

MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA CHỦNG VIRUS DỊCH TẢ VỊT CƯỜNG ĐỘ VG-04 PHÂN LẬP ĐƯỢC TẠI TỈNH HƯNG YÊN NĂM 2004

Vũ Thị Ngọc, Lê Văn Phan, Nguyễn Bá Hiên
Khoa Thú y - Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Chủng virus cường độ dịch tả vịt VG-04 phân lập được tại Hưng Yên năm 2004 đã được nghiên cứu về một số đặc tính sinh học và sinh học phân tử. Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng virus VG-04 gây nhiễm trong phôi vịt có khả năng nhân lên và gây chết phôi vịt, các chỉ số ELD_{50} và EID_{50} trên phôi vịt tương ứng là 105,27/0,2 ml và 107,46/0,2ml. Kết quả gây nhiễm virus trên vịt cho thấy chủng này có khả năng nhân lên và gây chết vịt thí nghiệm với các triệu chứng và bệnh tích đặc trưng. Chỉ số LD_{50} trên vịt của chủng virus VG-04 là 109,13/0,5 ml. Kết quả phân tích về trình tự nucleotide của đoạn gene US7 cho thấy chủng virus VG-04 có mức độ tương đồng 100% khi so sánh với chủng virus vắc xin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000. Khi so sánh với các chủng virus dịch tả vịt tham chiếu khác trên thế giới, tỷ lệ tương đồng về nucleotide dao động từ 96,5 – 99,6%.

Từ khóa: Dịch tả vịt, Virus chủng VG-04, ELD_{50} , EID_{50} , LD_{50} , Gene US7

Some biological and molecular biology characteristics of a virulent strain of Duck plague virus VG-04 isolated in Hung Yen province in 2004

Vu Thi Ngoc, Le Van Phan, Nguyen Ba Hien

SUMMARY

In this study, a virulent virus strain of VG-04 isolated in Hung Yen in 2004 was determined for some biological and molecular biology characteristics. The studied result showed that the VG-04 virus strain was capable to replicate and kill duck embryo, the indexes of ELD_{50} and EID_{50} were 105.27/0.2 ml and 107.46/0.2ml, respectively. The experimental infection result on duck showed that the VG-04 virus strain could replicate and kill the experimental ducks with the typical symptoms and lesions, the index (LD_{50}) of the VG-04 virus strain for duck was 109.13/0.5 ml. The nucleotide (nt) sequence analysis of the US7 gene showed that the VG-04 virus strain was closely related to the live attenuated vaccine strain of duck enteritis virus DP-EG-2000, sharing 100% similarity level for nt. When comparing the VG-04 virus strain with other worldwide representative virus strains of duck viral enteritis, the rate of nucleotide similarity level ranged from 96.5 to 99.6%.

Keywords: Duck viral enteritis, VG-04 virus strain, ELD_{50} , EID_{50} , LD_{50} , Gene US7

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chăn nuôi thủy cầm chiếm một vị trí quan trọng trong ngành chăn nuôi gia cầm của Việt Nam, mang lại nguồn thu nhập quan trọng cho người chăn nuôi. Vịt là loài thủy cầm được chăn nuôi nhiều nhất. Một trong những bệnh

quan trọng nhất và gây thiệt hại kinh tế nặng nề cho ngành chăn nuôi vịt ở Việt Nam và thế giới là bệnh dịch tả vịt (OIE, 2010). Virus gây bệnh dịch tả vịt là một loại DNA virus thuộc họ Herpesviridae, nhóm Herpesvirus. Bệnh gây nên tình trạng bại huyết, xuất huyết cho vịt với tỷ lệ chết cao (Nguyễn Bá Hiên và Huỳnh Thị

Mỹ Lệ, 2013). Theo Quyết định của Bộ Nông nghiệp và PTNT, bệnh dịch tả vịt là một trong 7 bệnh phải tiêm phòng bắt buộc và yêu cầu tỷ lệ tiêm phòng phải đạt 100%.

Ở Việt Nam, đã có nhiều nghiên cứu về bệnh dịch tả vịt và virus gây bệnh dịch tả vịt được tiến hành. Nhiều loại vaccin dịch tả vịt cũng đã được nghiên cứu, sản xuất và lưu hành trên thị trường. Mặc dù bệnh dịch tả vịt là bệnh phải tiêm phòng vaccin bắt buộc, nhưng trong thực tế chăn nuôi chúng tôi thấy việc sử dụng vaccin phòng bệnh cho các đàn vịt chủ yếu lại do người chăn nuôi quyết định. Trong chăn nuôi vịt, phương thức chăn nuôi, điều kiện chăn nuôi và vệ sinh phòng bệnh... ảnh hưởng rất lớn đến việc phòng chống dịch bệnh đạt hiệu quả và bệnh dịch tả vịt vẫn thường xuyên xảy ra (Lê Hồng Mận và Bùi Đức Lũng, 2007). Vaccin là yếu tố quyết định trong công tác phòng chống dịch bệnh, để đánh giá được hiệu lực bảo hộ của vaccin dịch tả vịt thì việc có được chủng virus dịch tả vịt cường độc phân lập được từ thực địa đạt tiêu chuẩn dùng cho phương pháp công cường độc để đánh giá chất lượng vaccin là vô cùng quan trọng và cần thiết. Trong nghiên cứu này, chủng virus dịch tả vịt cường độc VG-04 phân lập được từ thực địa Việt Nam đã được khảo sát về một số đặc tính kháng nguyên cũng như sinh học phân tử. Kết quả của nghiên cứu này sẽ là cơ sở cho việc bảo tồn nguồn gen phục vụ công tác nghiên cứu và giảng dạy tại Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

- Chủng virus cường độc dịch tả vịt VG-04 phân lập được tại tỉnh Hưng Yên năm 2004 do Bộ môn Vi sinh vật - Truyền nhiễm, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

- Phôi vịt 13 ngày tuổi, lấy từ đàn vịt bố mẹ khỏe mạnh không được tiêm phòng vaccin dịch tả vịt.

- Vịt con 25-30 ngày tuổi khỏe mạnh, chưa

được tiêm phòng vaccin dịch tả vịt.

- Trang thiết bị, dụng cụ và vật tư hóa chất dùng cho phản ứng PCR, giải trình tự gen và phân tích trình tự gen.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp xác định khả năng thích ứng và ổn định của chủng virus dịch tả vịt VG-04 trên phôi vịt

Để kiểm tra về khả năng thích ứng và phát triển ổn định trên phôi vịt, chủng virus cường độc dịch tả vịt VG-04 đã được cấy truyền nhiều đời trên phôi vịt 13 ngày tuổi. Mỗi lần cấy truyền dùng 30 phôi vịt thí nghiệm để tiêm virus dịch tả vịt chủng VG-04 và 5 phôi đối chứng không tiêm. Cụ thể chủng virus VG-04 được pha thành huyền dịch 10^{-2} trong dung dịch nước muối sinh lý 0,9% và được tiêm vào xoang niệu mô của trứng vịt (0,2ml/phôi). Theo dõi thí nghiệm trong 6 ngày rồi đánh giá kết quả.

2.2.2. Phương pháp xác định chỉ số ELD_{50} (liều gây chết 50% phôi) và EID_{50} (liều gây nhiễm 50% phôi) của chủng virus VG-04

Phương pháp xác định chỉ số ELD_{50} và EID_{50} được tiến hành như sau: Chủng virus VG-04 được pha loãng theo cơ số 10 (từ 10^{-1} đến 10^{-12}) trong nước sinh lý. Mỗi độ pha loãng tiêm cho 5 phôi, mỗi phôi tiêm 0,2 ml. Sau khi tiêm, theo dõi phôi ở các thời điểm từ 1 – 6 ngày. Các chỉ số như tổng số phôi chết và tổng số phôi sống cũng như tổng số phôi có bệnh tích (phôi nhiễm) và tổng số phôi không có bệnh tích (phôi không nhiễm) ở từng nồng độ pha loãng virus khác nhau được ghi chép lại để tính chỉ số ELD_{50} và EID_{50} . Chỉ số ELD_{50} và EID_{50} được tính theo công thức của Reed và Muench (1938).

2.2.3. Phương pháp xác định chỉ số LD_{50} (liều gây chết 50% động vật thí nghiệm) trên vịt của chủng virus VG-04

Phương pháp xác định chỉ số LD_{50} trên vịt được tiến hành như sau: Chủng virus VG-04 được pha loãng theo cơ số 10 (từ 10^{-1} đến 10^{-12}) trong nước sinh lý. Mỗi độ pha loãng tiêm dưới

da cho 5 vịt con 25 ngày tuổi, mỗi vịt tiêm 0,5 ml. Sử dụng 5 vịt làm đối chứng chỉ tiêm dưới da nước sinh lý.

Sau khi tiêm, theo dõi vịt trong 14 ngày. Tỷ lệ vịt sống và tỷ lệ vịt chết được ghi chép để tính chỉ số LD₅₀. Vịt chết được mổ khám để kiểm tra bệnh tích đại thể và gan được sử dụng để chẩn đoán virus dịch tả vịt bằng phản ứng PCR. Chỉ số LD₅₀ được tính theo công thức của Reed và Muench (1938).

2.2.4. Phương pháp giám định chủng virus dịch tả vịt bằng kỹ thuật PCR

* Phương pháp tách chiết DNA tổng số của virus

Lấy 200μl huyền dịch bệnh phẩm chứa virus đã qua xử lý, đem ủ với 500μl dung dịch Lysis buffer (27% sucrose, 1x SSC, 1 mM EDTA, 1% SDS, 200 μg/ml protease K) ở 56°C/1 giờ. Trộn huyền dịch thu được này với hỗn hợp Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol (tỷ lệ 25:24:1), vortex mạnh và ly tâm 12.000 vòng/phút, trong 10 phút ở 4°C. Sau khi ly tâm, chuyển pha trên có chứa DNA (khoảng 500μl) vào một ống Eppendorf mới. Bổ sung 500μl dung dịch Isopropanol, ly tâm 12.000 vòng/phút, trong 10 phút ở 4°C để thu tủa DNA của virus. Rửa tủa DNA bằng 1 ml dung dịch Ethanol 70%, ly tâm 12.000 vòng/phút, trong 10 phút ở 4°C. Thu lấy tủa DNA rồi hòa tan trong 50μl nước cất vô trùng đã loại DNase và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

* Phản ứng PCR để khuếch đại đoạn gene US7

DNA của virus được bổ sung trực tiếp vào ống phản ứng PCR sử dụng kit AccuPower PCR PreMix (BIONEER). Bộ Kit này chứa DNA taq-polymerase và các thành phần cần thiết cho quá trình khuếch đại DNA. Cặp mồi (primer) được sử dụng trong nghiên cứu này để nhân vùng

gene US7 là cặp mồi đã được chúng tôi công bố trước đây (Nguyễn Bá Hiền và cs., 2016). Phản ứng PCR được thực hiện theo chương trình như sau: 30 chu kỳ (94°C - 1 phút, 54°C - 1 phút, 72°C - 1 phút) và cuối cùng 8 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR sẽ được kiểm tra trên gel agarose và được gửi Công ty Macrogen của Hàn Quốc để giải trình tự gene.

2.2.5. Giải trình tự gene và xây dựng cây phát sinh chủng loại

Sau khi được giải trình tự gene, đoạn gene US7 sẽ được phân tích bằng phần mềm BioEdit và DNASTAR và được so sánh với các trình tự gene tham chiếu khác được công bố trên ngân hàng dữ liệu gene quốc tế (GenBank). Phần mềm MEGA6 với thuật toán Maximum Likelihood đã được sử dụng để xây dựng cây phả hệ (phylogentic tree).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả kiểm tra khả năng thích ứng và ổn định của chủng virus dịch tả vịt cường độc VG-04 trên phôi vịt

Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, sau 144 giờ theo dõi, chủng virus cường độc dịch tả vịt VG-04 đã nhân lên và thích nghi tốt trên phôi vịt. Tính thích ứng của chủng virus VG-04 thể hiện qua sự nhân lên của virus trên phôi, gây chết phôi ở từng thời điểm tương đối ổn định. Tỷ lệ phôi chết dao động từ 86,67% đến 93,33%. Thời gian gây chết phôi tập trung vào khoảng từ 73-120 giờ sau khi gây nhiễm. Phôi chết có các bệnh tích đặc trưng như xuất huyết trên da, gan sưng, tụ máu, xuất huyết, phôi còi cọc hoặc phù phôi. Phôi đối chứng vẫn phát triển và khỏe mạnh, mổ khám thấy không có bệnh tích trên phôi. Kết quả này cho thấy chủng virus cường độc dịch tả vịt VG-04 có khả năng nhân lên và gây chết phôi vịt.

Bảng 1. Kết quả cấy truyền virus cường độc dịch tả vịt VG-04 trên phôi vịt

Chủng virus	Đợt TN	Nồng độ virus gây nhiễm	Liều lượng tiêm (ml)	Số phôi TN	Kết quả theo dõi													
					0-24h		25-48h		49-72h		73-96h		97-120h		121-144h		Tổng hợp	
					Số phôi chết	Tỷ lệ (%)	Số phôi chết	Tỷ lệ (%)	Số phôi chết	Tỷ lệ (%)	Số phôi chết	Tỷ lệ (%)	Số phôi chết	Tỷ lệ (%)	Số phôi chết	Tỷ lệ (%)	Số phôi chết	Tỷ lệ (%)
VG-04	1	10 ⁻²	0,2	30	0	0	2	6,67	2	6,67	12	40	11	36,67	1	3,33	28	93,33
	2	10 ⁻²	0,2	30	0	0	3	10	4	13,33	9	30	10	33,33	1	3,33	27	90
	3	10 ⁻²	0,2	30	0	0	2	6,67	3	33,33	11	36,67	9	30	1	3,33	26	86,67

3.3. Kết quả xác định chỉ số LD_{50} của chủng virus cường độc dịch tả vịt VG-04

Bảng 3. Kết quả xác định chỉ số LD_{50} của chủng virus cường độc dịch tả vịt VG-04

Lần TN	Độ pha loãng virus	Liều gây nhiễm	Số vịt TN/1 nồng độ	LD_{50} ($\log_{10}$)	LD_{50} trung bình ($\log_{10}$)
1	$10^{-1} - 10^{-12}$	0,5 ml	5	9,00	9,13
2	$10^{-1} - 10^{-12}$	0,5 ml	5	9,00	
3	$10^{-1} - 10^{-12}$	0,5 ml	5	9,38	

Kết quả trình bày ở bảng 3 cho thấy chỉ số LD_{50} của chủng virus cường độc dịch tả vịt VG-04 dao động trong khoảng từ $10^{9,00} - 10^{9,38}$ $LD_{50}/0,5\text{ml}$ và LD_{50} trung bình của chủng virus là $10^{9,13}/0,5\text{ml}$. Kết quả khảo sát trước đây của chúng tôi về chỉ số LD_{50} trên vịt của chủng virus VG-04 cho thấy chỉ số LD_{50} là $10^{9,69}/0,5\text{ml}$ (Nguyễn Bá Hiên và cs., 2006), như vậy kết quả thu được lần này và kết quả thu được trước đây về chỉ số LD_{50} đối với chủng virus VG-04 là tương tự nhau. Kết quả này cũng hoàn toàn

phù hợp với công bố trước đây của Trần Minh Châu và cs., (1980) đối với chủng virus cường độc dịch tả vịt 769, chỉ số LD_{50} đạt $10^{9,58}/0,5\text{ml}$.

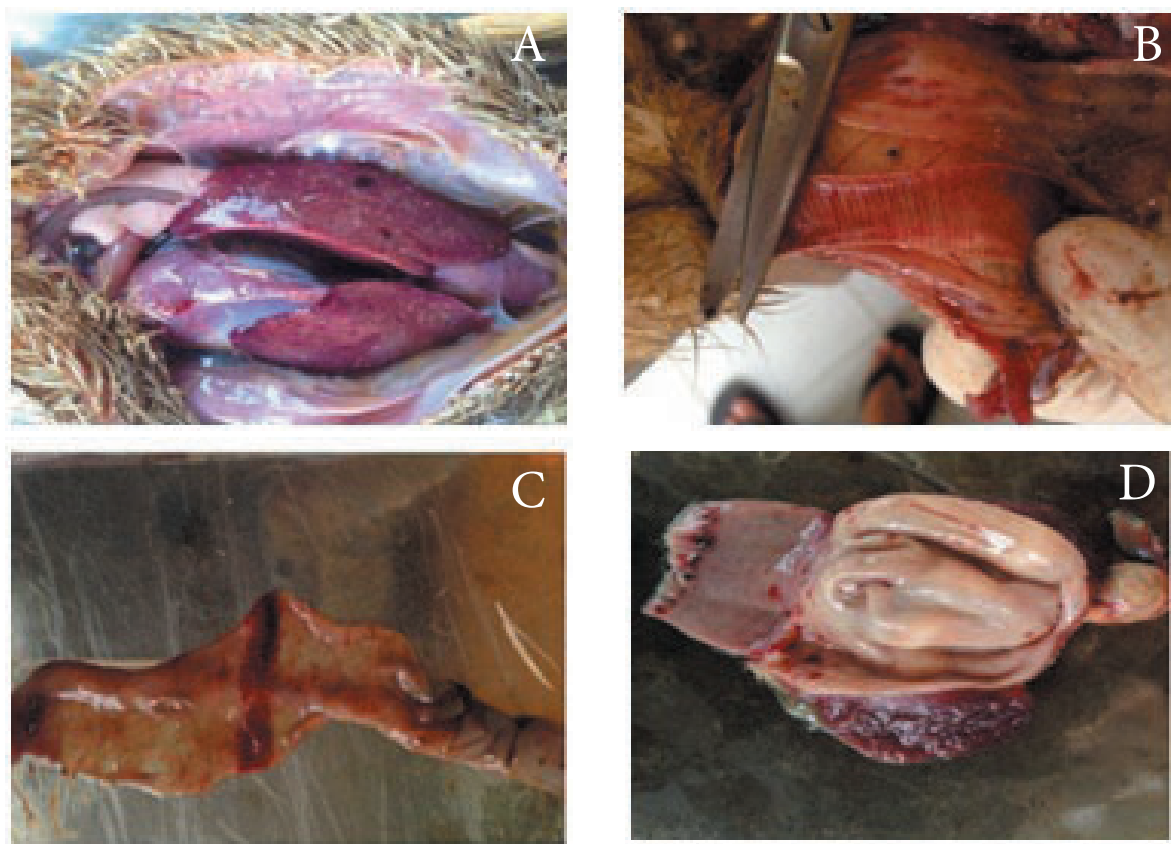
Kết quả theo dõi về triệu chứng lâm sàng của vịt sau khi gây nhiễm chủng virus cường độc dịch tả vịt VG-04 cho thấy tất cả những vịt trước khi chết đều có biểu hiện liệt chân, sưng mắt, chảy nước mắt, nước mũi, một số vịt có biểu hiện phù đầu (hình 1A), sau đó vịt ỉa chảy, phân có mùi tanh khắm (hình 1B).



Hình 1. Kết quả theo dõi về triệu chứng lâm sàng của vịt sau khi gây nhiễm chủng virus cường độc dịch tả vịt VG-04

Kết quả mổ khám lâm sàng để kiểm tra bệnh tích đại thể những vịt chết cho thấy gan xuất huyết và hoại tử (hình 2A), thực quản và khí quản xuất huyết (hình 2B), ruột xuất huyết hình vòng

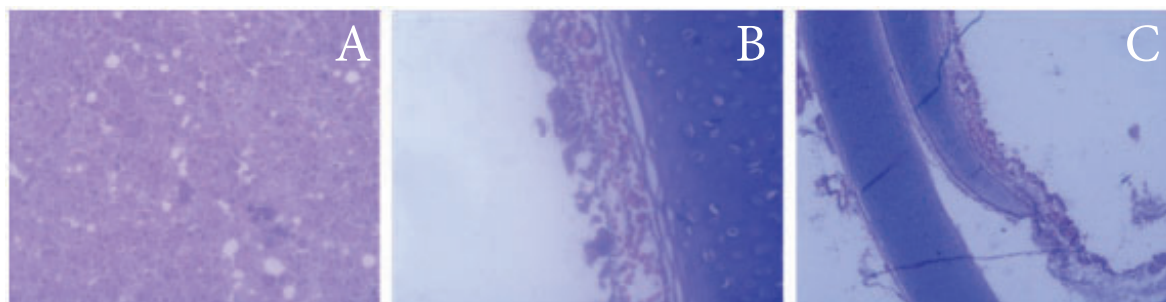
nhẫn (hình 2C), dạ dày tuyến và dạ dày cơ xuất huyết (hình 2D). Kết quả mổ khám cũng cho thấy tim xuất huyết, niêm mạc hậu môn tụ huyết, xuất huyết và loét, thận tụ huyết, tuyến tụy xuất huyết.



Hình 2. Kết quả kiểm tra bệnh tích đại thể của vịt sau khi gây nhiễm chủng virus cường độc dịch tả vịt VG-04

Kết quả kiểm tra bệnh tích vi thể cho thấy gan thoái hóa mỡ (hình 3A), sung huyết biểu

mô khí quản (hình 3B), tế bào biểu mô khí quản bong tróc (hình 3C).

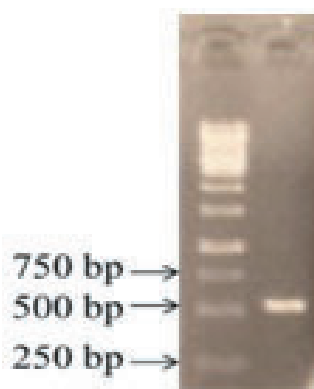


Hình 3. Kết quả kiểm tra bệnh tích vi thể của vịt sau khi gây nhiễm chủng virus cường độc dịch tả vịt VG-04

3.4. Kết quả giám định chủng virus cường độc dịch tả vịt VG-04 bằng kỹ thuật PCR và

giải trình tự gene

3.4.1. Kết quả khuếch đại trình tự đoạn gene US7



Hình 4. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose

M: Marker DNA (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen); giếng 1: Gene US7 (557 bp)

Trong các nghiên cứu về sinh học phân tử thì phản ứng PCR đã và đang là công cụ hữu hiệu dùng để chẩn đoán cũng như khuếch đại các gene khác nhau của virus dịch tả vịt (Hansen và

cs., 1999; Hu và cs., 2009; Zhang và cs., 2011). Trong nghiên cứu này, mẫu DNA của virus cường độc dịch tả vịt VG-04 đã được tách chiết và dùng cho phản ứng PCR để khuếch đại vùng gene US7. Kết quả chạy điện di trên gel agarose cho thấy sản phẩm PCR khi sử dụng cặp mồi DEV-US7F/DEV-US7R đặc hiệu cho gene US7 có kích thước khoảng 557 bp, đúng với kích thước như đã được công bố trước đây (Nguyễn Bá Hiên và cs., 2016) (hình 4).

3.4.2. Kết quả phân tích trình tự gene US7

Theo Wu và cộng sự., (2012), gene US7 được cho là gene có mức độ đa dạng khá cao trong genome của virus dịch tả vịt. Trong nghiên cứu này, gene US7 của chủng virus VG-04 đã được giải trình tự và được so sánh về trình tự nucleotide với các chủng virus dịch tả vịt tham chiếu khác.

Kết quả được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Mức độ tương đồng về trình tự nucleotide vùng gene US7 giữa chủng virus DTV cường độc VG- 04 trong nghiên cứu này với các chủng virus DTV tham chiếu khác trên thế giới

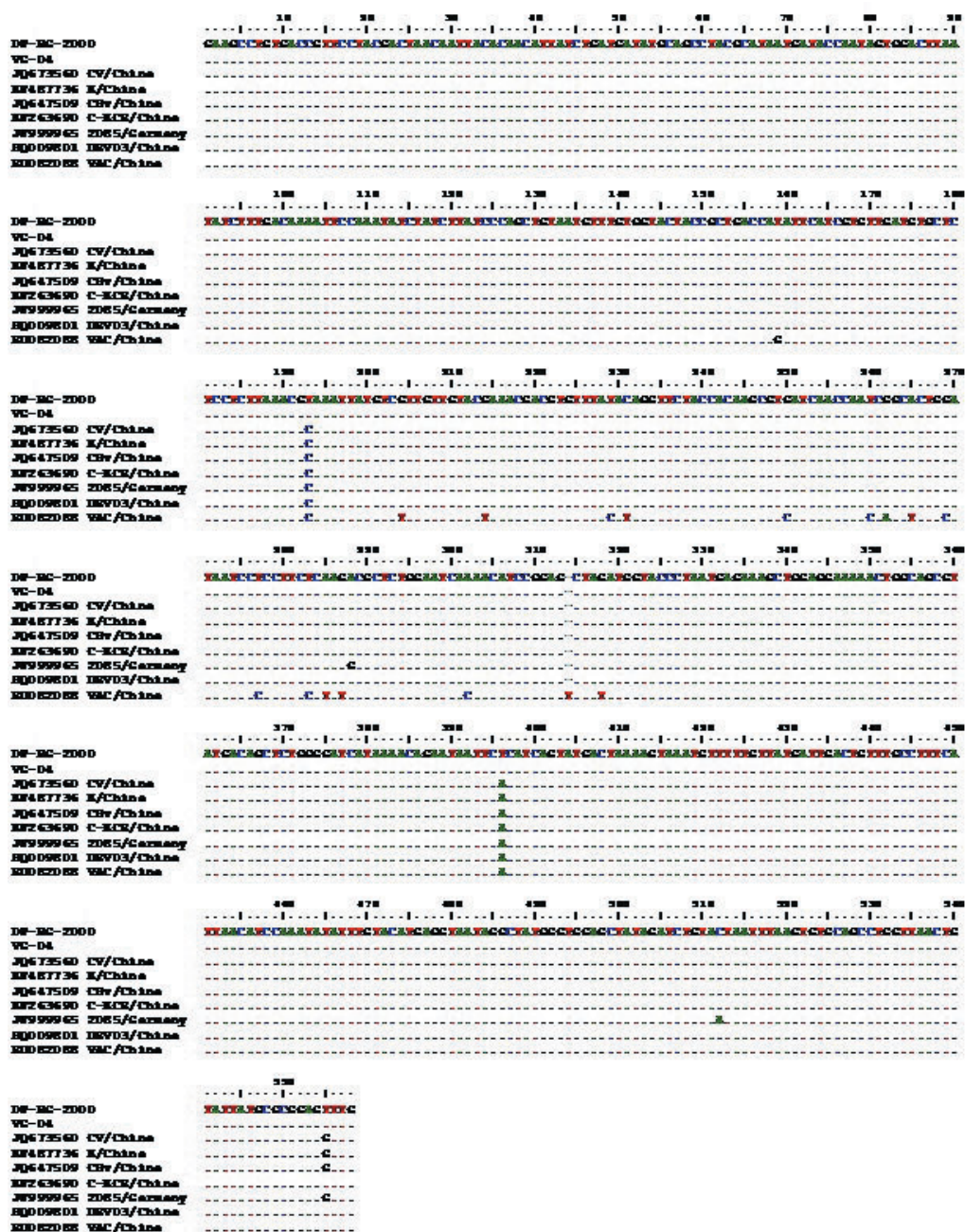
STT	Chủng virus	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	DP-EG-2000									
2	VG-04	100								
3	JQ673560 CV/China	99.4	99.4							
4	KF487736 K/China	99.4	99.4	100						
5	JQ647509 CHv/China	99.4	99.4	100	100					
6	KF263690 C-KCE/China	99.6	99.6	99.8	99.8	99.8				
7	JF999965 2085/Germany	99.1	99.1	99.6	99.6	99.6	99.4			
8	HQ009801 DEV03/China	99.6	99.6	99.8	99.8	99.8	100	99.4		
9	EU082088 VAC/China	96.5	96.5	96.7	96.7	96.7	96.9	96.4	96.9	

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, mức độ tương đồng về trình tự nucleotide vùng gene US7 giữa chủng virus VG-04 và các chủng virus dịch tả vịt tham chiếu khác, dao động trong khoảng từ 96,5% - 99,6%. Kết quả phân tích về trình tự gene US7 cho thấy chủng virus dịch tả vịt

cường độc VG-04 có mức độ tương đồng 100% khi so sánh với chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000 (Nguyễn Bá Hiên và cs., 2016). Khi so sánh với chủng virus dịch tả vịt cường độc CV và CHv của Trung Quốc (mã số truy cập tương ứng trên ngân hàng GenBank:

JQ673560 và JQ647509)(Wu et al., 2012; Yang et al., 2014), tỷ lệ tương đồng về trình tự gene US7 là 99,4%. Tương tự khi so sánh với chủng virus vaccin DEV03 và VAC (mã số truy cập

tương ứng trên ngân hàng GenBank: HQ009801 và EU082088) (Li et al., 2009) của Trung Quốc, tỷ lệ tương đồng về trình tự gene US7 tương ứng là 99,6% và 96,5%.



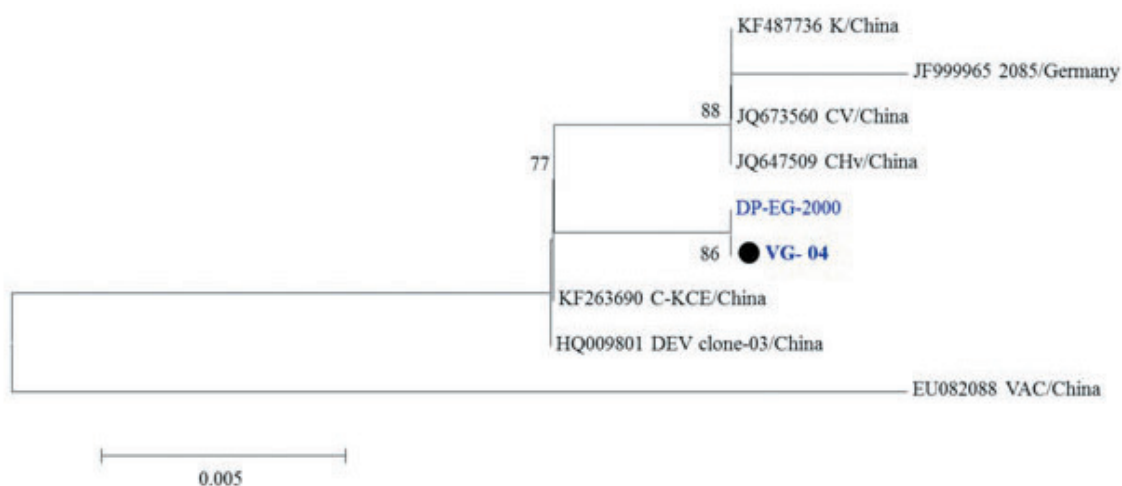
Hình 5. So sánh trình tự vùng gene US7 giữa chủng virus dịch tả vẹt cường độc VG-04 trong nghiên cứu này với các chủng virus dịch tả vẹt tham chiếu khác trên thế giới

Kết quả phân tích về trình tự nucleotide vùng gene US7 cho thấy chủng virus dịch tả vịt cường độc VG-04 hoàn toàn đồng nhất với chủng virus vaccin dịch tả vịt nhược độc DP-EG-2000 của Việt Nam (Nguyễn Bá Hiên và cs., 2016) và sai khác so với các chủng virus tham chiếu còn lại ở 2 vị trí: 193 (T↔C) và 396 (T↔A). Bên cạnh đó, chủng virus VG-04 có sự sai khác so với chủng CV (mã số truy cập ngân hàng GenBank: JQ673560) (Yang et al., 2014), chủng K (mã số truy cập ngân hàng GenBank: KF487736) (Yang et al., 2013), chủng CHv (mã số truy cập ngân hàng GenBank: JQ647509) (Wu et al., 2012) và chủng 2085 (mã số truy cập ngân hàng GenBank: JF999965) (Wang et al., 2011) ở vị trí 555 (T↔G). Ngoài ra, sự sai khác giữa chủng virus VG-04 và chủng 2085 còn xuất hiện thêm ở vị trí 288 (A↔G) và 512 (C↔A). Khác biệt về trình tự nucleotide giữa chủng virus VG-04 và

chủng virus vaccin VAC (Li et al., 2009) đang sử dụng ở Trung Quốc xảy ra ở vị trí nucleotide 159 (T↔G), 204 (G↔T), 214 (G↔T), 229 (T↔C), 231 (C↔T), 250 (G↔C), 260 (T↔C), 262 (G↔A), 265 (A↔T), 269 (G↔C), 277 (T↔C), 283 (T↔C), 285 (A↔T), 287 (A↔T), 302 (A↔C), 318 (G↔T). Đặc biệt, ở chủng virus vaccin VAC xuất hiện đột biến thêm T ở vị trí 314 làm thay đổi khung đọc của vùng gene US7 ở chủng này so với các chủng khác (hình 5).

3.4.3. Kết quả phân tích cây phả hệ (phylogenetic tree) dựa trên trình tự vùng gene US7

Trình tự nucleotide của vùng gene US7 đã được sử dụng để xây dựng cây phả hệ nhằm đánh giá mối quan hệ di truyền giữa chủng virus dịch tả vịt VG-04 với các chủng virus dịch tả vịt tham chiếu khác trên thế giới (hình 6).



Hình 6. Mối quan hệ di truyền giữa chủng virus DTV cường độc VG-04 trong nghiên cứu này với các chủng virus DTV tham chiếu khác trên thế giới dựa trên trình tự gene US7

Kết quả phân tích cây phả hệ ở hình 6 cho thấy chủng virus VG-04 cũng có mối quan hệ di truyền gần gũi với các chủng virus dịch tả vịt phân lập được từ thực địa tại Trung Quốc trong những năm gần đây (chủng K, CV, CHv). Kết quả phân tích này còn cho thấy chủng virus VG-04 nằm cùng nhánh với chủng virus vaccin dịch tả vịt nhược độc DP – EG – 2000 của Việt Nam (Nguyễn Bá Hiên và cs., 2016) và nằm khác

nhánh với chủng virus vaccin VAC của Trung Quốc (Li et al., 2009).

IV. KẾT LUẬN

Chủng virus cường độc dịch tả vịt VG-04 có chỉ số sinh học ELD₅₀ và EID₅₀ ổn định sau những lần cấy chuyển trên phôi trứng vịt 13 ngày tuổi. Chỉ số ELD₅₀ và EID₅₀ trung bình sau 3 lần chuẩn độ tương ứng là 10^{5,29}/0,2 ml và

$10^{7,56}/0,2$ ml. Virus dịch tả vịt cường độc chủng VG-04 có khả năng nhân lên và gây chết vịt thí nghiệm với các triệu chứng và bệnh tích đặc trưng. Chỉ số LD_{50} trung bình là $10^{9,13}/0,5$ ml.

Kết quả phân tích về trình tự nucleotide của đoạn gene US7 cho thấy chủng virus VG-04 có mức độ tương đồng cao khi so sánh với các chủng virus dịch tả vịt tham chiếu khác thu thập được trên ngân hàng GenBank, tỷ lệ tương đồng về nucleotide đạt từ 96,5 – 99,6%. Kết quả thu được từ nghiên cứu này cho thấy có thể sử dụng chủng virus cường độc dịch tả vịt VG-04 phân lập được tại Việt Nam cho thí nghiệm công cường độc để đánh giá hiệu lực của vaccin dịch tả vịt, cũng như cho mục đích giảng dạy và nghiên cứu khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Minh Châu (1980). Chủng virus cường độc 769 và sử dụng vaccin để phòng bệnh, *Luận án PTS Khoa học Nông nghiệp*, Trường Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.
2. Nguyễn Bá Hiên, Lê Văn Phan, Đặng Hữu Anh, Lê Huỳnh Thanh Phương (2016). Một số đặc điểm sinh học và sinh học phân tử của chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt DP – EG – 2000, *Khoa học và kỹ thuật Thú y*, Tập XXIII, số 1, trang 39 - 49.
3. Hansen, W. R., Brown, S. E., Nashold, S. W., and Knudson, D. L. (1999). Identification of duck plague virus by polymerase chain reaction, *Avian diseases*, 106-115.
4. Hu, Y., Zhou, H., Yu, Z., Chen, H. và Jin, M. (2009). Characterization of the genes encoding complete US10, SORF3, and US2 proteins from duck enteritis virus, *Virus Genes*, 38, 295-301
5. Li, Y., Huang, B., Ma, X., Wu, J., Li, F., Ai, W., Song, M. and Yang, H. (2009). Molecular characterization of the genome of duck enteritis virus. *Virology* 391, 151-61.
6. OIE Terrestrial Manual (2010). Duck Virus Hepatitis. Chapter 2.3.8.
7. OIE (2012). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.07_DVE.pdf
8. Wang, J., Hoper, D., Beer, M. and Osterrieder, N. (2011). Complete genome sequence of virulent duck enteritis virus (DEV) strain 2085 and comparison with genome sequences of virulent and attenuated DEV strains, *Virus Res* 160, 316-25.
9. Wu, Y., Cheng, A., Wang, M., Zhu, D., Jia, R., Chen, S., Zhou, Y, Wang and Chen, X. (2012). Comparative genomic analysis of duck enteritis virus strains. *Journal of virology*, 86 (24), 13841-13842.
10. Yang, C., Li, J., Li, Q., Li, H., Xia, Y., Guo, X., Yu, K. and Yang, H. (2013). Complete genome sequence of an attenuated duck enteritis virus obtained by *in vitro* serial passage. *Genome Announcemets* 1.

Nhận ngày 20-6-2016

Phản biện ngày 28-8-2016