 08 chủng 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 [71]. Vạch ngang ở cuối hình (0.001) biểu thị sai khác nucleotide (1/1000) ở mỗi nhánh.

iii) Nhóm thứ ba (III): gồm các chủng độc lực rất cao (vv+MDV) của Mỹ, trong đó có chủng Md5-US-AF243438 phân lập năm 1977.

iv) Nhóm thứ tư (IV): gồm các chủng độc lực và độc lực cao của Úc, nhóm này sắp xếp ở vị trí đồng vị với nhóm V và lệch vị với nhóm III, cho thấy mức độ tiến hóa của các chủng GaHV-2 rất phức tạp.

v) Nhóm thứ năm gồm các chủng độc lực thấp và vaccine nhược độc của Úc, Mỹ, Nhật, Nga và Trung Quốc. Chủng vaccine đang sử dụng tại Việt Nam thuộc nhóm này.

Từ kết quả phân tích trên cho thấy có sự đa dạng di truyền gen *Meq* giữa các chủng GaHV-2 của các quốc gia khác nhau, đặc biệt là giữa các châu lục.

Các chủng GaHV-2 của Việt Nam có mối quan hệ gần gũi hơn với các chủng của Trung Quốc. Điều này được giải thích do Việt Nam và Trung Quốc gần nhau về mặt địa lý, có chung đường biên giới và việc giao lưu, buôn bán, vận chuyển gia cầm diễn ra thường xuyên. Chính vì vậy các chủng virus rất dễ dàng bị lây truyền từ nước này sang nước kia. So sánh với các chủng thuộc các châu lục khác, các chủng GaHV-2 của Việt Nam có mối quan hệ nguồn gốc xa hơn, đặc biệt là đối với các chủng của Mỹ và Úc. Đây là đặc điểm cần chú ý khi sử dụng vaccine có nguồn gốc từ Mỹ và Úc để sử dụng cho gà tại Việt Nam do có thể có hiệu quả thấp hơn. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thống nhất với các kết quả nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới, các chủng virus GaHV-2 ở Mỹ thuộc loại có độc lực cực cao (vv+).

Tuy nhiên, khi nghiên cứu về MDV cũng cho thấy sự tiến hóa liên tục về độc lực [3] và khả năng sinh đáp ứng miễn dịch do các loại vaccine có sẵn [24]. Để hiểu rõ hơn về sự phát triển về độc lực của MDV tại Việt Nam thì việc tìm hiểu, phân tích đặc điểm các gen gây ung thư là vô cùng cần thiết, trong đó chủ yếu là gen *Meq*. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng sự đa hình và thay đổi trong protein *Meq* dường như có liên quan đến độc lực [3]. Protein *Meq* của GaHV-2 là protein kháng nguyên của virus, là yếu tố chính quyết định độc lực của virus. Do đó, việc so sánh di truyền của trình tự gen mã hóa kháng nguyên *Meq* của các chủng MDV thuộc các nhóm khác nhau có thể đánh giá được sự đa

dạng của gen kháng nguyên, khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch, phát triển vaccine và kiểm soát dịch bệnh [77].

Tóm lại, nghiên cứu của luận văn đã xác định các chủng MDV serotype 1 lưu hành tại Việt Nam thuộc nhóm độc lực cao dựa trên lịch sử dịch tễ và đặc điểm phân tử. Đồng thời đề tài cũng đã xác định được các đặc điểm phân tử vùng gen kháng nguyên của 7 chủng virus thực địa và so sánh với chủng virus vaccine đang sử dụng phổ biến tại Việt Nam. Phân tích phả hệ nguồn gốc của các chủng GaHV-2 nghiên cứu với các chủng GaHV-2 của thế giới trên ngân hàng gen. Kết quả phân tích cho thấy các chủng GaHV-2 đang lưu hành của Việt Nam có mối quan hệ gần gũi với các chủng của Trung Quốc và có thể có nguồn gốc từ Trung Quốc du nhập sang Việt Nam.

Kết quả nghiên cứu của đề tài là nghiên cứu đầu tiên về giải mã gen kháng nguyên *Meq* của các chủng virus GaHV-2 ở Việt Nam. Nghiên cứu đã làm nổi bật tầm quan trọng của việc xác định các yếu tố nguy cơ đối với sự phát triển độc lực của MDV, từ đó phát triển các chiến lược kiểm soát và phòng bệnh hiệu quả bằng vaccine [3]. Việc lựa chọn được các chủng vaccine phù hợp với các chủng virus đang lưu hành thực địa là một trong các tiêu chí quan trọng trong công tác sản xuất và sử dụng vaccine.

Kết quả nghiên cứu của đề tài đã bước đầu cung cấp một số thông tin về sự lưu hành của các chủng MDV tại Việt Nam, cung cấp các dữ liệu về sinh học phân tử cho các nghiên cứu trong tương lai. Ngoài ý nghĩa khoa học, kết quả nghiên cứu cũng đem lại những ý nghĩa thực tiễn to lớn, cung cấp nguồn virus thực địa cho công tác sản xuất vaccine, đồng thời giúp cho việc lựa chọn sử dụng loại vaccine phù hợp để đạt hiệu quả phòng bệnh cao hơn.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

- Gen *Meq* từ 7 chủng virus lưu hành trên gà bị bệnh Marek thu nhận tại Hà Nội, Bắc Ninh, Bắc Giang, Hải Dương, Quảng Ninh và từ chủng vaccine của Viphavet đã được giải trình tự. Gen *Meq* từ chủng thực địa dài 1020 nucleotide mã hóa cho 339 amino acid. Gen *Meq* từ chủng vaccine dài 1197 nucleotide mã hóa cho 398 amino acid.

- Gen *Meq* của chủng vaccine có thêm đoạn chèn dài 177 nucleotide vào vị trí 574 so với các gen từ chủng thực địa. Các gen *Meq* thu nhận từ thực địa tương đồng 98,2 -99,9% tạo cụm tách biệt, giống với các chủng độc lực cao trên thế giới và chỉ tương đồng 84,2 -84,6% so với các chủng vaccine.

- Trình tự amino acid *Meq* suy diễn từ gen có 3 motif PPPP thuộc nhóm độc lực cao và gần gũi với các chủng độc lực cao của Trung Quốc

- Đây là nghiên cứu giải mã và thu nhận toàn bộ gen *Meq* đầu tiên tại Việt Nam.

2. Kiến nghị

- Mở rộng nghiên cứu tại các tỉnh miền Nam để đánh giá được toàn diện hơn về dịch tễ học phân tử virus gây bệnh Marek tại Việt Nam.

- Tiếp tục giải mã và phân tích thêm một số gen quan trọng khác của virus như gen pp38, vIL8, UL1, UL4...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Rosenwald A.S.,1970, Proceedings of 19th Western Poultry Disease Conference and 4th Poultry Health Symposium, University of California, Davis, ,23-25.
- [2]. OIE., 2016, Marek's Disease in OIE Terrestrial Manual, Accessed Jan 2016 <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Healthstandards/tahm/2.03.13>, *Marek dis.*
- [3]. Witter R.L.,1997, Increased virulence of Marek's disease virus field isolates, *Avian Dis*, 41:149–163.
- [4]. Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Rock D.L., Kutish G.F.J., 2000, The genome of a very virulent Marek's disease virus. *Virology* 74(17):7980-8.
- [5]. Võ Thị Trà An, Nguyễn Thị Kim Yến, 2012, So sánh hiệu quả phòng bệnh viêm phế quản trườn nhiễm của ba quy trình tiêm chủng vaccine trên gà. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, 21(5): 21-25.
- [6]. Kingham B., Zelnik., Vladimir., Kopáček., Majerciak J, Vladimir., Schmidt N.E., Carl., 2001, The genome of herpesvirus of turkeys: Comparative analysis with Marek's disease viruses, *The Journal of general virology*. 82: 1123-1135.
- [7]. Kumar P., Dong H., Lenihan D., Gaddamanugu S., Katneni U., Shaikh S., Hontz P.T., Reddy S.M., Peters W and Parcels M.S., 2012, Selection of a Recombinant Marek's Disease virus invivo through expression of the Marek's EcoRI-Q (Meq)–Encoded oncoprotein: Characterization of an rMd5-Based mutant expressing the Meq of Strain RB-1B, *Avian Diseases*, 56(2):328-340.
- [8]. Shamblin C.E., Greene N., Arumugaswami V., Dienglewicz R.L., Parcels M.S., 2004, Comparative analysis of Marek's disease virus(MDV) glycoprotein, lytic antigen pp38 and transformation antigen Meq-encoding genes: association of meq mutations with MDVs of high virulence, *Veterinary Microbiology*, 102: 147-167.
- [9]. Renz K.G., Cooke J., Clarke N., Cheetham B.F., Hussain Z., Islam F., Tannock G.A., Walkden-Brown S.W., 2012, Pathotyping of Australian isolates

of Marek's disease virus and association of pathogenicity with meq gene polymorphism. *Avian Pathology*, 41: 161-176.

[10]. Witter R.L., Calnek B.W., Buscaglia C., Gimeno I.M., Schat K.A., 2005, Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology, *Avian Pathology*, 34(2):75-90.

[11]. Hồ Đình Chúc, 1983, *Bước đầu xác định bệnh Marek ở Việt Nam*, Kết quả nghiên cứu khoa học và kỹ thuật thú y (1979 – 1984), NXB Nông Nghiệp, Hà Nội, 21 – 28.

[12]. Lê Văn Năm, 1996, *Xác định đặc điểm và tần số biến đổi khối u do bệnh Marek gây nên (1984 – 1990)*, Tuyển tập công trình nghiên cứu khoa học kỹ thuật gia cầm và động vật mới nhập, NXB Nông Nghiệp, Hà Nội, 581 – 585.

[13]. Phan Văn Lục, 2005, Mức độ nhiễm bệnh Marek và ứng dụng vacxin phòng bệnh cho gà giống tại trại thực nghiệm Liên Ninh, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi*, số 13, Viện Chăn Nuôi.

[14]. Nguyễn Bá Hiên, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Lê Văn Lãnh, Đỗ Ngọc Thúy, 2012, *Giáo trình bệnh truyền nhiễm thú y*, Nhà xuất bản Đại học Nông nghiệp, tr 422 – 432.

[15]. Lachheb J., Mastour H., Nsiri J., Kaboudi K., Choura I., Ammouna F., Amara A., Ghram A., 2020, Newly detected mutations in the *Meq* oncogene and molecular pathotyping of very virulent Marek's disease herpesvirus in Tunisia, *Arch Virol*, 165(11): 2589–2597.

[16]. Lê Văn Năm, 2003, *Bệnh Marek - Một mô hình khối u truyền nhiễm*. Nhà xuất bản Nông nghiệp...16. Rozins C., Day T., Greenhalgh S., 2019, Managing Marek's disease in the egg industry, *Epidemics*, 27, 52-58.

[17]. Wilson M.R., Southwick R.A., Pulaski J.T., Tieber V.L., Hong Y., Coussens P.M., 1994, Molecular analysis of the glycoprotein C-negative phenotype of attenuated Marek's disease virus. *Virology*, 199(2):393-402.

[18]. Lupiani B., Lee L.F., Cui X., Gimeno I., Anderson A., Morgan R.W., Reddy S.M., 2004, Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(32): 11815–11820.

- [19]. Chen X.B., Sondermeijer P.J., Velicer L.F., 1992, Identification of a unique Marek's disease virus gene which encodes a 38-kilo dalton phosphoprotein and is expressed in both lytically infected cells and latently infected lymphoblastoid tumor cells, *J Virol*, 66:85–94.
- [20]. Reddy S.M., Lupiani B., Gimeno I.M., Silva R.F., Lee L.F., Witter R.L., 2002, Rescue of a pathogenic Marek's disease virus with overlapping cosmid DNAs: use of a pp38 mutant to validate the technology for the study of gene function, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (10) 7054-7059.
- [21]. Zhang Y., Liu C., Yan F., Liu A., Cheng Y., Li Z., Sun G., H L.V., Wang X., 2017, Recombinant Gallid herpesvirus 2 with interrupted Meqgenes confers safe and efficacious protection against virulent field strains, *Vaccine*, 35(36): 4695-470.
- [22]. Gong Z., Zhang L., Wang J., Chen L., Shan H., Wang Z., Ma H., 2013, Isolation and analysis of a very virulent Marek's disease virus strain in China, *Virol J*, 10:155.
- [23]. Padhi A., Parcells M.S., 2016, Positive selection drives rapid evolution of the meq oncogene of Marek's disease virus. *PLoS ONE*.
- [24]. Sun G.R., Zhang Y.P., Lv H.C., Zhou L.Y., Cui H.Y., Gao Y.L., Qi X.L., Wang Y.Q., Li K., Gao L., Pan Q., Wang X.M., Liu C.J., 2017, A Chinese variant Marek's disease virus strain with divergence between virulence and vaccine resistance, *Viruses*, 9(4), 71.
- [25]. Ralapanawe S., Walkden-Brown S.W., Renz K.G., Islam A.F., 2016, Protection provided by Rispens CVI988 vaccine against Marek's disease virus isolates of different pathotypes and early prediction of vaccine take and MD outcome, *Avian Pathol*, 45:1, 26-37.
- [26]. Calnek B.W., Adldinger H.K., Kahn D.E., 1985, Feather follicle epithelium: A source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Diseases*, 14: 219-33.
- [27]. Murata S., Machida Y., Isezaki M., Maekawa N., Okagawa T., Konnai S., Ohashi K., 2020, Genetic characterization of a Marek's disease virus strain isolated in Japan, *Virol J*, 17:186.

- [28]. Lê Văn Năm ,1983, Phân lập vi rút ADN Herpes typ B nguyên nhân gây bệnh Marek ở gà. *Tuyển tập công trình nghiên cứu khoa học kỹ thuật gia cầm và động vật mới nhập*. NXB Nông Nghiệp, Hà Nội, 576 – 580.
- [29]. Nair V., Kung H.J., 2004, *Marek's Disease An Evolving Problem*, Elsevier Ltd.
- [30]. McPherson M.C., Delan M.E., 2016, Virus and host genomic, molecular, and cellular interactions during Marek's disease pathogenesis and oncogenesis, *Poultry Science* 00: 1–18.
- [31]. Purchase H.G., 1985, Clinical disease and its economic impact, *Martinus Nijhoff, Boston, MA*, pp. 17-24.
- [32]. Bùi Trần Anh Đào, 2013, Một số đặc điểm bệnh lý của bệnh Marek trên đàn gà Ri nuôi tại trại gà giống Liên Ninh – Thanh Trì – Hà Nội, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú Y XX* (5), 45 – 53.
- [33]. Davison F., Nair V., Kung H.J., 2004, Marek's disease virus oncogenicity: molecular mechanisms, *In: Marek's Disease, An Evolving Problem*, San Diego, pp 204.
- [34]. Kaleta E., Neumann U., 1977, Investigations on the mode of transmission of the herpesvirus of turkeys in vitro, *Avian Pathology*, 6: 33-39.
- [35]. Schat K., 1987, Marek's disease: a model for protection against herpesvirus-induced tumors, *Cancer Surv*, 6: 1-37.
- [36]. Schat K.A., Xing Z., 2000, Specific and nonspecific immune responses to Marek's disease virus, *Development and Comparative Immunology*, 24: 201-221.
- [37]. Shek W.R, Calnek B.W, Schat K.A., Chen C.L.H., 1983, Characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes: Discrimination between cytolytically and latently infected cells, *Journal of National Cancer Institute*, 70: 485-491.
- [38]. Witter R.L., Solomon J.J., Champion L.R., Nazerian K., 1971, Long term studies of Marek's disease infection in individual chickens. *Avian Disease*, 15: 346-365.

- [39]. Schierman L.W., Fletcher O. J., 1980, Genetic control of Marek's disease virus-induced transient paralysis, Association with the major histocompatibility complex. *Commission European Communities, Luxembourg*, pp. 429-442.
- [40]. Sharma J.M., Witter R.L., Burmester B.R., 1973, Pathogenesis of Marek's disease in old chickens: Lesion regression as the basis for age-related resistance, *Infection and Immunity*, 81: 715-724.
- [41]. Kozdrun W., Samorek-Salamonowicz E., Czekaj H., 2001, Polymerase chain reaction for the differentiation of Marek's disease virus strains, *The Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 45: 5-10.
- [42]. Calnek B.W., Witter R.L., 1997, Marek's disease, Diseases of poultry, 10th ed, *Iowa State University Press, Ames, Iowa*: 369-413.
- [43]. Ficken M.D., Nasisse M.P., Boggan G.D., Guy J.S., Wages D.P., Witter R.L., Rosenberger J.K., Nordgren R.M., 1991, Marek's disease virus with unusual tropism and virulence for ocular tissues: clinical findings, challenges studies and pathological features. *Avian pathology*, 20: 461-474.
- [44]. Davidson I., Borenshtain R., 2002, The feather tips of commercial chickens are a favorable source of DNA for the amplification of MDV and ALV-J, *Avian Pathology*, 31: 237-240.
- [45]. Benton WJ., Cover M.S., 1957, The increased incidence of visceral lymphomatosis in broiler and replacement birds, *Avian Disease*, 1: 320-327.
- [46]. Nguyễn Thị Lan, Ngô Thị Tuyết, Bùi Trần Anh Đào., 2014, Chẩn đoán bệnh Marek trên gà bằng phương pháp giải phẫu bệnh và hóa mô miễn dịch, *Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y XXI (6)*, 20 – 27.
- [47]. Sharma J.M., 1999, Introduction to poultry vaccines and immunity, *Advance in Veterinary Medicine*, 41: 481-494.
- [48]. Biggs P.M., Payne L.N., Milne B.S., Churchill A.E., Chubb R.C., Powell D.G., Harris A.H., 1970, Field trials with an Attenuated Cell Associated Vaccine for Marek's Disease, *Veterinary Record*, 87: 704-707.
- [49]. Okazaki W., Purchase H.G., Burmester B.R., 1970, Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkey, *Avian Disease*, 14: 413-429.

- [50]. Schat K.A., Calnek B.W., Fabricant J., 1982, Characterisation of two highly oncogenic strains of Marek's disease virus, *Avian Pathology*, 11: 593-605.
- [51]. Witter R.L., 1991, Attenuated revertant serotype 1 Marek's disease viruses: safety and protective efficacy, *Avian Disease*, 35: 877-891.
- [52]. Rispens B.H., VanVloten H.J., Mastebroek N., Maas H.J.L., Schat K. A., 1972b, Control of Marek's Disease in the Netherlands, II. Field Trials on Vaccination with an Avirulent Strain (CVI 988) of Marek's Disease Virus, *Avian Disease*, 16: 126-138.
- [53]. Jones D., Lee L., Liu J.L., Kung H.J., Tillotson J.K., 1992, Marek disease virus encodes a basic-leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 40-42.
- [54]. Tian M., Zhao Y., Lin Y., Zou N., Liu C., Liu P., Cao S., Wen X., Huang Y., 2011, Comparative analysis of oncogenic genes revealed unique evolutionary features of field Marek's disease virus prevalent in recent years in China, *Virol J*, 8:121.
- [55]. Liu J.L., Kung H.J., 2000, Marek's disease herpesvirus transforming protein MEQ: A C-Jun analogue with an alternative life style, *Virus Genes*, 21: 51-64.
- [56] N.Osterrieder]. Levy A.M., Izumiya Y., Brunovskis P., Xia L., Parcels M.S., Reddy S.M., Lee L., Chen H.W., Kung H.J, 2003, Characterization of the chromosomal binding sites and dimerization partners of the viral oncoprotein Meq in Marek's disease virus-transformed T cells, *J Virol*, 77:12841-12851.
- [57]. Osterrieder N., Kamil J.P, Schumacher D., Tischer B.K. , Trapp S., 2006, Marek's disease virus: from miasma to model, *Nature Reviews Microbiology*, 4: 283 – 294.
- [58]. Bradley G., Hayashi M., Lancz G., Tanaka M., Nonoyama M., 1989, Structure of the BamHI-H gene family: genes of putative importance in tumor induction, *J Virol*, 63: 2534 – 42.

- [59]. Silva R.F., Reddy S.M., Lupiani B., 2004, Expansion of a unique region in the Marek's disease virus genome occurs concomitantly with attenuation but is not sufficient to cause attenuation, *Journal of Virology*, 78: 733-740.
- [60]. H. Graham Purchase, 1976, Prevention of Marek's Disease: A Review, *Cancer research*, 36, 696-700.
- [61]. Alamargot J., 1987, Avian pathology of industrial farms in Ethiopia, *Institute of Agricultural Research IAR) proceedings, First National Livestock Improvement Conference, Addis Ababa, Ethiopia*, 114-117.
- [62]. Lobago F., Woldemeskel M., 2004, An outbreak of Marek's Disease in Chickens in central Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 36(4), 397 – 406.
- [63]. Puro K.U., Bhattacharjee U., Baruah S., Sen A., Das S., Ghatak, S., Doley S., Sanjukta R., Shakuntala I., 2018, Characterization of Marek's disease virus and phylogenetic analyses of meq gene from an outbreak in poultry in Meghalaya of Northeast India. *Virus Disease*, 29, 167–172.
- [64]. Prathibha Y., Sreedevi B., Kumar N.V., Srilatha C.H., 2018, Molecular characterization and phylogenetic analysis of oncogenes from virulent serotype-1 Marek's disease virus in India. *Acta Virol*, 62, 277–286.
- [65]. Yilmaz A., Turan N., Bayraktar E., Tali H.E., Aydin O., Umar S., Cakan B., Sadeyen J.R., Baigen T.S., Iqbal M., 2020, Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Marek's disease virus in Turkish layer chickens. *Br Poult Sci*, 61, 523–530.
- [66]. Yavuz, O., Erer H., 2017, Immunohistochemical and immunocytochemical findings associated with Marek's disease virus in naturally infected laying hens. *Biotech Histochem*, 92, 498–505.
- [67]. Phan Văn Lục, Nguyễn Ngọc Hùng, Nguyễn Thành Đồng, Đặng Thị Tám, Lê Thanh Ân, 2008, Mức độ nhiễm Marek và ứng dụng vaccine phòng bệnh cho đàn gà giống tại trại thực nghiệm Liên Ninh, Báo cáo khoa học viện Chăn Nuôi.
- [68]. Hồ Thị Việt Thu, Nguyễn Tâm Đồng, Vũ Ngọc Minh Thư, Huỳnh Ngọc Trang, 2021, Sự lưu hành của virus gây bệnh marek trên gà bản địa ở tỉnh đồng tháp , *KHKT Chăn nuôi*, số 263: 71 – 75.

- [69]. H.N., Năm T.Q., Ninh N.T.T., 2020 Tình hình nhiễm và sự lưu hành của virus serotype 1 thực địa trên đàn gà thuộc huyện Chợ Gạo, tỉnh Tiền Giang, *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*, 27(2), 5-11.
- [70]. Nicholas K.B., H.B Nicholas, 1999, GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments, *Distributed by authors*.
- [71]. Kumar S., Stecher G., Tamura K., 2016, MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 33:1870–1874.
- [72]. Wajid S.J., Katz M.E., Renz K.G., Walkden-Brown S.W., 2013, Prevalence of Marek's disease virus in different chicken populations in Iraq and indicative virulence based on sequence variation in the EcoRI-Q (*meq*) gene, *Avian Dis*, 57(2):562-8. (73cũ)
- [73]. Yu Z.H., Teng M., Luo J., Wang X.W., Ding K., Yu L.L., Su J.W., Chi J.Q., Zhao P., Hu B., Zhang G.P., Liu J.X., 2013, Molecular characteristics and evolutionary analysis of field Marek's disease virus prevalent in vaccinated chicken flocks in recent years in China. *Virus Genes*, 47:282-91.
- [74]. Jakowski R.M., Fredrickson T.N., Chomiak T.W., Luginbul R.E., 1970, Hematopoietic destruction in Marek's disease, *Avian Disease*, 14: 374-385.
- [75] Witter R.L., 1997, Increased virulence of Marek's disease virus field isolates, *Avian Dis*, 41:149–163.
- [76] Feng Z., Chang J.L., Yan P.Z., Zhi J.L., Liu A.L., Yan F-H, Feng C., Yun C., 2021, Comparative full-length sequence analysis of Marek's disease virus vaccine strain 814. *Arch Virol* 157:177–183.
- [77]. He L., Li J., Zhang Y., Luo J., Cao Y., Xue C., 2018, Phylogenetic and molecular epidemiological studies reveal evidence of recombination among Marek's disease viruses, *Virology*, 516: 202 – 209.