

Nghiên cứu khoa học

ĐINH DANH CHỦNG VIRUS GÂY BỆNH VIÊM PHẾ QUẢN TRUYỀN NHIỄM Ở GÀ (INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS) BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ

Nguyễn Trung Tiến^{1}, Hoàng Thị Thu Hương¹, La Thị Hương¹,
Vũ Thị Mỹ Hạnh¹, Phạm Quang Trung,¹ Trần Tiến Quân¹, Tạ Hoàng Long¹,
Đoàn Thị Thanh Hương², Nguyễn Thị Thu Hiền², Vũ Ngọc Hiệu³, Ngô Thị Thu Hương⁴*
**Tác giả liên hệ email: nguyentrungtienkn1@gmail.com*

TÓM TẮT

Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I hiện đang lưu giữ chủng virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm ở gà (Infectious bronchitis virus - IBV) (ký hiệu là IB-NHƯỢC ĐỘC) phục vụ cho kiểm nghiệm, chẩn đoán xét nghiệm và nghiên cứu sản xuất vaccin. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá về đặc tính di truyền của chủng virus trên bằng phương pháp giải trình tự và phân tích gen kháng nguyên S1. Kết quả phân tích nucleotide và phả hệ nguồn gốc cho thấy chủng virus IBV nhược độc đang lưu giữ tại Trung tâm là chủng H120 thuộc dòng Massachuset. Chủng virus IBV đang lưu giữ có mối quan hệ gần gũi với các chủng virus nhược độc H120, với tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và amino acid là từ 99,5% đến 100%. So sánh với các chủng IBV thuộc các dòng/genotype khác, chủng IBV đang lưu giữ có tỷ lệ đồng nhất thấp; chỉ đạt từ 63,2% đến 98,6%.

Từ khóa: Genotype, infectious bronchitis virus, H120, S1, PCR, phả hệ nguồn gốc.

Identification of the infectious bronchitis virus strain in chicken by molecular biology method

*Nguyen Trung Tien, Hoang Thi Thu Huong, La Thi Huong,
Vu Thi My Hanh, Pham Quang Trung, Tran Tien Quan, Ta Hoang Long,
Doan Thi Thanh Huong, Nguyen Thi Thu Hien, Vu Ngoc Hieu, Ngo Thi Thu Huong*

SUMMARY

National Centre for Veterinary Drug and Bio-products Control No.1 is conserving a infectious bronchitis virus - IBV strain in chicken (denoted: attenuated IB) serving for control, diagnosis and vaccine production. In this study, we conducted an assessment of the genetic characteristics of the above virus strain by sequencing and analyzing the S1 antigen gene. The results of nucleotide analysis and genealogy of origin showed that the attenuated IBV strain is being conserved in the above Centre was H120 strain, belonging to massachuset branch. This virus strain related closely to the attenuated H120 strains with the amino acid and nucleotide similarity level were from 99.5 % to 100%. While, the similarity level of the conserved IBV strain in comparison with the IBV strains of other branches/genotypes was low (from 63.2 % to 98.6 %)

Keywords: Genotype, infectious bronchitis virus, H120, S1, PCR, genealogy of origin.

¹ Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I

² Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam

³ Vụ Khoa học, Công nghệ và Môi trường – Bộ Nông nghiệp và PTNT

⁴ Cục Thú y

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm phế quản truyền nhiễm (IB - Infectious Bronchitis) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính ở gà do virus IBV (Infectious bronchitis virus) thuộc nhóm *Gammacoronavirus*, họ *Coronaviridae* gây ra (ICTV, 2016). Bệnh IB được phát hiện lần đầu tiên ở miền Bắc bang Dakota nước Mỹ vào năm 1931. Sau đó virus gây bệnh đã được phân lập và đặt tên là virus Viêm phế quản truyền nhiễm (IBV) (Schalk, Hawn, 1931).

Năm 1937, Beaudette và Hudson lần đầu tiên đã thực hiện cấy chuyển virus trên trứng gà có phôi thành công. Năm 1940, đã có những báo cáo về những triệu chứng hô hấp đặc trưng và sự giảm sản lượng trứng ở những đàn gà đẻ bị nhiễm bệnh. Chủng virus Massachusetts đã được phân lập thành công năm 1941; tiếp theo là chủng Connecticut được phân lập thành công vào năm 1951. Cả hai chủng này gây ra những ca bệnh giống nhau nhưng chúng không có sự bảo vệ chéo hoặc trung hoà chéo. Năm 1960, đã có những báo cáo rõ hơn về bệnh tích ở thận đối với những gà nhiễm bệnh.

Bệnh IB xảy ra quanh năm trên tất cả các giống gà và mọi lứa tuổi với tỷ lệ nhiễm bệnh từ 50-100% đàn gà. Trong đó xảy ra nghiêm trọng nhất ở gà dưới 6 tuần tuổi, và có thể lây lan sang các loại gia cầm khác như vịt, chim bồ câu, chim cút với các triệu chứng điển hình ở đường hô hấp. Ngoài ra, bệnh gây tổn thương thận (đối với virus thể thận) và tổn thương ống dẫn trứng, làm giảm năng suất và chất lượng trứng. Cho đến nay, bệnh đã lưu hành ở khắp các quốc gia, gây tổn thất nặng nề về kinh tế (Cavanagh, 2007; Zhao *et al.*, 2023). Ngoài serotype Massachusetts (Mass), đến nay đã có thêm nhiều sero/genotype mới được công bố trên khắp thế giới (Brazil, Mỹ, Úc, châu Âu, châu Phi, châu Á bao gồm Trung Quốc, Đài Loan, Ấn Độ, Nhật Bản, Hàn Quốc, Thái Lan) (De Wit *et al.*, 2017; Cook *et al.*, 2012). Mặc dù việc tiêm phòng đã được sử dụng rộng rãi, tuy nhiên bệnh IB vẫn là một thách thức đối với ngành chăn nuôi gà trên toàn thế giới (Bande *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2015; Jordan, 2017; Li *et al.*, 2020). Các vấn đề chính là IBV liên tục phát triển thông qua đột biến và tái tổ hợp để tạo ra các biến thể genotype hoặc kiểu huyết thanh, trong khả năng miễn dịch chéo giữa các genotype hoặc serotype đã được xác định là thấp (Jordan, 2017; Li *et al.*, 2020).

Cho đến nay bằng cách giải trình tự và phân tích gen S1 cho thấy IBV gồm 6 kiểu gen (GI-GVI) và chứa 34 dòng virus riêng biệt và một số dòng tái tổ hợp (Valastro *et al.*, 2016). Ở châu Á, bao gồm Nhật Bản, Hàn Quốc, Ấn Độ, Indonesia, Thái Lan và Trung Quốc, các chủng QX-like (GI-19) chiếm ưu thế và tồn tại ở cả sáu quốc gia; tiếp đó 793B (GI-13) là dòng phổ biến thứ hai tồn tại ở năm quốc gia ngoại trừ Hàn Quốc. Các chủng thuộc type Massachuset (GI-1) cũng được phân lập ở Ấn Độ, Indonesia, Thái Lan và Trung Quốc (Bayry *et al.*, 2005; Mase *et al.*, 2022; Nakanishi *et al.*, 2022; Saito *et al.*, 2021; Munyahongse *et al.*, 2020; Setiawaty *et al.*, 2019; Wibowo *et al.*, 2019; Fan *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022; Raja *et al.*, 2020). Ngoài ra, nhiều chủng (dòng) khác cũng được tìm thấy ở một số nước như dòng GVI-1 (TC07-2) ở Hàn Quốc và Trung Quốc, biến thể IBV (GI-24) ở Ấn Độ, D85/06 (GI-15) ở Hàn Quốc, Taiwan I (GI-7) ở Trung Quốc, CU-92 (Biến thể mới) ở Thái Lan và Grey (GI-3), JP-I (GI-18) và JP-II (GI-7) ở Nhật Bản (Mase *et al.*, 2022; Nakanishi *et al.*, 2022; Saito *et al.*, 2021).

Đặc biệt ở Trung Quốc, IBV lần đầu tiên được mô tả và phân lập từ gà vào đầu những năm 1980. Virus hiện đã lây lan ra tất cả các khu vực chăn nuôi gia cầm. Bệnh IB đứng đầu hoặc thứ hai trong số các bệnh truyền nhiễm quan trọng của gia cầm trong thống kê hàng năm ở Trung Quốc và gây thiệt hại kinh tế đáng kể. Hiện tại, có ít nhất bốn dòng IBV chính, bao gồm QX-type (GI-19), Taiwan I (GI-7), TC07-type (GVI-1) và 793B-type (GI-13) cùng tồn tại trong các trang trại gà (Li *et al.*, 2020; Fan *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022).

Tại Việt Nam, bệnh IB rất được quan tâm trong những năm gần đây. Các nghiên cứu về giải mã gen cho thấy IBV ở Việt Nam cũng gồm có nhiều dòng và nhiều genotype khác nhau, bao gồm: các chủng thuộc serotype Massachuset (dòng H120) (Võ Thị Trà An *et al.*, 2012); serotype 793B (dòng 4/91) (Võ Thị Trà An *et al.*, 2012; Trần Ngọc Bích *et al.*, 2017); các chủng Q1-like, QX-like và TC07-02-like (Nguyễn Thị Loan *et al.*, 2017; Nguyễn Thị Loan, 2019). Các loại vacxin đang sử dụng tại Việt Nam chủ yếu gồm các chủng virus sống giảm độc lực thuộc loại H120 và 4/91.

IBV có hệ gen là RNA sợi đơn dương, kích thước khoảng 27 kb. Virion của virus gồm bốn loại protein

cấu trúc là: protein gai (Spike, S), protein màng (Membrane, M), protein nhân (Nucleocapsid, N) và protein vỏ (Envelope, E). Trong đó gen S có kích thước khoảng 3,5 kb; là gen kháng nguyên của virus, nằm ngay trên bề mặt của vỏ virus, mã hóa cho protein S có kích thước 1145 amino acid, có vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh sự tương tác với thụ thể tế bào vật chủ và chứa các vùng quyết định kháng nguyên kích thích tạo kháng thể trung hòa. Gen S gồm hai tiểu phần gen là S1 và S2. Gen S1 có kích thước 1560 bp và chứa các vùng quyết định kháng nguyên của virus. Do đó, toàn bộ gen S hoặc tiểu phần gen S1 thường được sử dụng để tạo kháng nguyên và vaccin phòng bệnh IBV. Đồng thời vùng gen S1 cũng được chứng minh là vùng biến đổi nhất giữa các chủng virus khác nhau nên được sử dụng cho phân tích đa dạng di truyền và phả hệ nguồn gốc (Cavanagh, 2007; Saraiva *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2018).

Trong nghiên cứu này bằng phương pháp giải trình tự và phân tích gen S1, chúng tôi đã định danh chính xác chủng IBV đang lưu giữ tại Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I, từ đó xây dựng bộ hồ sơ chủng giống chuẩn cho các nghiên cứu và công tác kiểm nghiệm, khảo nghiệm vaccin.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu dùng trong nghiên cứu

- Chủng IBV nhược độc đang lưu giữ tại Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I, được ký hiệu là IB-NHƯỢC ĐỘC.

- Hóa chất và sinh phẩm dùng trong nghiên cứu bao gồm bộ kit tách chiết RNA tổng số GeneJET RNA purification Kit của hãng Thermo (Mỹ); bộ kit chuyển đổi cDNA của hãng Fermentas, Mỹ; (2X) Dream Taq Buffer dùng cho phản ứng PCR và bộ kit GeneJET PCR Purification Kit dùng để tinh sạch sản phẩm PCR.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Thiết kế môi và thu nhận gen kháng nguyên S1 của mẫu IBV nhược độc nghiên cứu.

- Phân tích phả hệ nguồn gốc, định type chủng virus IBV đang lưu giữ tại Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I.1100

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Tách chiết RNA

RNA được tách chiết bằng bộ kit GeneJET RNA purification Kit của hãng Thermo (Mỹ). Mô tả ngắn gọn như sau: Bổ sung 300µl Lysis Buffer (đã bổ sung β-mercaptoethanol) vào ống eppendorf chứa mẫu, lắc hỗn dịch trong 15 giây. Bổ sung tiếp 600µl proteinase K solution, lắc hỗn dịch trong 15 giây cho đến khi mẫu tan hoàn toàn rồi ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Ly tâm 10 phút ở 12000 vòng/phút, chuyển dịch nổi sang ống eppendorf mới. Tủa dịch bằng 450µl cồn EtoH (abs), lắc nhẹ bằng tay rồi chuyển hỗn dịch sang cột lọc, ly tâm 12.000 vòng/phút, bỏ dịch ly tâm bên dưới. Rửa DNA bằng 700µl Wash Buffer 1, ly tâm 12000 vòng/phút, bỏ dịch phía dưới ống hứng. Cho 650µl Wash Buffer 2 vào cột lọc để tiếp tục rửa DNA, ly tâm 12000 vòng/phút trong một phút, bỏ dịch bên dưới ống hứng. Chuyển cột lọc sang ống eppendorf mới. Bổ sung 30µl nước tinh khiết được cung cấp theo bộ kit, để ở nhiệt độ phòng 4-5 phút, sau đó ly tâm 13.000 vòng/phút trong 2 phút. Bỏ cột, thu dịch bên dưới là RNA của virus. Ghi ký hiệu mẫu và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

2.3.2. Chuyển đổi cDNA

RNA tổng số được chuyển đổi thành DNA (cDNA) sử dụng môi xúc tác hexamer (Thermo Scientific) với chu trình: 56°C/60 phút; và vô hoạt ở 85°C/5 phút.

2.3.3. Thiết kế môi và thực hiện phản ứng PCR

Cặp môi được thiết kế dựa trên so sánh trình tự tương đồng chuỗi nucleotide gen S1 của các chủng IBV đăng ký trên Ngân hàng Gen sử dụng phần mềm Gendoc 2.7. Trình tự môi được tổng hợp tại Công ty cổ phần Phù Sa Genomics.

Phản ứng PCR thực hiện với môi xuôi IBVHS1F (5'-GAACAAAAGACCGACTTAGT-3') và môi ngược IBVHS1R (5'-TATGTACTCATCTGTRACAGT-3'), thu vùng gen S1, kích thước khoảng 1,9 kb với chu trình nhiệt: một chu kỳ ở 94°C/5 phút, 35 chu kỳ [94°C/1 phút, 50°C/30 giây, 72°C/2 phút 30 giây], và một chu kỳ cuối ở 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên thạch agarose 1% (w/v), nhuộm ethidium bromide và quan sát trên máy soi gel dưới ánh sáng tia cực tím (Wealtech, Mỹ). MJ PTC-100 (USA).

2.3.4. Tinh sạch và giải trình tự gen

Tinh sạch sản phẩm PCR bằng bộ sinh phẩm GeneJET PCR Purification kit (Thermo, Mỹ) và gửi đọc trình tự trực tiếp tại Công ty TNHH DV & TM Nam Khoa.

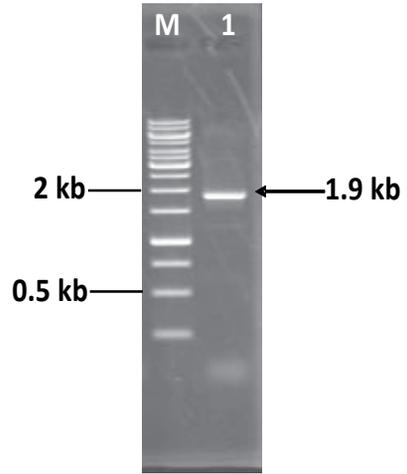
2.3.5. Phân tích và xử lý số liệu

Các trình tự gen S1 của các chủng IBV trên Ngân hàng Gen được sử dụng để so sánh đối chiếu với các chuỗi gen thu được trong nghiên cứu này bằng chương trình GENEDOC2.7 (Nicholas KB và Nicholas HB, 1997). Cây phả hệ nguồn gốc xây dựng trên trình tự gen S1 của chủng IBV nhược độc nghiên cứu và các chủng IBV trên Ngân hàng Gen bằng phần mềm Mega 6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả PCR và giải trình tự gen S1 của mẫu nghiên cứu

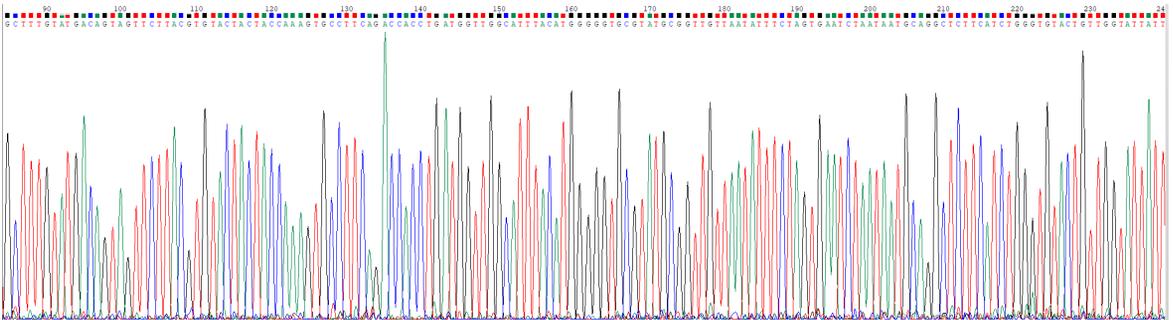
Sử dụng cặp mồi đã thiết kế, sản phẩm PCR thu được từ mẫu nghiên cứu có kích thước khoảng 1,9 kb; đúng như tính toán ban đầu.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân gen S1 mẫu virus IB-NHUỘC ĐỘC

Ghi chú: giếng M: thang DNA chuẩn (DNA của thực khuẩn thể λ được cắt bằng enzyme HindIII); giếng 1: chủng IB-NHUỘC ĐỘC nghiên cứu.

Kết quả điện di ở hình 1 cho thấy chất lượng tốt, băng DNA sáng, đơn băng.



Hình 2. Giải trình tự nucleotide gen S1 của chủng IB-NHUỘC ĐỘC bằng phương pháp Sanger

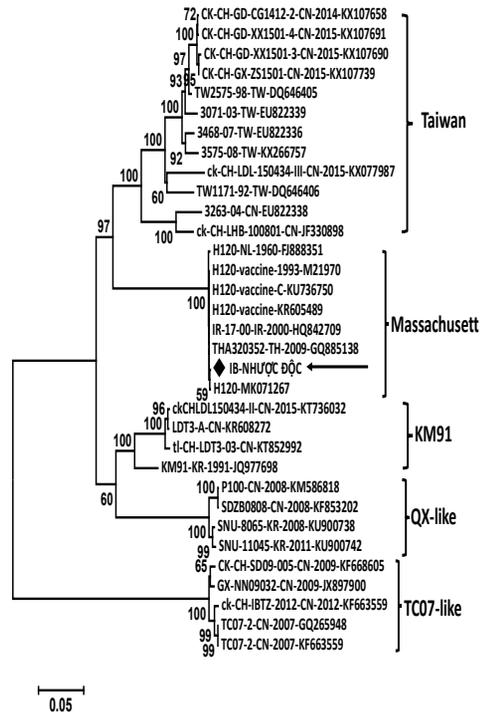
Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được giải trình tự trực tiếp bằng phương pháp Sanger để thu được trình tự vùng gen S1 gồm 1690 nucleotide của chủng IBV nhược độc nghiên cứu (hình 2).

Các trình tự nucleotide thu nhận được truy cập vào Ngân hàng Gen sử dụng chương trình BLAST để tìm kiếm các chuỗi gen có tỷ lệ tương đồng cao. Kết quả cho thấy chủng IBV nhược độc nghiên cứu đồng nhất cao với các chủng IBV trên Ngân hàng Gen. Do đó có thể xác định chủng giống IBV nhược độc lưu giữ tại Trung tâm Kiểm nghiệm

thuốc thú y Trung ương I là IBV (Infectious Bronchitis Virus). Trình tự nucleotide gen S1 của chủng IB-NHUỘC ĐỘC được đăng ký trên Ngân hàng gen với mã số OR333972.

3.2. Phân tích mối quan hệ phả hệ nguồn gốc

Để xác định chủng virus đang lưu giữ, chúng tôi đã xây dựng phả hệ nguồn gốc của chủng IB-NHUỘC ĐỘC nghiên cứu với 32 chủng IBV trên Ngân hàng Gen thuộc các type khác nhau, sử dụng chuỗi nucleotide gen S1 (gồm 1690 nucleotide). Kết quả được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ nguồn gốc giữa chủng IB-NHƯỢC ĐỘC nghiên cứu và các chủng IBV có trong Ngân hàng Gen dựa trên trình tự nucleotide của gen S1

Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc (hình 3) cho thấy các chủng IBV rất đa dạng và phức tạp, gồm nhiều nhóm di truyền khác nhau. Bên cạnh các nhóm di truyền chính còn có thêm các nhóm phụ.

Nhóm Massachuset gồm các chủng IBV của rất nhiều nước trên thế giới bao gồm chủ yếu là Mỹ, Úc, Ý, Hà Lan, Trung Quốc, Ấn Độ, Việt Nam và các chủng vacxin H120. Đây là genotype được công bố đầu tiên trên thế giới và vẫn rất phổ biến cho đến nay. Chủng IBV nhược độc nghiên cứu thuộc nhóm này.

Nhóm các chủng thuộc dòng QX-like gồm các chủng của nhiều nước khác nhau: Trung Quốc, Việt Nam, Ba Lan, Thụy Điển và Bắc Phi. Kết quả phân tích này hoàn toàn phù hợp với các báo cáo trước của thế giới, genotype QX-like có độc lực cao, xuất phát từ Trung Quốc và đã lây truyền qua nhiều nước. Một số chủng IBV phân lập tại Việt Nam thuộc nhóm này.

Dòng KM-91 gồm phần lớn các chủng của Trung Quốc và chủng KM91 của Hàn Quốc. Đây là

genotype phổ biến tại Hàn Quốc hiện nay.

Dòng Taiwan mới được công bố gần đây. Trong nhóm này gồm hầu hết các chủng của Đài Loan, Trung Quốc.

Dòng Q1-like gồm các chủng của Trung Quốc, Ý và Ba Lan. Theo các công bố trước đây, chủng Q1-like được phân bố ở nhiều nước trên thế giới, trong đó có Việt Nam.

Dòng TC07-like tập hợp các chủng của Trung Quốc.

Kết quả so sánh tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và amino acid gen S1 cho thấy chủng IBV nhược độc nghiên cứu có tỷ lệ đồng nhất cao với các chủng trong cùng nhóm Massachuset (99,5% - 99,8% về nucleotide và từ 99,6% - 100% về amino acid). Tuy nhiên khi so sánh với các chủng IBV thuộc các dòng/genotype khác, chủng IBV nhược độc nghiên cứu có tỷ lệ đồng nhất thấp hơn các về nucleotide và amino acid, và thấp nhất khi so sánh với các chủng thuộc dòng TC07-like (trên 60%) (bảng 1).

Trong nhiều thập kỷ trước đây, việc xác định và phân loại di truyền IBV không có các tiêu chí rõ ràng. Ngày nay, dựa trên phương pháp sinh học phân tử, đặc biệt là trên dữ liệu gen S1, đã định danh và xếp loại chính xác các chủng IBV (Valastro *et al.*, 2016).

Tại Việt Nam, nghiên cứu sinh học phân tử về IBV đã bắt đầu được quan tâm nghiên cứu và đã xác định sự lưu hành của nhiều biến chủng IBV khác nhau. Hầu hết các trang trại đều tuân thủ việc tiêm vaccin phòng IBV. Một số nghiên cứu phát triển vaccin trong nước cũng đã được triển khai. Chính vì vậy việc định danh chính xác chủng IBV tại Việt Nam có ý nghĩa khoa học và giá trị thực tiễn cao, là nguồn gen cho công tác nghiên cứu và phục vụ kiểm nghiệm, phát triển sản xuất vaccin trong nước.

IV. KẾT LUẬN

Chủng IBV nhược độc (ký hiệu IB-NHUỘC ĐỘC) lưu giữ tại Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I được xác định là virus Viêm phế quản truyền nhiễm ở gà (Infectious Bronchitis Virus), chủng H120 thuộc dòng Massachusetts.

Trình tự nucleotide gen S1 của chủng IB-NHUỘC ĐỘC được đăng ký trên Ngân hàng Gen, mã số OR333972.

Lời cảm ơn: Bài báo này được thực hiện từ nguồn kinh phí của nhiệm vụ “Bảo tồn, lưu giữ nguồn gen vi sinh vật thú y năm 2023”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Thị Trà An, Nguyễn Thị Kim Yên, Hồ Hoàng Dũng, 2012. Phân lập, định serotype virus viêm phế quản truyền nhiễm từ gà thịt. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y* 19 (3): 5-9.
2. Nguyễn Thị Loan, Lê Đình Quyền, Dương Hồng Quân, Lê Huỳnh Thanh Phương, Nguyễn Bá Hiên, Lê Văn Phan, 2016. Ứng dụng kỹ thuật RT-PCR để chẩn đoán bệnh viêm phế quản truyền nhiễm (infectious bronchitis) ở gà đẻ trứng tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 14: 1387-1394.
3. Bich TN, Khanh NP, Dung PH, Loan NTC, 2017. Molecular characterization of infectious bronchitis virus (IBV) isolated from commercial chicken farms. *Can Tho University Journal of Science* 6: 56-62.
4. Cavanagh D, 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.*, 38, 281–297.
5. Jing Zhao, Ye Zhao and Guozhong Zhang, 2023. Key Aspects of Coronavirus Avian Infectious Bronchitis Virus. *Pathogens* 12.
6. Bande, F., Arshad, S.S., Omar, A.R., Hair-Bejo, M., Mahmuda, A., Nair, V., 2017. Global distributions and strain diversity of avian infectious bronchitis virus: A review. *Anim. Health Res. Rev.* 2017, 18, 70–83.
7. Zhao, Y., Cheng, J.L., Liu, X.Y., Zhao, J., Hu, Y.X., Zhang, G.Z., 2015. Safety and efficacy of an attenuated Chinese QX-like infectious bronchitis virus strain as a candidate vaccine. *Vet. Microbiol.* 2015, 180, 49–58.
8. Jordan, B, 2016. Vaccination against infectious bronchitis virus: A continuous challenge. *Vet. Microbiol.* 2017, 206, 137–143.
9. Li, Y.T., Chen, T.C., Lin, S.Y., Mase, M., Murakami, S., Horimoto, T., Chen, H.W, 2020. Emerging lethal infectious bronchitis coronavirus variants with multiorgan tropism. *Transbound. Emerg. Dis.* 2020, 67, 884–893.
10. Mase, M., Hiramatsu, K., Watanabe, S., Iseki, H, 2022. Genetic analysis of the complete S1 gene in Japanese infectious bronchitis virus strains. *Viruses* 2022, 14, 716.
11. Nakanishi, M., Soma, J., Takahashi, S., Matsune, K., Ono, M., Oosumi, T, 2022. Detection and isolation of QX-like infectious bronchitis virus in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2022, 84, 1520–1526.

12. Saito, H., Nakagawa, K., Kitamura, Y., Kuwata, K., Tanaka, E., 2022. Molecular survey of infectious bronchitis virus on poultry farms in Gifu Prefecture, Japan from 2021 to 2022 by RT-PCR with an enhanced level of detection sensitivity for the S1 gene. *J. Vet. Med. Sci.* 2022, 84, 1157–1163.
13. Munyahongse, S., Pohuang, T., Nonthabenjawan, N., Sasipreeyajan, J., Thontiravong, A., 2020. Genetic characterization of infectious bronchitis viruses in Thailand, 2014–2016: Identification of a novel recombinant variant. *Poult. Sci.* 2020, 99, 1888–1895.
14. Setiawaty, R., Soejoedono, R.D., Poetri, O.N., 2019. Genetic characterization of S1 gene of infectious bronchitis virus isolated from commercial poultry flocks in West Java, Indonesia. *Vet. World* 2019, 12, 231–235.
15. Wibowo, M.H., Ginting, T.E., Asmara, W., 2019. Molecular characterization of pathogenic 4/91-like and QX-like infectious bronchitis virus infecting commercial poultry farms in Indonesia. *Vet. World* 2019, 12, 277–287.
16. Feng, J., Hu, Y., Ma, Z., Yu, Q., Zhao, J., Liu, X., Zhang, G., 2012. Virulent avian infectious bronchitis virus, People's Republic of China. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 8, 1994–2001.
17. Fan, W., Chen, J., Zhang, Y., Deng, Q., Wei, L., Zhao, C., Lv, D., Lin, L., Zhang, B., Wei, T., *et al.*, 2022. Phylogenetic and spatiotemporal analyses of the complete genome sequences of avian coronavirus infectious bronchitis virus in China during 1985–2020: Revealing coexistence of multiple transmission chains and the origin of LX4-type virus. *Front. Microbiol.* 2022, 13, 693196.
18. Wang, C.Y., Luo, Z.B., Shao, G.Q., Hou, B., 2022. Genetic and pathogenic characteristics of a novel infectious bronchitis virus strain in genogroup VI (CK/CH/FJ/202005). *Vet. Microbiol.* 2022, 266, 109352.
19. Bayry, J., Goudar, M.S., Nighot, P.K., Kshirsagar, S.G., Ladman, B.S., Gelb, J., Jr., Ghalsasi, G.R., Kolte, G.N., 2005. Emergence of a nephropathogenic avian infectious bronchitis virus with a novel genotype in India. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 916–918.
20. Raja, A., Dhinakar Raj, G., Kumanan, K., 2020. Emergence of variant avian infectious bronchitis virus in India. *Iran. J. Vet. Res.* 2020, 21, 33–39.
21. Li, Y.T., Chen, T.C., Lin, S.Y., Mase, M., Murakami, S., Horimoto, T., Chen, H.W., 2020. Emerging lethal infectious bronchitis coronavirus variants with multiorgan tropism. *Transbound. Emerg. Dis.* 2020, 67, 884–893.
22. Zhang, X., Guo, M., Zhao, J., Wu, Y., 2021. Avian infectious bronchitis in China: Epidemiology, vaccination, and control. *Avian Dis.* 2021, 65, 652–656.

Ngày nhận: 8-8-2023

Ngày phản biện: 11-8-2023

Ngày đăng: 1-1-2024