

ĐẶC ĐIỂM PHÂN LOẠI VÀ XÁC ĐỊNH GENOTYP *HISTOMONAS MELEAGRIDIS* GÂY BỆNH TRÊN GÀ Ở THÁI NGUYÊN VÀ BẮC GIANG BẰNG CHỈ THỊ GEN 18S RIBOSOME

*Trương Thị Tinh¹, Nguyễn Thị Kim Lan¹,
Nguyễn Thị Bích Nga², Lê Văn Năm³, Lê Thanh Hòa²*

TÓM TẮT

Histomonas meleagridis là tác nhân gây bệnh “đầu đen” (histomoniasis) ở gà, gây thiệt hại đáng kể cho ngành chăn nuôi. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng phương pháp phân tích chỉ thị phân tử chuỗi gen 18S ribosome để phân tích đặc điểm phân loại và xác định genotype của 4 chủng *Histomonas* sp (bao gồm: Hm-H1-TN-VN; Hm-H2-BG-VN; Hm-C1-TN-VN và Hm-C2-BG-VN), phân lập được từ các mẫu gan và manh tràng của gà bệnh ở Thái Nguyên và Bắc Giang. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của gen 18S ribosome của 4 chủng *Histomonas* sp phân lập được từ gà mắc bệnh histomoniasis ở 2 tỉnh trên cho thấy chúng đều thuộc về loài *H. meleagridis* do có sự tương đồng về nucleotide của gen 18S ribosome của 4 chủng so với 13 chủng *H. meleagridis* tham chiếu của Úc, Trung Quốc, Pháp đạt tới 99,3-100%, và khác hoàn toàn với các chủng ngoại loài (*Parahistomonas wenrichi*, *Tritrichomonas nonconforma*; và *Dientamoeba fragilis*). Như vậy, các chủng *H. meleagridis* của Việt Nam có vị trí phân loại thuộc chi *Histomonas*, họ *Dientamoebidae*, lớp *Tritrichomonadida*. Phân tích phả hệ dựa trên gen 18S ribosome đã khẳng định các chủng của Việt Nam cùng nhóm với các chủng *H. meleagridis* thuộc genotype I của Pháp; Đồng thời phân tích trong nghiên cứu này cũng xác định là tất cả các chủng *H. meleagridis* của Trung Quốc cũng thuộc genotype I. Nghiên cứu này cung cấp thêm một số đặc điểm về sinh học phân tử và phân loại/genotype của *H. meleagridis* gây bệnh histomoniasis trên gà có nguồn gốc tại Việt Nam.

Từ khóa: Gà, *Histomonas meleagridis*, Gen 18S ribosome, PCR, Phả hệ, Genotype.

Molecular characterization and genotyping of *Histomonas meleagridis* isolated from chicken in Thai Nguyen and Bac Giang provinces using 18S ribosome genetic marker

*Trương Thị Tinh, Nguyễn Thị Kim Lan,
Nguyễn Thị Bích Nga, Lê Văn Năm, Lê Thanh Hòa*

SUMMARY

Histomonas meleagridis is a flagellated protozoan pathogen causing “black head” disease (histomoniasis) in chicken with considerable loss for the animal husbandry sector. In this study, we analyzed 18S ribosomal sequences as genetic markers for taxonomic classification and genotyping of 4 *Histomonas* sp strains (such as: Hm-H1-TN-VN; Hm-H2-BG-VN; Hm-C1-TN-VN and Hm-C2-BG-VN) isolated from liver and cecum samples of the infected chickens collecting in Thai Nguyen and Bac Giang. The result from comparative analysis of 18S ribosomal nucleotide sequences showed that 4 *Histomonas* sp strains isolating from the histomoniasis chickens in Viet Nam, belonged to *H. meleagridis*. This identification based on the similarity level of 18S ribosomal sequence of 4 above strains and 13 reference strains of *H. meleagridis* from Australia, China, France reached 99.3 – 100%, and quite distinct in comparison with the

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

² Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH&CNVN

³ Hội Thú y Việt Nam

strains of interspecies (*Parahistomonas wenrichi*, *Tritrichomonas nonconforma* and *Dientamoeba fragilis*). Thus, the *H. meleagridis* strains isolating in Viet Nam were classified, they belonged to the *Histomonas* genus, *Dientamoebidae* family, *Tritrichomonadida* class. Phylogenetic analysis basing on 18S ribosomal sequences affirmed that the Vietnamese *H. meleagridis* strains placed in the same group with *H. meleagridis* of genotype I from France. In this study, genotype of the Chinese *H. meleagridis* strains was also determined as genotype I. This study provided some additional features on genetics and taxonomic classification/genotyping of *H. meleagridis* in chicken originating in Viet Nam.

Keywords: Chicken, *Histomonas meleagridis* 18S ribosome, PCR, Phylogenetic, Genotype.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh “đầu đen” (blackhead, histomoniasis) do một loại ký sinh trùng đơn bào có tên gọi *Histomonas meleagridis* Tyzzer, 1924, thuộc họ *Dientamoebidae/Protrichomonadinae* (bộ *Tritrichomonadida*, lớp *Tritrichomonadea*) gây ra ở gia cầm, chủ yếu là gà tây và gà nhà, thiệt hại rất lớn trên toàn thế giới, với bệnh chủ yếu thể hiện ở bề mặt gan có biến đổi giống hình “hoa cúc” và ở manh tràng (ruột thừa) có biến đổi đặc trưng do dịch thẩm xuất bị cô đặc tạo “kén” nên người ta còn gọi là bệnh kén ruột (McDougald, 2005; Lê Văn Năm, 2011). Trong manh tràng của gà bệnh, giun kim *Heterakis gallinarum* cũng cùng thực hiện vòng đời phát triển, nên *H. meleagridis* dính nhiễm vào trứng giun để được thải ra bên ngoài, tồn tại trong môi trường và được giun đất ăn phải; và tiếp tục gà lại ăn giun đất và tái nhiễm, tạo nên chu trình truyền lây khép kín gây bệnh trên gia cầm (McDougald, 2005). Đây là nguyên nhân sâu xa để bệnh “đầu đen” lưu cữu trong thời gian dài tại cơ sở chăn nuôi, và là lí do cơ bản để gà bị tái nhiễm và bệnh cứ lặp lại sau khi đã điều trị khỏi (Lê Văn Năm, 2011).

Nghiên cứu giám định và phân loại *H. meleagridis*, ngoài căn cứ triệu chứng lâm sàng và bệnh tích đặc trưng, hầu hết giám định sinh học phân tử đều dựa trên đặc điểm gen 18S ribosom (Mantini và cs., 2009). Gần đây, một số công trình định typ (genotyping) dựa trên phân tích chuỗi nucleotid vùng giao gen ITS1 (internal transcribed spacer 1) đã được áp dụng và có ba kiểu gen được mô tả: genotyp I và II phân lập

được liên kết với bệnh lâm sàng xuất phát từ *H. meleagridis*, trong khi đó, genotyp III có lẽ liên quan với *Parahistomonas wenrichi* (Van der Heijden và cs., 2006; Mantini và cs., 2009).

Ở Việt Nam, mặc dù bệnh xảy ra trên diện rộng trong cả nước (Lê Văn Năm, 2011; 2012; Nguyen và cs., 2015), nhưng đặc điểm gen học và genotyp của *H. meleagridis* còn được biết một cách rất hạn chế và gần đây, histomoniasis được mô tả một cách chi tiết hơn ở một số tỉnh phía Nam bao gồm cả giám định bằng sinh học phân tử (Nguyen và cs., 2015). Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy có nhiều typ và genotyp khác nhau (Van der Heijden và cs., 2006; Mantini và cs., 2009), và như vậy, câu hỏi được đặt ra là *H. meleagridis* gây bệnh đầu đen ở Việt Nam có đặc điểm gen học như thế nào và thuộc typ (genotyp) nào, có khác với *H. meleagridis* trên thế giới hay không.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu xác định gen học và xác định genotyp loài *H. meleagridis* từ các mẫu phân lập trên gà nhiễm bệnh ở Thái Nguyên và Bắc Giang tại Việt Nam, bằng sinh học phân tử phân tích so sánh gen 18S ribosom.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu

Các mẫu bệnh phẩm gan và manh tràng của gà nghi mắc bệnh ký sinh trùng đơn bào *Histomonas sp* được xác định về bệnh tích lâm sàng, hình thái và cung cấp nguồn mẫu để thẩm định bằng sinh học phân tử. Các mẫu bệnh phẩm được lấy tươi và bảo quản trong đá lạnh mang

về để tách DNA tổng số ngay hoặc đã bảo quản mẫu trong cồn 70° khi vận chuyển. Tổng số gồm 6 mẫu (3 mẫu gan và 3 mẫu manh tràng) phân lập trên gà tại tỉnh Thái Nguyên và tỉnh Bắc Giang năm 2014 và năm 2015. Mẫu gan, ký hiệu: 1. Hm-H1-TN-VN (Thái Nguyên); 2. Hm-H2-BG-VN (Bắc Giang); 3. Hm-H3-TN-VN (Thái Nguyên) và Mẫu manh tràng, ký hiệu: 4. Hm-C1-TN-VN (Thái Nguyên); 5. Hm-C2-BG-VN (Bắc Giang); 6. Hm-C3-TN-VN (Thái Nguyên).

2.2 Xử lý mẫu và tách chiết DNA tổng số

Mẫu gan: Mẫu được bảo quản trong cồn được loại bỏ bớt nồng độ cồn khi xử lý. Cắt một mẫu gan (~ 25 mg) ở vị trí bệnh tích điển hình (có dạng hình hoa cúc) (Hình 1), cắt nhỏ trên lam kính, chuyển mẫu vào ống Eppendorf, rửa nước 3 lần, ngâm nước qua đêm trong ngăn mát để ngày hôm sau tách DNA. **Mẫu manh tràng:** Mổ manh tràng, bỏ phân, rửa bằng nước cất khử trùng cho sạch phân, cạo lớp niêm mạc ăn sâu trong manh tràng để tách DNA.

Tách chiết DNA tổng số: Tất cả các mẫu bệnh phẩm được tách chiết DNA tổng số sử dụng bộ sinh phẩm QIAamp DNA Mini kit (hãng QIAGEN Inc, Mỹ), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm lược: Các mẫu được nghiền thành huyền dịch đồng nhất bằng bộ cối chày nhựa. Bổ sung 180 µl ATL + 20 µl Proteinase-K + 4 µl RNase-A. Ủ 55°C/2 giờ; thỉnh thoảng vortex mẫu (30 phút/1 lần). Sau đó bổ sung 200 µl AL; ủ 70°C/30 phút. Chuyển dịch các mẫu sang các cột lọc (lên màng lọc) của bộ kit đã cung cấp. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 1 phút. Bổ sung 500 µl AW1; ly tâm 13.000 v/phút trong 1 phút. Bỏ dịch bên dưới của cột lọc. Bổ sung 500 µl AW2; ly tâm 13.000 v/phút trong 1 phút (2 lần) để làm khô màng lọc. Bổ sung 100 µl AE; để ở nhiệt độ phòng (25°C/2 phút). Ly tâm thu DNA tổng số, bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

2.3 Thu nhận gen 18S ribosom bằng phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thực hiện với khuôn là DNA tổng số của các mẫu, sử dụng cặp mồi theo Grabensteiner và Hess (2006): HMF (5' GAAA-GCATCTATCAAGTGGAA 3') và HMR (5' GATCTTTTCAAATTAGCTTTAAA 3').

Thành phần phản ứng PCR gồm: 3 ml khuôn, 25 ml PCR Master Mix (Promega), 2 ml mỗi loại mồi (10 pmol/ml), 2 ml DMSO (dimethyl sulfoxide), 16 ml nước tinh khiết, trong tổng số 50 ml. Thực hiện phản ứng PCR trên máy PTC MJ-100 (MJ Research, Watertown, MA, USA), theo chu trình nhiệt: 1 chu kỳ ở 94°C/5 phút, 35 chu kỳ [94°C/1 phút, 50°C/30 giây, 72°C/1 phút], chu kỳ cuối ở 72°C/10 phút. Sản phẩm được tách ra khỏi agarose ("thời gel") bằng bộ sinh phẩm Accuprep Gel Purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc) và được giải trình tự trực tiếp để thu nhận các chuỗi cuối cùng của một phần gen 18S gồm 577 bp để phân tích đa chuỗi. Các chuỗi này được sử dụng để truy cập Ngân hàng gen sử dụng chương trình Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) và thu thập các chuỗi tương tự đã công bố để phân tích so sánh trình tự nucleotid xác định phân loại và định typ. Các chuỗi 18S thu được trong nghiên cứu này và từ Ngân hàng gen được liệt kê ở bảng 1.

2.4 Phân tích chuỗi gen và xử lý số liệu

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được giải trình tự trực tiếp. Chuỗi nucleotid được xử lý bằng ChromasLITE v2.01; truy cập Blast tại địa chỉ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) để thu nhận các chuỗi gen 18S ribosom tương đồng có trong Ngân hàng gen. So sánh đôi chiều trình tự nucleotid của gen 18S bằng chương trình GenDoc2.7 (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>); khảo sát về tương đồng nucleotid và mối quan hệ phả hệ sử dụng chương trình MEGA6.06, phương pháp 'kết nối liền kề' NJ (Neighbor-Joining NJ) với hệ số tin tưởng (bootstrap) 1000 lặp lại (Tamura và cs., 2013).

Bảng 1. Danh sách mẫu *Histomonas meleagridis* và các ký sinh trùng đơn bào, nguồn gốc mẫu và loài/genotyp được xác định tham gia nghiên cứu này

STT	Ký hiệu mẫu/Số đăng ký	Nguồn gốc (huyện/tỉnh/quốc gia)	Xác định thuộc loài	Xác định thuộc Genotyp
1	Hm-H1-TN-VN	Thái Nguyên	<i>H. meleagridis</i>	Nghiên cứu này
2	Hm-H2-BG-VN	Bắc Giang	<i>H. meleagridis</i>	Nghiên cứu này
3	Hm-C1-TN-VN	Thái Nguyên	<i>H. meleagridis</i>	Nghiên cứu này
4	Hm-C2-BG-VN	Bắc Giang	<i>H. meleagridis</i>	Nghiên cứu này
5	Hmel-TC6-AT-AJ920323	Australia	<i>H. meleagridis</i>	N/A
6	Hmel-YZ1-CN-JX963642	Trung Quốc	<i>H. meleagridis</i>	N/A
7	Hmel-YZ3-CN-JX963645	Trung Quốc	<i>H. meleagridis</i>	N/A
8	Hmel-YZ12-CN-JX963654	Trung Quốc	<i>H. meleagridis</i>	N/A
9	Hmel-YZ16-CN-JX963658	Trung Quốc	<i>H. meleagridis</i>	N/A
10	Hmel-YZ22-CN-JX963664	Trung Quốc	<i>H. meleagridis</i>	N/A
11	Hmel-YZ27-CN-JX963669	Trung Quốc	<i>H. meleagridis</i>	N/A
12	Hmel-Jia-CN-JQ277354	Trung Quốc	<i>H. meleagridis</i>	N/A
13	Hmel-AH1-CN-JX963644	Trung Quốc	<i>H. meleagridis</i>	N/A
14	Hmel-FR-AF293056	Pháp	<i>H. meleagridis</i>	N/A
15	Hmel-34-1-FR-EU647886	Pháp	<i>H. meleagridis</i>	Genotyp I
16	Hmel-34-2-FR-EU647887	Pháp	<i>H. meleagridis</i>	Genotyp I
17	Hmel-17-1-FR-EU647884	Pháp	<i>H. meleagridis</i>	Genotyp I
18	Pwen-23-6-FR-EU647888	Pháp	<i>P. wenrichi</i>	Genotyp III
19	Pwen-23-7-FR-EU647889	Pháp	<i>P. wenrichi</i>	Genotyp III
20	Tnon-R114-CU-AY055803	Cu Ba	<i>T. nonconforma</i>	N/A
21	Dfra-1085-UK-JQ677148	Anh	<i>D. fragilis</i>	N/A
22	Dfra-Syd-AU-AY730405	Australia	<i>D. fragilis</i>	N/A
23	Dfra-Df379-UK-JQ677147	Anh	<i>D. fragilis</i>	N/A
24	Hmel-2-1-32-FR-GtypeI-HG008083	Pháp	<i>H. meleagridis</i>	Genotyp I
25	Hmel-4-7-002-FR-GtypeI-HG008094	Pháp	<i>H. meleagridis</i>	Genotyp I
26	Hmel-6-2-33-FR-GtypeI-HG008093	Pháp	<i>H. meleagridis</i>	Genotyp I
27	Hmel-13-4-FR-GtypeI-HG008091	Pháp	<i>H. meleagridis</i>	Genotyp I
28	Hmel-10-7-1395-FR-GtypeI-HG008079	Pháp	<i>H. meleagridis</i>	Genotyp I
29	Hmel-10-4-35-FR-GtypeII-HG008096	Pháp	<i>H. meleagridis</i>	Genotyp II
30	Hmel-4-4-33-FR-GtypeII-HG008097	Pháp	<i>H. meleagridis</i>	Genotyp II

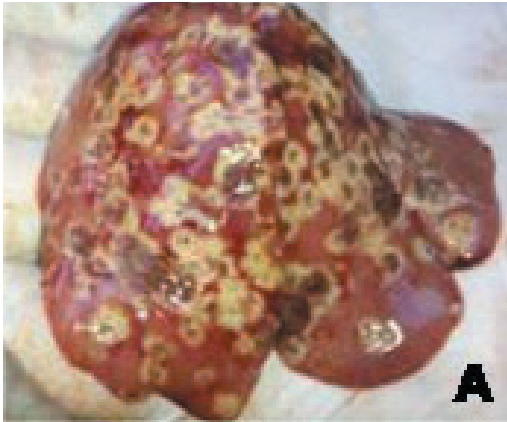
Ghi chú: Hmel: *Histomonas meleagridis*; Pwen: *Parahistomonas wenrichi*; Tnon: *Tritrichomonas nonconforma*; Dfra: *Dientamoeba fragilis*; Số đăng ký Ngân hàng gen ở cuối mỗi chuỗi; Số hiệu của mẫu (nếu có) được ghi ở giữa viết tắt tên loài và viết tắt tên quốc gia (ví dụ: Hmel-17-1-FR-EU647884/Hmel: *H. meleagridis*; 17-1: số hiệu mẫu; FR: Pháp; EU647884: số đăng ký Ngân hàng gen). Viết tắt tên quốc gia theo qui định tại: <https://countrycode.org/>. N/A: chưa xác định (not available).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

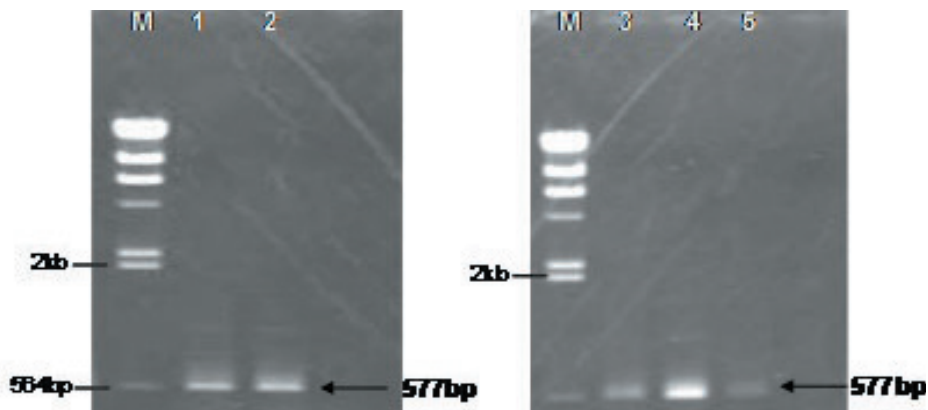
3.1. Mẫu bệnh phẩm từ gà bệnh và kết quả thực hiện phản ứng PCR

Mẫu bệnh phẩm thu từ gà bệnh gồm 2 loại, điển hình: i) mẫu gan có biến đổi, bề mặt loang lổ

trông giống như “hoa cúc” kích thước khác nhau, do bị xuất huyết và viêm loét hoại tử ở các mức độ khác nhau (hình 1A); và ii) mẫu manh tràng (ruột thừa) trạng thái cứng, bên trong đặc và dày, niêm mạc và khoang ruột bị cô đặc tạo thành hình dạng trông như một loại “kén” (hình 1B).



Hình 1. Gà bị bệnh “đầu đen” (Histomoniasis) ở Thái Nguyên và Bắc Giang
A. Gan bị biến đổi giống “hoa cúc”; B. Manh tràng (ruột thừa) của gà bệnh tạo “kén”



Hình 2. Sản phẩm PCR vùng DNA chứa gen một phần gen 18S ribosom của các mẫu nghiên cứu. M: chỉ thị DNA (Lamda cắt bằng HindIII);

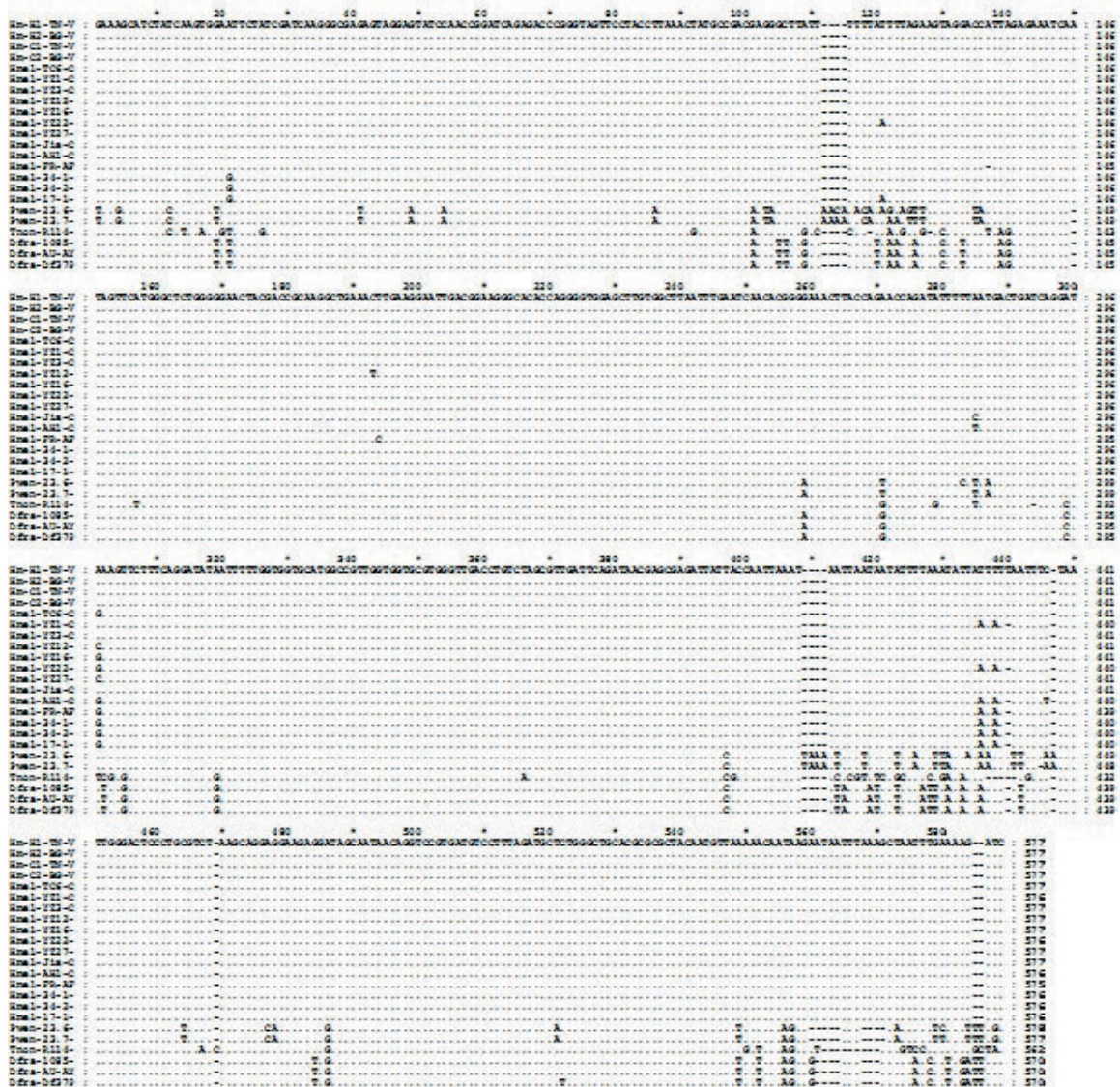
1-6: sản phẩm mẫu nghiên cứu, gồm: 1. Hm-H1-TN-VN (Thái Nguyên); 2. Hm-H2-BG-VN (Bắc Giang); 3. Hm-H3-TN-VN (Thái Nguyên); 4. Hm-C1-TN-VN (Thái Nguyên); 5. Hm-C2-BG-VN (Bắc Giang); 6. Hm-C3-TN-VN (Thái Nguyên). Mẫu số 3 (Hm-H3-TN-VN (Thái Nguyên) không có sản phẩm; mẫu số 6 (Hm-C3-TN-VN (Thái Nguyên) chất lượng thấp; không gửi đi giải trình tự

Từ DNA tổng số tách chiết từ các mẫu nghiên cứu, với thành phần và chu trình nhiệt PCR như đã giới thiệu ở trên, chúng tôi đã thu được kết quả PCR vùng gen 18S ribosom của 6 mẫu như sau: 1. Hm-H1-TN-VN (Thái Nguyên); 2. Hm-H2-

BG-VN (Bắc Giang); 3. Hm-H3-TN-VN (Thái Nguyên) (không có sản phẩm PCR); 4. Hm-C1-TN-VN (Thái Nguyên); 5. Hm-C2-BG-VN (Bắc Giang); 6. Hm-C3-TN-VN (Thái Nguyên). Mẫu số 3 Hm-H3-TN-VN (Thái Nguyên) không

có sản phẩm PCR và mẫu số 6 (Hm-C3-TN-VN (Thái Nguyên) chất lượng thấp; không gửi đi giải trình tự. Sau khi giải trình tự, chuỗi gen 18S ribosom của 4 mẫu có trình tự chính xác là 577 bp (hình 2).

Sau khi xử lý, trình tự chuỗi nucleotid có độ dài 577 bp của 4 mẫu *Histomonas* sp trên gà Thái Nguyên và Bắc Giang (gồm 2 chuỗi từ gan và 2 chuỗi từ manh tràng) đã được thu nhận (Bảng 1) và đưa vào phân tích tương đồng và xác lập phả hệ trong định loại và genotyp (hình 3).



Hình 3. Sắp xếp so sánh trình tự chuỗi nucleotid gen 18S ribosom của 23 chủng, bao gồm cả 4 chuỗi trong nghiên cứu này và 19 chuỗi thuộc các loài *H. meleagridis*, *Parahistomonas wenrichi*, *Tritrichomonas nonconforma* và *Dientamoeba fragilis* (liệt kê ở bảng 1).

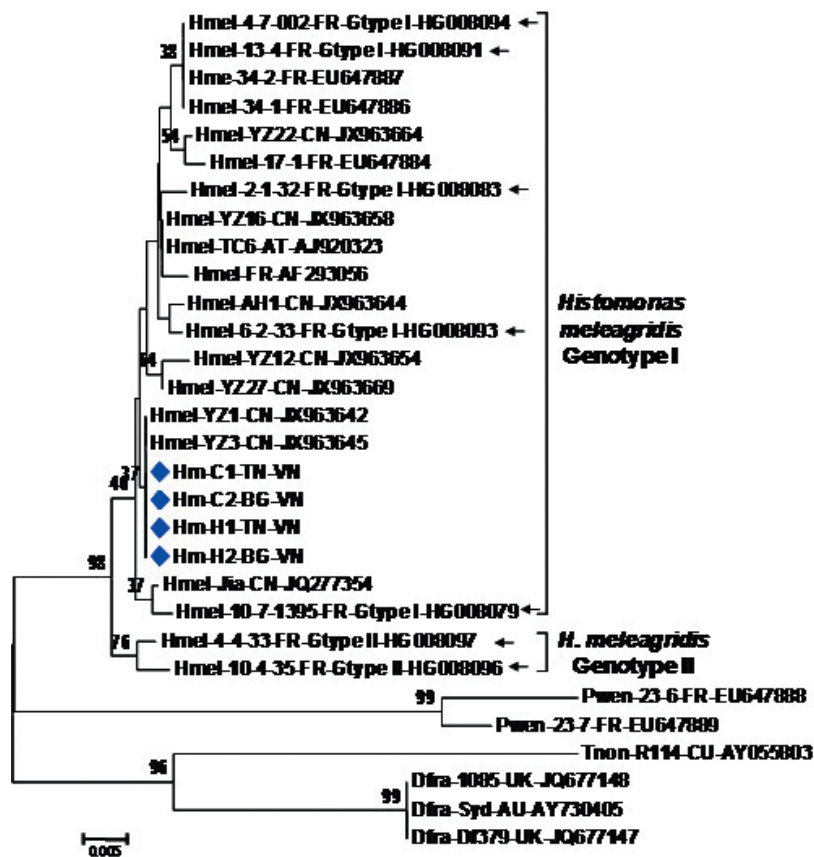
3.2. So sánh tương đồng thành phần nucleotid gen 18S ribosom các mẫu *Histomonas* sp. trên gà với các chủng nội và ngoại loài khác

Trình tự gen 18S ribosom của 4 chủng *Histomonas* sp trên gà của Việt Nam thu thập ở Thái Nguyên và Bắc Giang, được đưa vào sắp xếp đối

chiều với 13 chủng tham chiếu *H. meleagridis* của Australia, Trung Quốc và Pháp (Mantini và cs., 2009; Bilic và cs., 2014), và các chủng ngoại loài gồm 2 chủng thuộc loài *Parahistomonas wenrichi*, 1 chủng thuộc loài *Tritrichomonas nonconforma*; và 3 chủng thuộc loài *Dientamoeba fragilis* (liệt kê ở bảng 1), bằng chương trình GenDOC2.7 (hình 3).

Hình 3 cho thấy giữa 4 chủng *Histomonas* sp của Việt Nam và 13 chủng *H. meleagridis* bên ngoài của Trung Quốc, Australia và Pháp,

có trình tự gen 18S ribosom gần như đồng nhất (đạt 99,3-100%). Chỉ có một vài sai khác ở một số vị trí giữa các chủng thuộc loài *H. meleagridis*, trong khi đó, có rất nhiều sai khác nucleotid so với các chủng ngoại loài *P. wenrichi*, *T. nonconforma* và *D. fragilis*, thậm chí có sự bớt đi hay thêm vào 3 nucleotid giữa các chủng của *H. meleagridis* với các chủng của các loài nói trên (hình 3). Như vậy, các chủng *Histomonas* sp của Việt Nam phân lập từ gà bệnh ở Thái Nguyên và Bắc Giang được xác định chính xác thuộc về loài *H. meleagridis*, thông kê ở bảng 1.



Hình 4. Cây phả hệ xác định mối quan hệ về loài và genotyp giữa các chủng *H. meleagridis* và các loài khác dựa trên trình tự nucleotid của gen 18S ribosom, xây dựng bằng chương trình MEGA6.06, sử dụng phương pháp kết nối liên kề NJ (Neighbor-joining), với hệ số tin cậy bootstrap là 1000 lần lặp lại (Tamura và cs., 2013).

Ghi chú: Ký hiệu mẫu/chủng tham khảo tại bảng 1. Các chủng của Việt Nam đánh dấu hình chóp nhọn ở đầu mỗi chuỗi và các chủng tham chiếu biểu thị genotype I và II được chỉ dẫn bằng mũi tên ở cuối chuỗi. Viết tắt tên quốc gia theo qui định tại: <https://countrycode.org/>. Vạch ngang ở cuối hình (0.005) biểu thị sai khác nucleotide (5/1000 nucleotide) theo khoảng cách di truyền ở mỗi nhánh.

3.3. Xác lập phả hệ về mối quan hệ về loài và xác định genotyp giữa các chủng *H. meleagridis* của Việt Nam và thế giới

Mối quan hệ về loài và xác định genotyp của các chủng *H. meleagridis* Việt Nam và thế giới được xem xét thông qua việc xây dựng cây phả hệ dựa trên chuỗi gen 18S ribosom của 30 chủng ở bảng 1, trong đó *H. meleagridis* gồm có 4 chủng của Việt Nam (Thái Nguyên, Bắc Giang), 8 chủng của Trung Quốc, 11 chủng của Pháp (gồm Genotyp I và II), một chủng của Australia; và 6 chủng thuộc các loài *P. wenrichi*, *T. nonconforma* và *D. fragilis* (hình 4).

Cây phả hệ ở Hình 4 cho thấy nhóm của 24 chủng *H. meleagridis* được phân vào 2 phân nhóm riêng biệt, thể hiện gồm phân nhóm của các chủng thuộc Genotyp I, gồm 22 chủng, trong đó có 4 chủng của Việt Nam: 1. Hm-H1-TN-VN (Thái Nguyên); 2. Hm-H2-BG-VN (Bắc Giang); 3. Hm-C1-TN-VN (Thái Nguyên) và 4. Hm-C2-BG-VN (Bắc Giang)), cùng với 5 chủng tham chiếu của Pháp (HG008094; HG008091; HG008083; HG008093; HG008079) và phân nhóm của Genotyp II (gồm 2 chủng của Pháp, HG008097 và HG008096). Các chủng thuộc loài *H. meleagridis* còn lại của Pháp (4 chủng), một chủng của Australia và của Trung Quốc (8 chủng) cũng được xác định thuộc Genotyp I do sắp xếp chung phân nhóm với các chủng tham chiếu đã chỉ dẫn (Mantini và cs., 2009). Ba nhóm khác tách biệt khỏi nhóm của *H. meleagridis*, gồm nhóm của loài *P. wenrichi* gồm 2 chủng; nhóm của loài *T. nonconforma* gồm một chủng và nhóm của loài *D. fragilis* gồm 3 chủng (hình 4).

Như vậy, phân tích đồng nhất chuỗi gen và phân tích phả hệ đều xác định 4 chủng *Histomonas* sp được xác định chính xác thuộc loài *Histomonas meleagridis* (Eukaryota; Parabasalia; Tritrichomonadida; Dientamoebidae; *Histomonas*) và định typ chính xác thuộc Genotyp I.

IV. KẾT LUẬN

Bốn chủng *Histomonas* sp thu nhận từ các mẫu bệnh phẩm gan và manh tràng trên gà bị bệnh “đầu đen” ở Thái Nguyên và Bắc Giang có trình tự nucleotid gen 18S ribosom đồng nhất cao (99,3-100%) và phân tích phả hệ nằm

cùng phân nhóm thuộc Genotyp I với các chủng thuộc loài *H. meleagridis* tham chiếu của quốc tế. Như vậy, các chủng *Histomonas* sp của Việt Nam được xác định thuộc loài *Histomonas meleagridis*, genotyp I, có vị trí phân loại thuộc chi *Histomonas*, họ Dientamoebidae, lớp Tritrichomonadida. Nghiên cứu này cung cấp thêm một số đặc điểm về gen học và phân loại của *H. meleagridis* gây bệnh trên gà có nguồn gốc tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bilic I, Jaskulska B, Souillard R, Liebhart D and Hess M. Multi-locus typing of *Histomoniasis meleagridis* isolates demonstrates the existence of two different genotypes. *PLoS ONE* 9:e92438.
2. Grabensteiner E, Hess M (2006). PCR for the identification and differentiation of *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis* spp. *Vet Parasitol* 142(3-4):223-30.
3. Lê Văn Năm (2011). Bệnh đầu đen (histomonosis) ở gà và gà tây. *Tạp chí Khoa học và Kỹ thuật thú y* 32:88-91.
4. Lê Văn Năm (2012). Bệnh gia cầm Việt Nam. Nhà xuất bản Hà Nội.
5. McDougald LR (2005). Blackhead disease (histomoniasis) in poultry: a critical review. *Avian Dis* 49: 462-476.
6. Nguyen DT, Bilic I, Jaskulska B, Hess M, Le DQ, Hua NLL, Huynh VV, Nguyen ST, Hung VK (2015). Prevalence and genetic characterization of *Histomonas meleagridis* in chickens in Vietnam. *Avian Dis* 59(2):309-314.
7. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013). MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30: 2725-2729.
8. Van der Heijden HMJF, Landman WJM, Greve S, Peek R (2006). Genotyping of *Histomonas meleagridis* isolates based on internal transcribed spacer-1 sequences. *Avian Pathol* 35:330-334.

Nhận ngày 15-11-2015

Phản biện ngày 5-1-2016