

# Nghiên cứu khoa học

## KẾT QUẢ PHÂN TÍCH BỘ GEN CHỦNG VIRUS GÂY BỆNH THIẾU MÁU TRUYỀN NHIỄM Ở GÀ (CHICKEN INFECTIOUS ANEMIA VIRUS-CIAV) PHÁT HIỆN Ở MIỀN BẮC, VIỆT NAM

*Nguyễn Văn Giáp, Huỳnh Thị Mỹ Lệ  
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

### TÓM TẮT

Bộ gen của virus gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm bao gồm vùng mã hóa và vùng không mã hóa protein. Cho đến nay, chưa có công bố nào phân tích đặc điểm bộ gen của CIAV thuộc genogroup II và III phát hiện ở miền Bắc. Kết quả phân tích cho thấy 3 chủng virus mang đầy đủ cấu trúc bộ gen điển hình của CIAV, bao gồm đầu 5' không mã hóa protein, theo sau bởi 3 gen mã hóa protein cùng chiều, lồng nhau, theo thứ tự ORF2-ORF3-ORF1. Ba chủng này có đặc điểm biến đổi nucleotide giống với các chủng CIAV trên thế giới, trong đó vùng gen mã hóa protein VP1 có nhiều biến đổi nhất so với 2 gen còn lại. Trình tự amino acid đặc trưng genogroup là  ${}_{75}V_{97}M_{139}K_{144}E$  hoặc  ${}_{75}I_{97}L_{139}Q_{144}Q$  đã được phát hiện ở 3 chủng virus thực địa. Đáng chú ý không có chủng CIAV nào mang biến đổi  ${}_{75}I_{89}T_{125}L_{141}L_{144}E$  của virus có độc lực thấp.

*Từ khóa:* Virus gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm, đặc điểm di truyền, miền Bắc Việt Nam.

### Genetic characterizations of genome of chicken infectious anemia viruses (CIAV) in the North, Viet Nam

*Nguyen Van Giap, Huynh Thi My Le*

### SUMMARY

The genome of chicken infectious anemia virus (CIAV) contains non-protein coding and protein coding regions. Up to date, there is no available study on the genome characterization of CIAV in Viet Nam. This study aimed at genetic characterization of the field CIAV strains belonging to genogroup II and genogroup III detected in the North, Viet Nam. The studied result revealed that all of three field strains exhibited typical genetic structure of CIAV, including the 5' promoter region which was followed by partial overlapping, unisense open reading frames in the order of ORF2- ORF3- ORF1. Three field CIAV strains in this study displayed typical genetic variations of CIAV in the worldwide. Of which, the gene encoding capsid protein was the most variable compared to the others two genes. The signature motif of either  ${}_{75}V_{97}M_{139}K_{144}E$  or  ${}_{75}I_{97}L_{139}Q_{144}Q$  was detected in these field strains. Noteworthy, the sequence pattern of attenuation or lower pathogenicity ( ${}_{75}I_{89}T_{125}L_{141}L_{144}E$ ) was not observed in the three field strains.

*Keywords:* Chicken infectious anemia virus, genetic characterization, the North, Viet Nam.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhóm virus gây ức chế miễn dịch, trong đó có virus gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm (chicken infectious anemia virus - CIAV), là một trong những nhóm gây ảnh hưởng lớn về kinh tế cho ngành chăn nuôi gà trên toàn thế giới (Balamurugan và Kataria, 2006). CIAV thuộc giống *Gyrovirus*, họ *Anelloviridae* (Rosario và cs., 2017). Vật chất di truyền của CIAV là sợi ADN đơn, dạng vòng, dài khoảng 2,3 kb. Bộ gen CIAV có 3 khung đọc mở (ORF) lồng một phần vào nhau, theo thứ tự ORF2-ORF3-ORF1. Trong đó ORF2, ORF3 và ORF1 mã hóa lần lượt cho 3 protein VP2 (24 kDa), VP3 (14 kDa) và VP1 (52 kDa) (Noteborn và cs., 1991). Bộ gen của CIAV có tính bảo thủ tương đối cao nên sự khác biệt giữa các chủng virus là thấp. Dựa vào trình tự gen mã hóa capsid protein, có 3 genogroup I, II và III của CIAV đã được công nhận rộng rãi (Ducatez và cs., 2006). Genogroup II và III của CIAV chiếm đa số, trong khi đó genogroup I chỉ có 2 trình tự gen thu thập được ở Australia.

CIAV và bệnh thiếu máu truyền nhiễm ở gà mới được quan tâm nghiên cứu ở Việt Nam trong vòng 10 năm trở lại đây. Dù còn ít nghiên cứu, nhưng một số công bố đã chứng minh CIAV lưu hành phổ biến ở gà mọi lứa tuổi thuộc về genogroup II và III (Van Dong và cs., 2019; Huynh và cs., 2020), và có tính độc (Đào Đoàn Trang và cs., 2019). Các công bố về CIAV ở Việt Nam hiện tập trung phân tích đặc điểm sinh học phân tử của vùng gen mã hóa protein, chưa có kết quả phân tích bộ gen virus. Trong khi đó vùng 5' không mã hóa của CIAV chứa các trình tự quan trọng cho sự nhân lên của virus (Noteborn và cs., 1991) và đột biến gen ở vùng này có thể liên quan tới độc lực (Meehan và cs., 1997). Bài viết này nhằm cung cấp thông tin đầy đủ về đặc điểm sinh học phân tử bộ gen hoàn chỉnh của CIAV phát hiện được ở gà mắc bệnh thiếu máu truyền nhiễm nuôi tại miền Bắc.

## II. NGUYÊN LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu

- Bộ gen của 3 chủng CIAV (MH536104-MH536106) được giải trình tự trong nghiên cứu trước đây (Huynh và cs., 2020). Mẫu bệnh phẩm dương tính với CIAV được thu thập năm 2017 ở Vĩnh Phúc và Quảng Ninh trong quá trình thực hiện đề tài “Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng và dịch tễ học phân tử của virus gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm gà lưu hành ở miền Bắc Việt Nam” do dự án Việt – Bỉ tại Học viện NNVN tài trợ giai đoạn 2017-2018.

- Trình tự bộ gen chủng Cux-1 (mã số M81223, là một trong những chủng CIAV tham chiếu đã được nghiên cứu đầy đủ và sớm nhất) và 176 trình tự genome hoàn chỉnh (có trong GenBank, truy cập tháng 4 năm 2020).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phương pháp chú giải cấu trúc gen

Bộ gen hoàn chỉnh của 3 chủng CIAV trong nghiên cứu này được chú giải cấu trúc dựa vào thông tin đã biết của chủng tham chiếu (Cux-1, mã số M81223), sử dụng phần mềm GATU. Biểu diễn trình tự nucleotide bằng chương trình BioEdit v7.1.3.0.

#### 2.2.2. Phương pháp phân tích đặc điểm di truyền

Sự biến động mức tương đồng dọc theo chiều dài bộ gen của CIAV được thực hiện bằng phần mềm SimPlot (Lole và cs., 1999) với các tham số mặc định. Ngoài ra, những thay đổi của gen VP1 được đánh giá thông qua 12 vị trí amino acid đóng vai trò trong quá trình nhân lên và độc lực của virus (Renshaw và cs., 1996; Yamaguchi và cs., 2001; Todd và cs., 2002).

#### 2.2.3. Phương pháp xây dựng cây phát sinh chủng loại

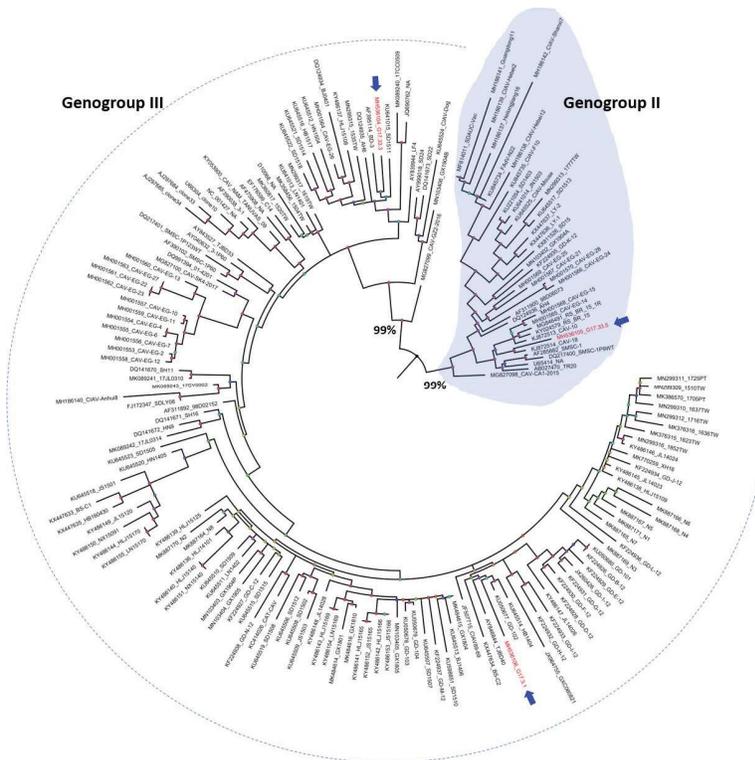
Trình tự bộ gen của các chủng CIAV được căn chỉnh (alignment) bằng phần mềm MAFFT với tham số mặc định. Chương trình IQ-TREE dùng để xác định mối liên hệ di truyền dựa vào trình tự nucleotide của bộ gen CIAV. Mô hình biến

đôi nucleotide phù hợp nhất được chọn tự động bằng câu lệnh ‘-m TESTNEW’. Mức tin cậy ở các nhánh cây phát sinh chủng loại được ước tính bằng phương pháp ultrafast bootstrap, với số lần lặp lại là 1000 lần. Gốc của cây phát sinh chủng loại được suy diễn bằng phương pháp midpoint, tích hợp trong chương trình FigTree v1.4.4.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Phân loại CIAV dựa vào trình tự nucleotide của bộ gen

Cây phát sinh chủng loại đã được xây dựng từ trình tự nucleotide hoàn chỉnh để xác định genogroup của 3 chủng CIAV trong nghiên cứu này (hình 1).



**Hình 1. Cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự nucleotide bộ gen**

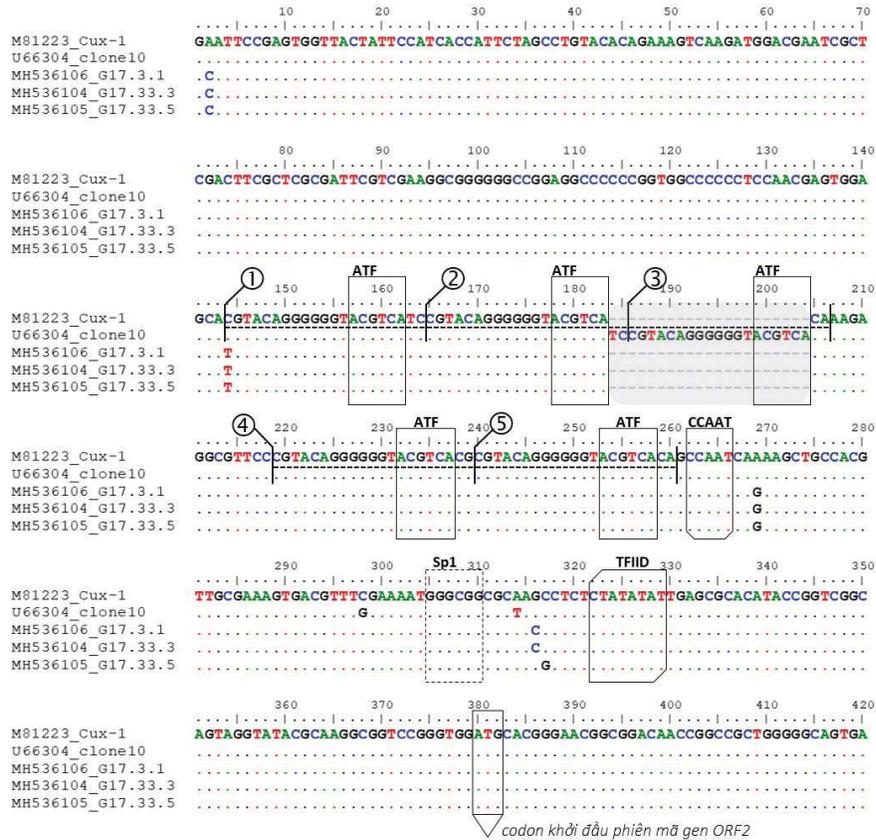
Ghi chú: mũi tên chỉ vị trí 3 chủng CIAV ở miền Bắc được giải mã bộ gen. Để dễ quan sát, giá trị bootstrap chỉ được hiển thị cho nhánh chính của cây phát sinh chủng loại.

Kết quả cho biết CIAV gồm genogroup II và III; có 2 chủng thuộc genogroup III và 1 chủng thuộc genogroup II (mũi tên, hình 1), phù hợp với công bố trước đó về phân loại CIAV lưu hành ở miền Bắc (Van Dong và cs., 2019; Huynh và cs., 2020).

#### 3.2. Cấu trúc bộ gen của CIAV

Bộ gen của 3 chủng CIAV (MH536104-

MH536106) đều có kích thước 2298 nucleotide. Kích thước bộ gen của CIAV thu được trong nghiên cứu này tương đương với đa số các chủng CIAV trên thế giới (161/176 chủng công bố trên GenBank dài 2298 nucleotide). Cấu trúc bộ gen 3 chủng CIAV ở miền Bắc lần lượt được trình bày ở các phần dưới đây. Hình 2 trình bày cấu trúc đầu 5' không mã hóa protein của CIAV.



**Hình 2. Cấu trúc vùng khởi đầu phiên mã của CIAV ở miền Bắc**

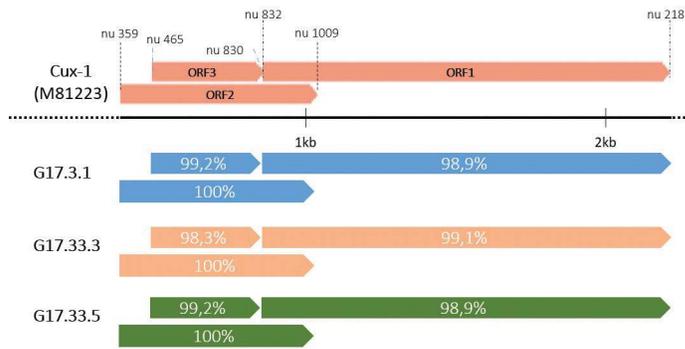
Ghi chú: ① - ⑤ trình tự nucleotide lặp (direct repeat); ATF: trình tự bám yếu tố khởi động phiên mã; CCAAT: trình tự tăng cường tính bám của yếu tố khởi đầu phiên mã; Sp1: trình tự giàu GC bám protein Sp1; TFIID: trình tự bám yếu tố khởi động phiên mã II D.

So với 2 chủng tham chiếu, 3/3 chủng CIAV của Việt Nam đều có 4 vùng trình tự lặp lại (ký hiệu 1, 2, 4, 5, hình 2) và giống với chủng virus có độc lực (Cux-1, mã số M81223). Vùng 5' này còn chứa các trình tự bám cho yếu tố khởi động quá trình phiên mã, ví dụ như ATF, CCAAT, Sp1 và TFIID. Như vậy, 3 chủng đều mang cấu trúc gen đặc trưng ở vùng 5' của CIAV (Noteborn và cs., 1991). So sánh với chủng CIAV clone 10 (U66304) đã được chứng minh có độc lực thấp (Meehan và cs., 1997), 3/3 chủng CIAV trong nghiên cứu này và chủng Cux-1 độc lực cao đều không có đột biến thêm 21 nucleotide (đánh dấu màu xám,

hình 2) nằm giữa trình tự lặp số 2 và số 4.

Virus thuộc họ *Anelloviridae* có đặc điểm (i) gen mã hóa protein lồng nhau và cùng chiều, (ii) không có cấu trúc stem-loop với 9 nucleotide đặc trưng. Cho đến nay, cấu trúc vùng mã hóa protein trong bộ gen của CIAV đã được làm rõ (Noteborn và cs., 1992). Dựa vào chủng CIAV tham chiếu (M81223), đã xác định cấu trúc vùng gen mã hóa protein của 3 chủng CIAV (hình 3).

Có thể thấy vùng mã hóa protein của 3 chủng CIAV gồm 3 gen cùng chiều, lồng nhau, theo thứ tự ORF2-ORF3-ORF1. Về mức tương



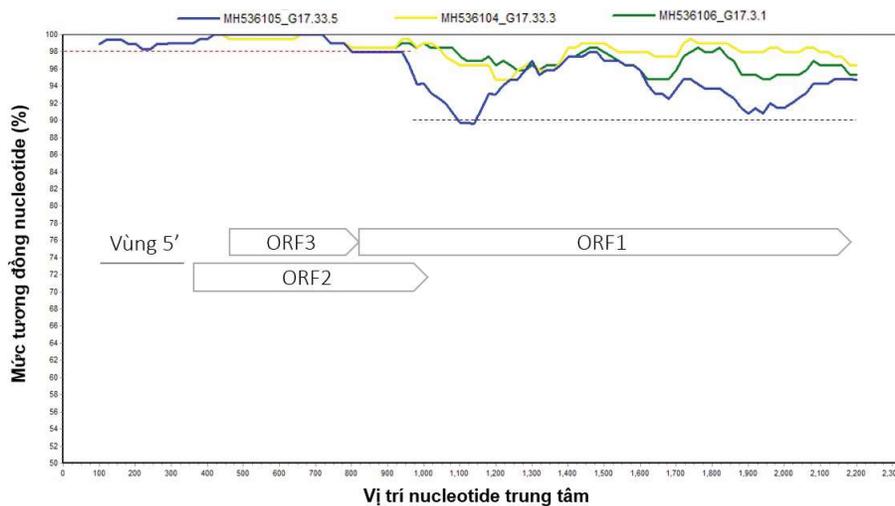
**Hình 3. Cấu trúc vùng mã hóa protein của CIAV ở miền Bắc**

Ghi chú: giá trị (%) biểu thị mức tương đồng nucleotide giữa các gen của 3 chủng CIAV ở miền Bắc với chủng virus tham chiếu M81223. Chiều của mũi tên biểu thị hướng của quá trình dịch mã.

đồng, gen ORF2 tương đồng 100%, gen ORF3 tương đồng 98,3% - 99,2% và gen ORF1 tương đồng từ 98,9% - 99,1% so với chủng CIAV tham chiếu. Hai kết quả phân tích (hình 2 và hình 3)

cho thấy 3 chủng virus ở miền Bắc mang đầy đủ cấu trúc gen điển hình của CIAV.

**3.3. Mức tương đồng trình tự nucleotide của bộ gen virus**



**Hình 4. Biến động về mức tương đồng dọc chiều dài bộ gen của CIAV**

Ghi chú: bộ gen của 3 chủng CIAV lần lượt được so sánh với chủng virus tham chiếu Cux-1 (M81223). Đường nét đứt biểu thị mức tương đồng trình tự nucleotide ở mức 90%.

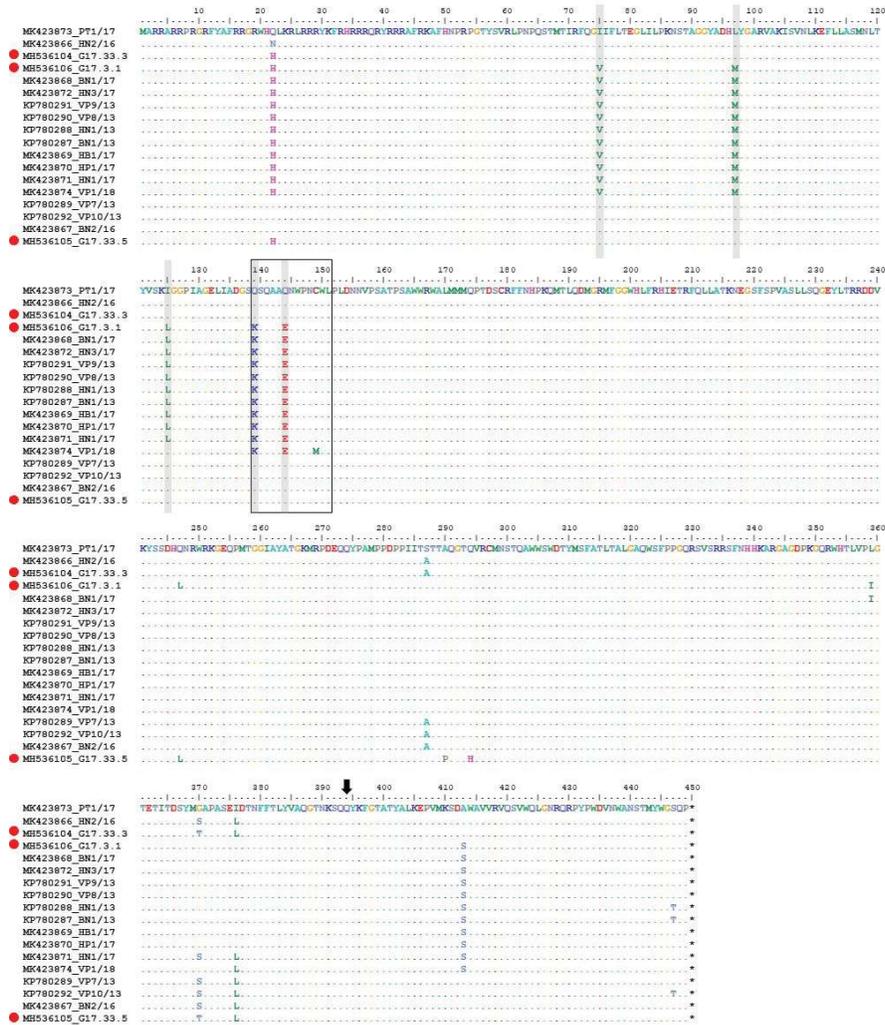
Hình 4 trình bày kết quả so sánh mức tương đồng dọc theo chiều dài bộ gen của 3 chủng CIAV ở miền Bắc với chủng tham chiếu Cux-1. Kết quả cho biết 3 chủng CIAV ở miền

Bắc có trình tự nucleotide vùng 5' và vùng gen ORF2-ORF3 đều có mức tương đồng cao ( $\geq 98\%$ , đường nét đứt màu đỏ) so với chủng Cux-1. Trong khi đó, vùng gen ORF1 (mã hóa

capsid protein) được xác định có nhiều biến động và có mức tương đồng dao động trong khoảng 90%- 98% (vùng giới hạn bởi đường nét đứt màu đỏ và màu đen, hình 4). Đặc điểm trên cho phép khẳng định 3 chủng CIAV ở miền Bắc có biến đổi nucleotide giống với các chủng CIAV trên thế giới: vùng gen mã hóa protein VP1 có nhiều biến đổi nhất so với 2 gen còn lại.

**3.4. Đặc điểm di truyền của gen mã hóa capsid protein**

Đối với CIAV, sự biến đổi về trình tự nucleotide thường dao động trong phạm vi 5% và tập trung ở vùng gen mã hóa cho protein VP1 (Ducatez và cs., 2006). Từ đó, nghiên cứu tiếp tục phân tích đặc điểm di truyền gen mã hóa capsid protein 18 chủng CIAV của Việt Nam có trong GenBank (hình 5).



**Hình 5. So sánh trình tự amino acid protein VP1 của CIAV ở miền Bắc**

Ghi chú: các vị trí amino acid đặc trưng theo nhóm di truyền được đánh dấu màu xám. Vùng biến đổi (amino acid 139-151) được đóng khung. Dấu “.” biểu thị các amino acid giống với trình tự PT1/17. Dấu • đánh dấu vị trí 3 chủng CIAV được giải trình tự. Mũi tên → chỉ vị trí amino acid 394.

Phân tích trình tự amino acid suy diễn của 18 chủng CIAV ở miền Bắc cho thấy có 16 vị trí có đột biến điểm, trong đó có 6 vị trí thuộc trình tự đặc hiệu nhóm (amino acid 75, 97, 139, 144) (Ducatez và cs., 2008) và nằm trong vùng có nhiều biến đổi (Renshaw và cs., 1996) (đóng khung, hình 5). Nếu dựa vào trình tự amino acid của capsid protein, 18 chủng CIAV của Việt Nam được chia thành 2 nhóm:  $_{75}V_{97}M_{139}K_{144}E/K/N$  (genogroup III) và  $_{75}I_{97}L_{139}Q_{144}Q$  (genogroup II) (Ducatez và cs., 2008). Nghiên cứu của Van Dong và cs. (2019) đã phát hiện ra

9 vị trí amino acid ( $_{22}H/N/Q$ ,  $_{75}V/I$ ,  $_{97}M/L$ ,  $_{125}I/L$ ,  $_{139}K/Q$ ,  $_{144}E/Q$ ,  $_{287}S/A$ ,  $_{370}G/S$  và  $_{376}L/I$ ) khác biệt khi so sánh các chủng của nghiên cứu với các chủng từ các khu vực. Tất cả 18 chủng CIAV của Việt Nam có amino acid T và Q tại hai vị trí 89 và 394 trên VP1.

Một số nghiên cứu trước đây cho biết vùng biến đổi có ảnh hưởng tới độc lực của CIAV (Renshaw và cs., 1996; Yamaguchi và cs., 2001). Trên cơ sở đó, nghiên cứu này tập trung phân tích một số vị trí amino acid được xem có ảnh hưởng đến khả năng gây độc của CIAV (bảng 1).

**Bảng 1. Trình tự amino acid của VP1 liên quan đến độc lực của CIAV**

Chủng đại diện	Số lượng chủng	Vị trí ở protein VP1					
		75	89	125	141	144	394
MH536105_G17.33.3	7	I	T	I	Q	Q	Q
MH536106_G17.3.1	10	V	T	L	Q	E	Q
MK423874_VP1/18	1	V	T	I	Q	E	Q

Ở cấp độ amino acid, kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy 18 chủng CIAV của Việt Nam (trong đó có 3 chủng được giải mã bộ gen trong nghiên cứu này) không có biến đổi liên quan đến kiểu hình của chủng CIAV có độc lực thấp:  $_{75}I_{89}T_{125}L_{141}L_{144}E$  (Todd và cs., 2002). Bằng thực nghiệm, thay thế amino acid tại vị trí 394 từ glutamin (Q) thành histidin (H) có thể làm giảm độc lực của CIAV (Yamaguchi và cs., 2001). Trong khi đó, kết quả ở bảng 1 cho biết 18/18 chủng CIAV ở miền Bắc mã hóa glutamin (Q) ở amino acid 394. Điều này góp phần khẳng định tính độc của các chủng CIAV đang lưu hành.

#### IV. KẾT LUẬN

Ba chủng virus ở miền Bắc mang đầy đủ cấu trúc bộ gen điển hình của CIAV, bao gồm đầu 5' không mã hóa protein, theo sau bởi 3 gen mã hóa protein cùng chiều, lồng nhau, theo thứ tự ORF2-ORF3-ORF1. Ba chủng virus có đặc điểm biến đổi nucleotide giống các chủng CIAV trên thế giới với vùng gen mã hóa protein VP1 biến đổi nhất so với 2 gen còn lại. Trình tự amino

acid đặc trưng genogroup là  $_{75}V_{97}M_{139}K_{144}E$  hoặc  $_{75}I_{97}L_{139}Q_{144}Q$  đã được phát hiện ở 3 chủng virus thực địa. Không chủng CIAV nào có biến đổi liên quan đến kiểu hình của virus có độc lực thấp là  $_{75}I_{89}T_{125}L_{141}L_{144}E$ .

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Balamurugan V. & Kataria, J. M., 2006. Economically important non-oncogenic immunosuppressive viral diseases of chicken- current status. *Vet Res Commun*, 30(5): 541-66.
- Đào Đoàn Trang, Nguyễn Văn Giáp, Lê Thị Trinh, Trương Hà Thái, Lại Thị Lan Hương, Cao Thị Bích Phượng và Huỳnh Thị Mỹ Lệ, 2019. Nghiên cứu một số chỉ tiêu lâm sàng, phi lâm sàng và biến đổi bệnh lý đại thể của gà nhiễm virus gây bệnh thiếu máu truyền nhiễm (chicken infectious anemia virus- CIAV) trong điều kiện thí nghiệm. *Tạp chí Khoa học nông nghiệp Việt Nam*, 17(7): 546- 557.

3. Ducatez M., Owoade, A., Abiola, J. & Muller, C., 2006. Molecular epidemiology of chicken anemia virus in Nigeria. *Archives of Virology*, 151(1): 97-111.
  4. Ducatez M. F., Chen, H., Guan, Y. & Muller, C. P., 2008. Molecular epidemiology of chicken anemia virus (CAV) in southeastern Chinese live birds markets. *Avian Dis*, 52(1): 68-73.
  5. Huynh L. T. M., Nguyen, G. V., Do, L. D., Dao, T. D., Le, T. V., Vu, N. T. & Cao, P. T. B., 2020. Chicken infectious anaemia virus infections in chickens in northern Vietnam: epidemiological features and genetic characterization of the causative agent. *Avian Pathol*, 49(1): 5-14.
  6. Lole K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N. G., Ingersoll, R., Sheppard, H. W. & Ray, S. C., 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol*, 73(1): 152-60.
  7. Meehan B. M., Todd, D., Creelan, J. L., Connor, T. J. & McNulty, M. S., 1997. Investigation of the attenuation exhibited by a molecularly cloned chicken anemia virus isolate by utilizing a chimeric virus approach. *J Virol*, 71(11): 8362-7.
  8. Noteborn M. H., De Boer, G. F., Van Roozelaar, D. J., Karreman, C., Kranenburg, O., Vos, J. G., Jeurissen, S. H., Hoeben, R. C., Zantema, A., Koch, G. & *et al.*, 1991. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *J Virol*, 65(6): 3131-9.
  9. Noteborn M. H., Kranenburg, O., Zantema, A., Koch, G., De Boer, G. F. & Van Der Eb, A. J., 1992. Transcription of the chicken anemia virus (CAV) genome and synthesis of its 52-kDa protein. *Gene*, 118(2): 267-71.
  10. Renshaw R. W., Soiné, C., Weinkle, T., O'connell, P. H., Ohashi, K., Watson, S., Lucio, B., Harrington, S. & Schat, K. A., 1996. A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. *Journal of virology*, 70(12): 8872-8878.
  11. Rosario K., Breitbart, M., Harrach, B., Segalés, J., Delwart, E., Biagini, P. & Varsani, A., 2017. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Archives of virology*, 162(5): 1447-1463.
  12. Todd D., Scott, A. N., Ball, N. W., Borghmans, B. J. & Adair, B. M., 2002. Molecular basis of the attenuation exhibited by molecularly cloned highly passaged chicken anemia virus isolates. *J Virol*, 76(16): 8472-4.
  13. Van Dong H., Tran, G. T. H., Van Nguyen, G., Dao, T. D., Bui, V. N., Huynh, L. T. M., Takeda, Y., Ogawa, H. & Imai, K., 2019. Chicken anemia virus in northern Vietnam: molecular characterization reveals multiple genotypes and evidence of recombination. *Virus Genes*, 55(5): 643-653.
  14. Yamaguchi S., Imada, T., Kaji, N., Mase, M., Tsukamoto, K., Tanimura, N. & Yuasa, N., 2001. Identification of a genetic determinant of pathogenicity in chicken anaemia virus. *J Gen Virol*, 82(5): 1233-8.
- Ngày nhận 18-5-2020  
 Ngày phản biện 15-6-2020  
 Ngày đăng 1-9-2020