

PHÁT HIỆN CÁC CHỦNG CƯỜNG ĐỘ GUMBORO NGUỒN GỐC ÂU-MỸ TẠI VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ PHÂN TÍCH GEN VP2

Detection of Virulent Gumboro Isolates of Euro-American Sublineage in Vietnam
by Molecular Analysis of Gene VP2

Lê Thị Kim Xuyên, Lê Thanh Hòa

Viện Công nghệ Sinh học Việt Nam

TÓM TẮT

Đặc tính di truyền của hệ gen virus Gumboro có xu hướng phân chia các chủng trên thế giới thành 2 nhóm: nhóm có nguồn gốc châu Á và nhóm có nguồn gốc Âu - Mỹ. Bằng phân ứng RT-PCR, tách dòng và giải trình trình tự, toàn bộ gen VP2 (1359 bp) của một số chủng virus Gumboro phân lập tại Việt Nam, ký hiệu BDG23 (Bình Dương), GPT (Phúc Thọ) được thu nhận và phân tích thành phần gen so sánh với các chủng Gumboro khác của Việt Nam (GHUT1; GSG4; GT1ST; BDG) và thế giới, bao gồm các chủng cường độ SH92 (Hàn Quốc), HK46 (Hong Kong), JD1 (Trung Quốc), OKYM (Nhật Bản), 52-70, D78 (Mỹ) và các chủng vacxin Gvx2512, GvxBL (Mỹ). Dựa trên qui luật biến đổi độc lực và kháng nguyên, chúng tôi phân tích các vị trí axit amin là *epitope* của protein VP2. Kết quả cho thấy, chủng GPT là một chủng cường độ mạnh cùng nhóm với các chủng khác của Việt Nam và châu Á. Trong khi đó chủng BDG23 là chủng có độc lực yếu và cùng với chủng GSG4 trước đây, đều có nguồn gốc châu Âu-Mỹ. Kết quả phân tích phá hệ cũng khẳng định tính hỗn hợp đa nguồn gốc của các chủng virus Gumboro phân lập tại Việt Nam.

Từ khoá: Cường độ, độc lực, *epitope*, Gumboro, kháng nguyên, RT-PCR, phá hệ.

SUMMARY

Genetic properties of Gumboro virus tend to divide the strains into two different groups, ie Asian and Euro-American sublineages. Using RT-PCR, cloning and sequencing, the entire VP2 (1359 bp) for virulent Gumboro isolates recently collected in Vietnam, viz. BDG23 (Binh Duong) and GPT (Phuc Tho), were obtained and genetically characterized with other Vietnamese (GHUT1; GSG4; GT1ST; BDG) and foreign strains including SH92 (Korea), HK46 (Hong Kong), JD1 (China), OKYM (Japan), 52-70, D78, Gvx2512, GvxBL (USA). Based on the variation rule for antigen and virulence in the VP2 sequence, it was revealed that GPT was highly virulent, being grouped with other Vietnamese strains as members of the Asian sublineage. Meanwhile BDG23, analysed as a mild virulent strain, along with GSG4, belongs to the Euro-American sublineage. Phylogenetic analysis also confirmed the mixed, multi-lineaged origin of the Gumboro population in Vietnam.

Key words: Antigen, *epitope*, gumboro, phylogeny, RT-PCR, virulence.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus Gumboro hay virus gây viêm túi Fabricius truyền nhiễm có hệ gen chứa axit ribonucleic (RNA) hai sợi, đó là hai phân đoạn riêng biệt (Becht et al. 1988), gọi là phân đoạn A và phân đoạn B, đều mang thông tin di truyền và có nhiệm vụ sinh tổng hợp 5 loại protein từ VP1 đến VP5 (VP = viral protein) cấu trúc nên capsid và nucleocapsid của virus. Phân đoạn B có

độ dài khoảng 2800 nucleotit, mã hoá cho protein enzyme VP1 (RNA-polymerase); phân đoạn A gồm khoảng 3200 nucleotit, ngoài gen VP5 lệch khung, còn chứa một khung đọc chung mã hóa cho 3 loại protein là VP2-VP4-VP3, trong đó - protein kháng nguyên VP2 có vai trò quan trọng trong gây bệnh và miễn dịch (Boot et al. 2000). Gen VP2 có độ bảo tồn cao về thành phần nucleotit ở hai đầu 5' và 3', nhưng một đoạn ở giữa khoảng 500 nucleotit có mức độ biến

đổi cao giữa các chủng, gọi là vùng “siêu biến đổi”, dễ dàng thu nhận bằng phương pháp RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) và tách dòng sản phẩm để giải trình tự (Lê Thanh Hoà, 2003; Lê Thị Kim Xuyên và cs., 2006). Vùng “siêu biến đổi” này mã hóa cho khoảng 120-150 axit amin, ở đó có một số axit amin quan trọng, làm khung cấu tạo nên các *epitope* kháng nguyên, hay còn gọi là quyết định kháng nguyên (antigenic determinant) và là vị trí cấu trúc trên một có thể phản ứng đặc hiệu với một phân tử kháng thể (Fahey et al. 1989; Jackwood and Sommer-Wagner, 2007). Những nghiên cứu ở mức độ phân tử về virus Gumboro, đặc biệt là những nghiên cứu về gen quy định cấu trúc của kháng nguyên VP2 cho phép hiểu biết sâu hơn về cơ chế biến đổi của cấu trúc khung *epitope* kháng nguyên VP2, mà điều này liên quan chặt chẽ đến phản ứng miễn dịch, đến sự kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể trong miễn dịch chống virus Gumboro, từ đó lựa chọn, sản xuất được vacxin thích hợp để phòng chống bệnh truyền nhiễm này một cách có hiệu quả (Scherbacova et al. 1998; Lê Thanh Hoà, 2004).

Các axit amin tạo nên *epitope* có sự thay đổi theo qui luật khi độc lực tăng (cường độc hoá) hoặc giảm (nhược độc hoá), do vậy phân tích thành phần VP2 cho phép xác định mức độ độc lực và kháng nguyên của chủng virus nghiên cứu (Lê Thanh Hoà, 2003; 2004; Jackwood and Sommer-Wagner 2007). Một số chủng Gumboro cường độc mà chúng tôi nghiên cứu trước đây, thu thập từ các địa phương khác, hoàn toàn có thành phần gen VP2 theo đúng qui luật này (Lê Thị Kim Xuyên và cs. 2006). Trong bài báo này chúng tôi trình bày quá trình thu nhận gen VP2 của các mẫu virus Gumboro ký hiệu BDG23 (phân lập tại Bình Dương); GPT (phân lập tại Phúc Thọ, Hà Nội) và so sánh biến đổi thành phần gen với một số chủng của Việt Nam và thế giới nhằm xác định nguồn gốc của các chủng virus Gumboro mới phân lập này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu bệnh phẩm là túi Fabricius của gà bị bệnh Gumboro, qua kết quả chẩn đoán lâm sàng và mổ khám bệnh tích, được ký hiệu là BDG23 (Bình Dương), thu thập năm 2005 tại một trại gà nhiễm Gumboro ở tỉnh Bình Dương; và GPT (Phúc Thọ), thu thập năm 2002, tại huyện Phúc Thọ, thành phố Hà Nội. Túi Fabricius được rửa sạch bằng nước muối sinh lý, bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng để tách RNA tổng số.

Bộ kit chuẩn RT-PCR (QIAGEN, Mỹ) được sử dụng để nhân toàn bộ gen VP2. Vector tách dòng là pCR2.1-TOPO, tế bào *E. coli* chủng DH-5T1 (Invitrogen) được sử dụng để nhân dòng. Các bộ kit tách DNA của plasmid tái tổ hợp và enzym hạn chế *EcoRI*, được dùng để cắt DNA plasmid kiểm tra sản phẩm.

2.2. Tách chiết RNA tổng số

Mẫu bệnh phẩm là túi Fabricius được nghiền trong niro lỏng nhằm tách các tế bào riêng biệt. Thêm nước muối sinh lý theo tỷ lệ 1:1, đông tan 3 lần ở -20°C và nhiệt độ phòng (25°C), nhằm giải phóng virus khỏi tế bào. Ly tâm 8000 vòng/phút trong 5 phút, thu dịch nổi phía trên có chứa virus.

Bộ sinh phẩm sử dụng để tách RNA tổng số là QIAamp Viral Mini Kit (QIAGEN), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm tắt các bước như sau: Lấy 140µl dịch nổi cho vào ống Eppendorf, cho thêm 560 µl dung dịch đệm AVL, tiếp tục thêm 560 µl Ethanol (96 - 100%). Một nửa thể tích huyền dịch được chuyển sang cột lọc (QIAamp spin column) và ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút. Dịch ly tâm được loại bỏ và lặp lại như trên với thể tích huyền dịch còn lại. Sau đó cho 500 µl dung dịch đệm AW1 để rửa cột, ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút và loại bỏ dịch bên dưới có trong ống ly tâm. Lặp lại bước trên

với dung dịch đệm rửa AW2. Chuyển cột sang ống Eppendorf sạch, cho lên màng lọc của cột 60 µl dung dịch AVE, để nhiệt độ phòng 1 phút, ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút. Dịch trôi ra trong ống ly tâm chính là RNA tổng số, trong đó có RNA hệ gen virus Gumboro, được bảo quản ở -20°C.

2.3. Chọn môi và thực hiện RT-PCR

Phương pháp sử dụng để thu nhận gen kháng nguyên VP2 là RT-PCR, với cặp môi được sử dụng, đó là:

Môi xuôi ký hiệu: GKZF

(5'CCGGAATTCGCCGCCCATGACAAACCTGCAAGAT3') (có điểm cắt *EcoRI*)

Môi ngược ký hiệu: SALGR (5'CCGGTCGACTACRGGATTCTGGGGCACCTG 3') (có điểm cắt *Sall*).

Toàn bộ gen kháng nguyên VP2 được nhân lên bằng RT-PCR từ nguồn khuôn RNA tổng số, với chu trình nhiệt: 50°C/30 phút, 95°C/15 phút, 35 chu kỳ [94°C/15 giây, 65°C/35 giây, 72°C/90 giây], 72°C/8 phút. Sản phẩm cuối cùng là toàn bộ VP2 có độ dài khoảng 1,35 kb.

2.4. Tinh sạch và tách dòng sản phẩm

Sản phẩm RT-PCR được tinh sạch bằng QIAquick Purification kit (QIAGEN). Vấn tắt như sau: Bổ sung 5 lần thể tích dung dịch PB vào sản phẩm PCR, trộn đều, rồi chuyển sang cột lọc, ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút. Chuyển cột sang ống ly tâm mới, bổ sung 750 µl đệm PE, ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch bên dưới, ly tâm lại lần nữa. Chuyển cột sang ống Eppendorf sạch, cho 30 µl dung dịch EB lên màng của cột lọc, để ở nhiệt độ phòng 5 phút, ly tâm 13000 vòng/phút trong 2 phút. Dịch bên dưới là DNA của sản phẩm RT-PCR đã được tinh sạch, bảo quản ở -20°C.

Sản phẩm RT-PCR của VP2 (khoảng 1,35 kb) được dòng hoá vào plasmid vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen Inc.) và chuyển nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH-5T1. Plasmid tái tổ hợp được chọn lọc theo qui trình (Sambrook and Russell, 2001). DNA

của plasmid tái tổ hợp được tách chiết bằng QiaPrep Spin Mini kit của QIAGEN.

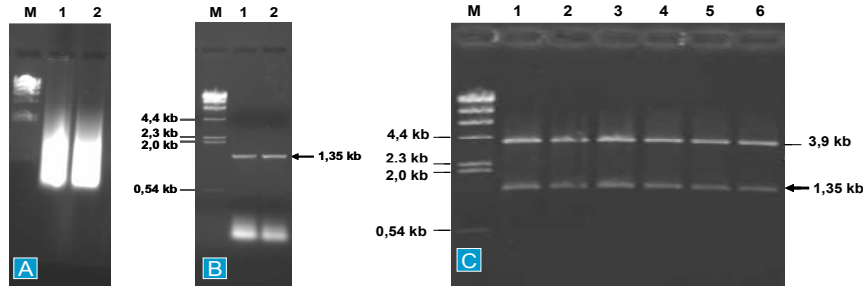
2.5. Giải trình trình tự và phân tích số liệu

DNA của VP2 có trong vector pCR2.1-TOPO tái tổ hợp, được giải trình trình tự trên máy ABI-3100 Avant Genetic Analyzer (Mỹ) có tại Viện Công nghệ sinh học. Chuỗi nucleotit được xử lý bằng chương trình SeqEd1.03, sắp xếp bằng chương trình AsemblyLIGN1.9; xử lý bằng MacVector8.2 (Accelrys Inc.) trên máy tính Macintosh và so sánh đối chiếu các chuỗi nucleotit và axit amin bằng chương trình GENEDOC 2.5 (Nicholas and Nicholas, 1997) và xây dựng phả hệ bằng chương trình Mega4.0 (Tamura et al. 2007). Thành phần axit amin được thu nhận bằng cách sử dụng bộ mã của vi sinh vật bậc thấp (vi khuẩn) trong Ngân hàng gen thông qua chương trình GENEDOC 2.5.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách RNA tổng số, thu nhận gen kháng nguyên VP2 và tách dòng sản phẩm

RNA tổng số của mẫu bệnh phẩm được tách chiết theo qui trình đã trình bày, được điện di trên thạch agarose 0,8% (Hình 1A). Trên thạch agarose, RNA tổng số hiển thị là một vệt trắng sáng, với hàm lượng tương đối cao để làm khuôn cho phản ứng RT-PCR. Sử dụng môi GKZF-SALGR, đoạn DNA của toàn bộ gen kháng nguyên VP2 có độ dài khoảng 1,35 kbp đã được thu nhận (Hình 1B). Đoạn gen kháng nguyên VP2 sau khi nhân lên, được gắn vào vector tách dòng pCR2.1-TOPO để tạo plasmid tái tổ hợp. Các plasmid tái tổ hợp này được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH-5αT1. Các khuẩn lạc trắng có khả năng chứa plasmid tái tổ hợp của chủng GPT; BDG23 được chọn lọc và nuôi cấy để tách DNA plasmid. Sau khi tinh sạch các plasmid được cắt bằng enzym giới hạn *EcoRI* để kiểm tra đoạn chèn VP2 (Hình 1C).



Hình 1. Điện di RNA tổng số (A), sản phẩm RT-PCR của toàn bộ gen VP2 (B) và DNA plasmid tái tổ hợp (C)

M: Chỉ thị phân tử (DNA của thực khuẩn thể được cắt bằng HindIII); A: RNA tổng số tách từ mẫu bệnh phẩm thu nhận tại Phúc Thọ (Hà Nội) (1) và tỉnh Bình Dương (2); B: sản phẩm RT-PCR gen VP2 (1,35 kb) của mẫu GPT (1), BDG23 (2); C: DNA plasmid tái tổ hợp của các khuẩn lạc chủng GPT (1, 2, 3), chủng BDG23 (4, 5, 6) sau khi cắt bằng enzym giới hạn EcoRI.

3.2. Kết quả giải trình tự gen kháng nguyên VP2

Toàn bộ chuỗi nucleotit VP2 của các chủng BDG23 và GPT được chuyển đổi sang thành phần axit amin và phân tích biến đổi tại các vị trí 222, 242, 253, 256, 279, 284, 294, 299, và 329 với các chủng Việt Nam và thế giới, đối chiếu với qui luật biến đổi mô tả tại Lê Thanh Hòa (2003) và Jackwood and Sommer - Wagner (2007). Chủng BDG23 tại các vị trí tương ứng 222, 242, 253, 256, 279, 284, 294, 299, và 329 có

các axit amin là P - V - Q - V - D - A - I - N - A, thuộc mô típ P - V - Q - V - D - A - L - N - R đây là loại mô típ của virus Gumboro đang chuyển đổi nhược độc hóa (theo chiều yếu dần) (Lê Thanh Hòa, 2003) ở dạng trung gian, chứng tỏ chủng BDG23 là một chủng có độc lực yếu. Chủng GPT ở vị trí tương ứng này là A - I - Q - I - D - A - I - S - A, chỉ khác duy nhất một axit amin ở vị trí 279 (D - I), chứng tỏ GPT là một chủng cường độc (Jackwood and Sommer-Wagner, 2007) (Bảng 1).

Bảng 1. Biến đổi axit amin của các chủng nghiên cứu tại các vị trí epitope trong VP2

Các chủng so sánh	Vị trí epitope có biến đổi axit amin								
	222	242	253	256	279	284	294	299	329
BDG23	P	V	Q	V	D	A	I	N	A
GPT	A	V	Q	I	D	A	I	S	A
BDG	A	V	Q	I	D	A	I	S	A
GHUT1	A	V	Q	I	D	A	I	S	A
GT1ST	A	V	Q	I	D	A	I	S	A
GSG4	P	V	Q	V	D	A	I	N	A
52-70	P	V	Q	V	D	A	L	N	A
D78	P	V	H	V	D	T	L	N	A
Gvx2512	P	V	Q	V	D	A	I	N	A
GvxBL	P	V	Q	V	D	A	I	N	A
HK46	A	V	Q	I	D	A	I	S	A
SH92	A	V	Q	I	D	A	I	S	A
JD1	P	V	H	V	D	T	L	N	A
OKYM	A	V	Q	I	D	A	I	S	A
Cường độc	A	I	Q	I	D	A	I	S	A
Độc lực yếu	P/T	V	Q	V	D/N	A	L	N	R
Vacxin	P	V	H	V	N	T	L	N	R

Ghi chú: Các vị trí 222, 242, 256, 299 có tầm quan trọng đặc biệt trong xác định độc lực và kháng nguyên

Quy luật biến đổi axit amin khung là xảy ra ở 9 vị trí bao gồm vị trí 222, 242, được các công trình nghiên cứu chứng minh 253, 256, 279, 284, 294, 299 và 329 của

protein VP2; và sự thay đổi axit amin ở các vị trí này có ảnh hưởng đến tính kháng nguyên và đặc tính gây bệnh của một số chủng virus Gumboro. Một chủng Gumboro được gọi là cường độc có mức độ độc lực cao phải là chủng có thành phần axit amin làm khung ở các vị trí 222, 242, 253, 256, 279, 284, 294, 299, và 329 tương ứng là **A-I-Q-I-I-A-I-S-A** (Lê Thanh Hòa, 2003; Jackwood and Sommer-Wagner, 2007).

3.3. Kết quả so sánh thành phần amino acid gen kháng nguyên VP2 của chủng BDG23 và chủng GPT với một số chủng của Việt Nam và thế giới

Chuỗi axit amin của các chủng BDG23 và GPT được so sánh với các chủng của Việt Nam và thế giới, kết quả so sánh được trình bày ở Hình 2. Qua so sánh chúng tôi thấy chủng BDG23:

- Khi so sánh với chủng GPT (Việt Nam) có 11 axit amin sai khác giữa 2 chủng, trong đó có hai vị trí khung *epitope* 222 và 229.

- Khi so sánh với các chủng BDG, GHUT1, GT1ST, sai khác 6 axit amin trong đó có hai vị trí khung *epitope* 222 và 229 (Bảng 1).

- So sánh với các chủng HK46 (Hồng Kông), SH92 (Hàn Quốc), JD1 (Trung

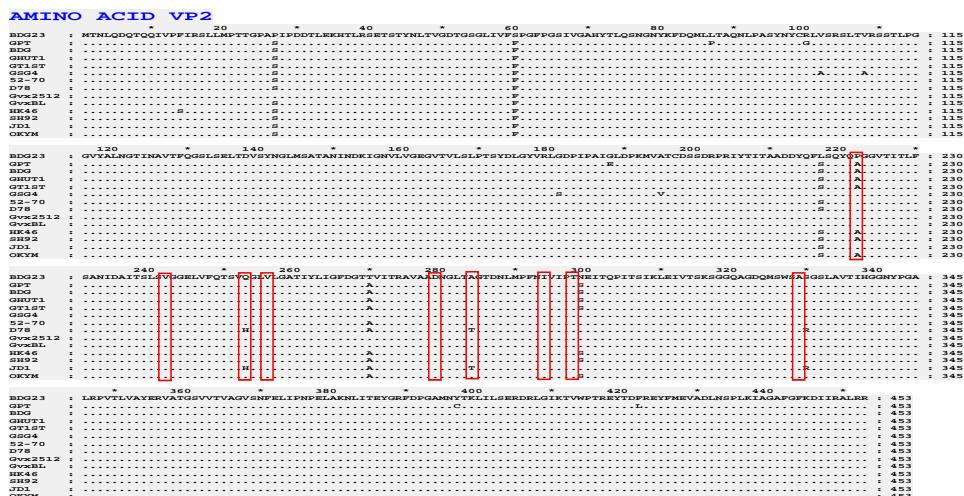
Quốc), OKYM (Nhật Bản) có đến 7 axit amin sai khác trong đó có hai vị trí khung *epitope* 222 và 229.

- So với các chủng cường độc của Mỹ (52/70, D78), có 4 và 7 axit amin của mỗi chủng.

- Khi so sánh với các chủng vaccin của Mỹ (đó là: Gvx2512, GvxBL), chỉ sai khác 1 và 2 axit amin của mỗi chủng.

- Đối với chủng GSG4 (Việt Nam), có sai khác 6 axit amin.

Như vậy chủng BDG23 đã có sự sai khác về thành phần khung *epitope* kháng nguyên so với các chủng châu Á bao gồm các chủng GPT, BDG, GHUT1, GT1ST của Việt Nam và các chủng HK46 (Hồng Kông), SH92 (Hàn Quốc), JD1 (Trung Quốc), OKYM (Nhật Bản), chủng tổ chủng này không giống với các chủng có nguồn gốc châu Á. Trong khi đó, cùng với một chủng khác phân lập tại Việt Nam (chủng GSG4), BDG23 không có sự sai khác về thành phần khung *epitope* khi so sánh với các chủng cường độc và vaccin của Mỹ (52/70, D78, Gvx2512, GvxBL) (Bảng 1; Hình 2). Điều này xác định, các chủng BDG23 và GSG4, mặc dù phân lập tại Việt Nam nhưng có nguồn gốc bên ngoài, rất có thể là các chủng được đưa vào nước ta.

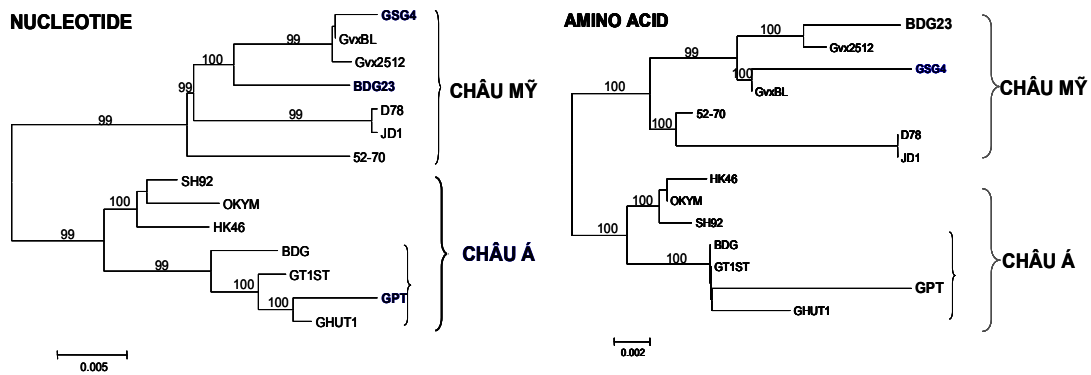


Hình 2. So sánh thành phần axit amin gen VP2 của chủng BDG23, GPT với một số chủng của Việt Nam và thế giới. Dấu (.) biểu thị giống với trình tự axit amin của chủng ở hàng đầu tiên. Sai khác về axit amin biểu thị bằng các chữ cái ký hiệu của chúng. Các vị trí *epitope* liệt kê ở bảng 1, bao gồm các axit amin vị trí 222, 242, 253, 256, 279, 284, 294, 299 và 329, được đóng khung theo chiều dọc

3.4. Kết quả phân tích nguồn gốc phả hệ

Chuỗi nucleotit và axit amin của chủng BDG23 và GPT cùng với tất cả các chuỗi chúng tôi dùng để so sánh (gồm 14 chủng) được sắp xếp bằng GENEDOC2.5 (Nicholas and Nicholas, 1997) và đưa vào phân tích phả hệ bằng chương trình MEGA4.0 (Tamura et al. 2007). Kết quả được trình bày ở hình 3 cho thấy, các chủng phân chia thành 2 nhóm rõ rệt, trong đó, chủng GPT (Việt Nam) cùng nhóm với các chủng châu Á, chủng BDG23 và chủng SGS4 (Việt Nam) cùng nhóm với các chủng châu Âu-Mỹ, kể cả phân tích thành phần nucleotit cũng như axit amin. Kết quả phân tích phả hệ và nguồn gốc một lần nữa khẳng định sự hỗn hợp các dòng/chủng có nguồn gốc khác

nhau của virus Gumboro tại Việt Nam. Những chủng có nguồn gốc ngoại lai, rất có thể là các chủng được đưa từ bên ngoài vào nước ta bằng nhiều con đường khác nhau. Sự phân nhóm Á và Âu - Mỹ dựa trên thành phần gen của các chủng Gumboro tại Việt Nam, đưa ra một vấn đề về sự hỗn hợp nhiều chủng/dòng virus Gumboro gây bệnh đã được phát hiện nhiều nơi trên thế giới (Jackwood and Sommer - Wagner, 2007). Do vậy, nghiên cứu dịch tễ học bệnh Gumboro để tìm hiểu đặc tính của virus gây bệnh, đồng thời tìm kiếm đúng loại vaccine và đánh giá hiệu lực ứng dụng của vacxin Gumboro phù hợp trong phòng chống bệnh này ở nước ta là hết sức cần thiết.



Hình 3. Mối quan hệ phả hệ và nguồn gốc giữa các chủng BDG23, GPT và các chủng châu Á, châu Mỹ (sử dụng chương trình MEGA4.0, 1000 bootstrap)

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được hai chủng virus Gumboro ký hiệu BDG23 và GPT tại Việt Nam và thu nhận toàn bộ gen VP2 của 2 chủng này, bao gồm 1359 nucleotit tương ứng với 453 axit amin.

Kết quả phân tích tương đồng thành phần nucleotit và axit amin cho thấy, chủng BDG23 có thể là một chủng thuộc nhóm có độc lực yếu, trong khi đó chủng GPT có thể là chủng cường độc.

Chủng GPT cùng nhóm với các chủng châu Á, trong khi đó chủng BDG23 và

GSG4 cùng nhóm với các chủng châu Âu - Mỹ khi phân tích tương đồng thành phần nucleotit và axit amin cũng như phân tích phả hệ nguồn gốc.

Lời cảm ơn

Công trình nghiên cứu này được thực hiện nhờ tài trợ kinh phí của Bộ Khoa học và Công nghệ cho đề tài KC.04.29 do PGS.TS Lê Thanh Hoà chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Becht H., H. Miller and K. Muller (1988). *Comparative studies on structural and*

- antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus.* J. Gen. Virol., 69, p. 631-640
- Boot H.J., A.H. Ter Huurne and B.P. Peeters (2000). *Generation of full-length cDNA of the two genomic dsRNA segments of infectious bursal disease virus.* J. Virol. Methods, 84, p. 49-58.
- Fahey K.J., K. Erny and J. Crooks (1989). *A conformational immunogen on VP2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens.* Journal of General Virology, 70, p. 1473-1481.
- Jackwood D.J. and S. Sommer-Wagner (2007). *Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents.* Virology, 365, p. 369-375.
- Lê Thanh Hoà (2003). *Sinh học phân tử virus Gumboro: nghiên cứu ứng dụng tại Việt Nam.* Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, Việt Nam (340 trang).
- Lê Thanh Hoà (2004). *Biến đổi phân tử epitope của gen kháng nguyên VP2 ở một số chủng virus cường độc Gumboro phân lập tại Việt Nam.* Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y, Số 9, Tập 4, tr. 6-13.
- Lê Thị Kim Xuyên, Võ Công Huân, Đoàn Thị Thanh Hương và Lê Thanh Hòa (2006). *Tách dòng và phân tích biến đổi thành phần chuỗi gen VP2-4-3 (phân đoạn A) của virus cường độc Gumboro chủng GHUT-12 của Việt Nam.* Tạp chí Công nghệ Sinh học, Số 4, Tập 2, tr. 171-178.
- Nicholas K.B. and H.B. Nicholas (1997). *Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.* Distributed by the author.
- Sambrook J. and D.W. Russell (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Scherbacova L.O., A.L. Lomakin, A.V. Borisov, V.V. Drygin and A.A. Gusev (1998). *Comparative analysis of VP2 gene variable region of infectious bursal disease virus.* Mol. Gen. Microbiol. Virol., 1, p. 35-40.
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar (2007). *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.* , 24, p. 1596-1599.