

Nghiên cứu khoa học

NGHIÊN CỨU TẠO CHẾ PHẨM KHÁNG THỂ IGY KHÁNG VIRUS TEMBUSU GÂY HỘI CHỨNG GIẢM ĐỂ TRÊN VỊT

*Đặng Anh Việt¹, Phạm Thái Bình^{1,4}, Trà Toàn¹,
Nguyễn Thị Bích Thuởng¹, Nguyễn Thị Mỹ Trinh², Nguyễn Xuân Hòa³,
Huỳnh Thị Kim Loan¹, Trần Thị Lợi¹, Ngô Quốc Cường^{1*}*

**Tác giả liên hệ email: quoccuong@repbiotech.com*

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm sản xuất kháng thể lòng đỏ trứng (IgY) đặc hiệu với virus tembusu (TMUV) từ các gà mái được gây miễn dịch bằng đường tiêm các chủng TMUV bất hoạt phân lập được từ thực địa. Chủng virus TMUV- REP.V1.01.22 với liều gây chết 50% phôi vịt - ELD₅₀ là 10^{-5.32} khi được bất hoạt hoàn toàn bằng binary ethylenimine (BEI) 0,2% ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Gà mái giống ISA Brown 20 tuần tuổi được sử dụng để gây tối miễn dịch và thu trứng sản xuất kháng thể với hiệu giá cao, khi tiêm kháng nguyên bất hoạt TMUV- REP.V1.01.22 với liều 100 ELD₅₀, lặp lại 3 lần, mỗi lần cách nhau 2 tuần thì gà mái cho hiệu giá kháng thể TMUV đạt cao nhất (9,89 log₂), kéo dài và ổn định. Hiệu giá kháng thể IgY trung bình trong lòng đỏ trứng được thu từ gà mái gây miễn dịch, sau khi tinh sạch đạt 7,63 log₂. Kháng thể lòng đỏ trứng IgY này kháng lại virus Tembusu mở ra cơ hội trong phòng, chống bệnh Tembusu trên vịt.

Từ khóa: Virus tembusu, IgY tinh sạch.

Research on creating antibodies (IgY) against tembusu virus causing egg laying reduction syndrome in ducks

*Dang Anh Viet, Pham Thai Binh, Tra Toan,
Nguyen Thi Bích Thuong, Nguyen Thi My Trinh, Nguyen Xuan Hoa,
Huynh Thi Kim Loan, Tran Thi Loi, Ngo Quoc Cuong*

SUMMARY

The objective of this study aimed to produce specific egg yolk antibodies (IgY) to tembusu virus from the immunized hens by the route of injecting TMUV strains isolated from the field. Virus strain TMUV-REP.V1.01.22 with a 50% lethal dose for duck embryos (ELD₅₀) was 10^{-5.32} when it was completely inactivated by binary ethylenimine (BEI) 0.2%, at a temperature of 37°C for 24 hours. Twenty-week-old ISA brown breed hens were used to induce immunity and collect eggs that produced antibodies with high titers when injecting inactivated antigen: TMUV- REP.V1.01.22 with a dose of 100 ELD₅₀, repeated 3 times, each time 2 weeks apart, the hens gave the highest TMUV antibody titer (9.89 log₂), lasting and stable. The average IgY antibody titer in egg yolks was collected from the immunized hens, after purification, reached 7.63 log₂. Egg yolk IgY antibodies against Tembusu virus open up opportunities in the prevention and control of Tembusu disease in ducks.

Keywords: Tembusu virus, IgY purification.

¹ Công ty cổ phần Công nghệ Sinh học R.E.P

² Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

³ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

⁴ Đại học Y Dược TP. HCM

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chăn nuôi chiếm một vai trò trọng yếu trong sản xuất nông nghiệp, trong đó chăn nuôi vịt siêu thịt và vịt đẻ đang là một hướng mới cho nhà chăn nuôi. Theo thống kê của Cục Chăn nuôi vào cuối năm 2022, tổng đàn thủy cầm trên 103 triệu con chiếm 20% tổng đàn gia cầm trong cả nước, tăng 14,58% so với cùng kỳ năm trước, trong đó thủy cầm nuôi lấy thịt chiếm gần 65% và thủy cầm đẻ trứng chiếm hơn 35% tổng đàn thủy cầm. Sự phát triển nhanh chóng của ngành chăn nuôi thủy cầm dẫn đến nguy cơ sự bùng phát của nhiều loại dịch bệnh nguy hiểm như bệnh Tembusu, bệnh bại huyết, viêm gan do virus.

Bệnh do virus tembusu (TMUV) gây ra lần đầu tiên bùng dịch vào năm 2010 ở Trung Quốc, đến tháng 3 năm 2019 các ca bệnh liên quan đến TMUV lần đầu tiên được báo cáo ở Việt Nam (Đặng Hữu Anh và cs., 2020). TMUV được phân lập từ loài muỗi *Culex tritaeniorhynchus* tại Malaysia, thuộc chi *Flavivirus*, *Flaviviridae* (Zhang *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2011). Bệnh do TMUV gây ra là căn bệnh truyền nhiễm ở vịt, với các triệu chứng giảm đẻ đột ngột, giảm ăn, tiêu chảy phân xanh, chảy nước mũi, mất điều hòa hoạt động và bại liệt. Tỷ lệ mắc bệnh khoảng 90% và tỷ lệ chết từ 5% - 30% (Cao *et al.*, 2011).

Để ngăn chặn, khống chế dịch bệnh do TMUV, nhiều biện pháp đã được đề ra như sử dụng vaccin, tăng cường miễn dịch cho vật nuôi, tiêu độc khử trùng, diệt côn trùng, tuy nhiên theo xu hướng chăn nuôi sạch, hạn chế sử dụng kháng sinh, hóa chất trong chăn nuôi, tăng cường sử dụng các biện pháp sinh học, sử dụng kháng thể là liệu pháp tiềm năng trong phòng và điều trị bệnh. IgY là một kháng thể được tìm thấy với hàm lượng cao trong lòng đỏ trứng gà. Giống như các loại kháng thể khác, kháng thể IgY là một lớp protein được hình thành với hệ miễn dịch khi phản ứng lại những yếu tố bên ngoài và đặc hiệu với các yếu tố đó. Kháng thể IgY đã được chứng minh mang lại hiệu quả điều trị gà khi gây bệnh thực nghiệm với virus Gumboro, 9/10 gà

được điều trị bằng kháng thể IgY sống sót sau khi tiêm virus Gumboro cường độc (Vũ Thị Thu Hằng và cs., 2019). Kháng thể Newcastle sau khi tinh chế (hiệu giá kháng thể $> 8 \log_2$) có khả năng phòng và điều trị bệnh Newcastle (Nguyễn Văn Tâm và cs., 2020). Ngoài ra, quy trình tạo chế phẩm kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng đơn giản, tiết kiệm chi phí và sản lượng cao, nên có thể làm giảm giá thành sản xuất của kháng thể.

Trước nhu cầu thực tiễn, nghiên cứu này được tiến hành nhằm sản xuất kháng thể lòng đỏ trứng IgY đặc hiệu với TMUV từ các gà mái được gây miễn dịch bằng đường tiêm các chủng TMUV phân lập từ thực địa.

II. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Kháng nguyên TMUV: Chủng TMUV REP.V1.01.2022 phân lập từ mẫu vịt bệnh của vùng Đông Nam bộ Việt Nam, mã số GenBank OQ451462 được bất hoạt bằng binary ethylenimine (BEI) dùng làm kháng nguyên.

Tế bào: tế bào muỗi *Aedes albopictus* dòng C6/36 ATCC do Viện Pasteur TP.HCM cung cấp được sử dụng để đánh giá kháng nguyên bất hoạt.

Trứng vịt đã có phôi 10-12 ngày tuổi.

Gà mái giống ISA Brown 20 tuần được sử dụng để gây miễn dịch và thu trứng sản xuất kháng thể.

Túi thẩm tích: Dialysis tubing cellulose membrane, Sigma-Aldrich, code D9777.

Thiết bị: Tủ ấm 28°C, 37°C, tủ an toàn sinh học cấp 2, máy ly tâm và các thiết bị tại phòng Nghiên cứu và Phát triển sản phẩm, Trung tâm Phân tích – kiểm nghiệm – xét nghiệm – tầm soát R.E.P, Công ty Cổ phần Công nghệ sinh học R.E.P.

Dụng cụ: Khay nhựa 96 giếng đáy chữ U, pipet một kênh 100, 200, 1.000 μ L, pipet đa kênh 0-200 μ L, đầu type 10, 200, 1.000 μ L, đèn soi trứng...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn độ TMUV trên phôi vịt bằng phương pháp xác định liều gây chết 50% (ELD₅₀: Embryo Lethal Dose).

Chuẩn bị phôi vịt 10-12 ngày tuổi: trứng vịt sạch được thu từ những đàn vịt khỏe mạnh, chưa được tiêm phòng vacxin TMUV. Trứng sau khi được thu gom và mang về phòng thí nghiệm được rửa sạch bằng nước cất, sau đó sát trùng bề mặt bằng ethanol 70° và áp trong tủ ẩm ở 37°C. Trứng được ấp sau 3-5 ngày, mỗi ngày tiến hành soi trứng bằng đèn soi trứng để loại bỏ những trứng hư, trứng không có phôi. Sau 10-12 ngày chọn 50 trứng có phôi khỏe mạnh dùng để gây nhiễm TMUV.

Nguyên tắc: Pha loãng huyền dịch virus bằng cách lấy 0,1mL dung dịch virus cho vào 0,9mL dung dịch PBS (pH=7,2) để được nồng độ pha loãng 10⁻¹, tiếp tục pha loãng huyền dịch virus từ nồng độ 10⁻² đến 10⁻⁹. Mỗi nồng độ pha loãng được tiêm vào 5 trứng và tiến hành soi trứng mỗi ngày, loại bỏ những phôi chết trước 24 giờ, ghi nhận số phôi còn sống và số phôi đã chết ở mỗi nồng độ.

Cách tính liều ELD₅₀: Theo phương pháp của Reed và Muench (1938).

$$dp = (50 - L < 50\%) / (L > 50\% - L < 50\%)$$

$$Lg \text{ ELD}_{50} = Lg \text{ ELD} < 50\% + dp \times Lgf$$

Trong đó:

dp: Proportion dose

L < 50%: Phần trăm tử số chết cận dưới 50%

L > 50%: Phần trăm tử số chết cận trên 50%

Lgf: Lg 10 = 1.

Bất hoạt chủng TMUV

Binary ethylenimine (BEI) được sử dụng để bất hoạt chủng TMUV. Chuẩn bị dung dịch gốc bằng BEA (2-bromoethylamine hydrobromide) 10% cách cân 2g BEA cho vào 20mL dung dịch NaOH 0,2N vô trùng. Khuấy tan và đun dung dịch BEA 10% trong bể cách thủy 37°C trong 2 giờ để quá trình chuyển hóa thành BEI. Dung

dịch gốc cần chuẩn bị trước mỗi lần bất hoạt và bảo quản ở 4°C trong 1 tháng. Bổ sung BEI 10% vào hỗn dịch TMUV để đạt nồng độ cuối cùng là 0,2% (Valero *et al.*, 2021). Thử nghiệm bất hoạt TMUV được thực hiện ở 4°C và 37°C trong 12, 24, 36 và 48 giờ. Sau khi thời gian ủ của mỗi thí nghiệm trung hòa lượng BEI khi kết thúc bất hoạt bằng sodium thiosulphate, nồng độ cuối cùng là 1%, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Mỗi nghiệm thức bất hoạt sẽ tiến hành nuôi cấy vào tế bào muỗi *Aedes albopictus* dòng C6/36 và tiêm vào 5 trứng vịt có phôi 10 ngày tuổi. Kháng nguyên TMUV được xác nhận là bất hoạt hoàn toàn khi không xuất hiện CPE và phôi vịt vẫn còn sống. PBS (pH=7,2) được sử dụng làm đối chứng âm và chủng TMUV không bất hoạt được ủ ở 4°C và 37°C sau 48 giờ được sử dụng làm đối chứng dương.

Quy trình gây tối miễn dịch cho gà mái

Sử dụng 39 gà mái đẻ giống ISA-Brown, được chia thành 13 lô, mỗi lô 3 con.

Đàn gà được chăm sóc nuôi dưỡng đảm bảo cung cấp đủ thức ăn, nước uống, được tiêm phòng một số dịch bệnh nguy hiểm như: Newcastle, Gumboro, cúm gia cầm,...

Kháng nguyên tiêm cho gà là:

+ Chủng TMUV bất hoạt phân lập từ vịt bệnh ở tỉnh Đồng Nai

+ Vacxin TMUV Inactivated Strain HB (vacxin).

Gà thí nghiệm được chia thành 4 lô thí nghiệm và 1 lô đối chứng (tiêm PBS), mỗi lô gồm 9 con gà. Mỗi lô gà mái được tiêm 3 con, mỗi con tiêm 1 liều lần lượt ở 3 nồng độ 10⁻¹ x ELD₅₀, 10⁰ x ELD₅₀, 10¹ x ELD₅₀ và vacxin TMUV Inactivated Strain HB (2 vị trí bên ức trái và 2 vị trí bên ức phải của gà thí nghiệm), với số lần lặp lại ở mỗi nồng độ là 2, 3 và 4 lần tiêm nhắc lại, mỗi liều tiêm nhắc lại cách nhau 2 tuần. Liều tiêm 1mL/lần/gà (0,25mL/1 vị trí tiêm).

Gà sẽ được lấy máu và kiểm tra kháng thể hàng tuần sau mỗi lần tiêm. Trứng sẽ được thu hoạch hằng ngày, được đánh dấu ngày thu,

nghiệm thức thí nghiệm và trữ ở 4°C không quá 7 ngày đến khi xử lý và tách chiết IgY.

Máu gà được lấy ở tĩnh mạch cánh, 2-3mL/

con và được ký hiệu theo từng lô riêng biệt. Máu lấy xong để yên trong ống nghiệm cho đông lại và bảo quản lạnh vận chuyển đến phòng thí nghiệm để chất lấy huyết thanh.

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm gây miễn dịch ở gà

Nghiệm thức	Số gà tiêm	Kháng nguyên	Nồng độ ELD ₅₀	Thể tích tiêm (mL)	Đường tiêm	Số lần tiêm nhắc lại (lần)
NT1	3	Chủng TMUV phân lập	10 ⁻¹ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	2
NT2	3	Chủng TMUV phân lập	10 ⁻¹ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	3
NT3	3	Chủng TMUV phân lập	10 ⁻¹ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	4
NT4	3	Chủng TMUV phân lập	10 ⁰ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	2
NT5	3	Chủng TMUV phân lập	10 ⁰ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	3
NT6	3	Chủng TMUV phân lập	10 ⁰ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	4
NT7	3	Chủng TMUV phân lập	10 ¹ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	2
NT8	3	Chủng TMUV phân lập	10 ¹ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	3
NT9	3	Chủng TMUV phân lập	10 ¹ x ELD ₅₀	1	Cơ ức	4
NT10	3	Vaxcin TMUV	-	1	Cơ ức	2
NT11	3	Vaxcin TMUV	-	1	Cơ ức	3
NT12	3	Vaxcin TMUV	-	1	Cơ ức	4
ĐC	3	PBS	-	1	Cơ ức	4

Tách chiết và tinh sạch kháng thể từ lòng đỏ trứng

Kháng thể IgY được tách chiết từ lòng đỏ trứng và tinh sạch dựa theo mô tả của Ko và cs. (2007).

Chế nước trứng (WSF: Water-soluble fraction): Tách riêng lòng đỏ và lòng trắng của trứng. Lòng đỏ cho lên giấy Whatman No.1, sau đó chọc thủng lớp bao cho lòng đỏ chảy vào trong cốc. Lòng đỏ trứng gà được pha loãng với nước cất để lạnh 4°C với tỷ lệ 1:9, điều chỉnh pH bằng HCL 1N về 5,0; khuấy tan huyền dịch bằng máy khuấy từ ở 4°C, để lắng qua đêm ở 4°C. Thu phần dịch nổi bằng cách ly tâm 7.000 vòng/ phút trong 20 phút ở 4°C, sau đó lọc phần dịch nổi qua giấy Whatman No.1. Dịch lọc thu được rửa với muối Ammonium sulfate (AS) ở 40% bão hòa, điều chỉnh pH bằng HCL 1N về 5,0; mỗi phân đoạn rửa được ủ ở 4°C, trong 2 giờ, sau đó ly tâm lần 1 với 4.000 vòng trong 30 phút bỏ phần nước nổi (dùng để rửa lần 2)

giữ lại phần cặn rửa. Phần nước nổi được tiếp tục rửa lần 2 với muối AS ở 40% bão hòa, điều chỉnh pH bằng HCL 1N về 5,0; ủ ở 4°C trong 2 giờ, sau đó ly tâm lần 1 với 4.000 vòng trong 30 phút bỏ phần nước nổi thu phần cặn rửa. Phần rửa của 2 lần được hòa tan trong dung dịch đệm phosphate pH=7,2; sau đó tiến hành thẩm tích để loại bỏ muối.

Xác định hiệu giá kháng thể kháng IgY bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA)

Tất cả các mẫu kháng thể sau khi tinh sạch được xác định hàm lượng kháng thể bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu (HI). Thực hiện phản ứng HI theo mô tả của Đặng Anh Việt và cs. (2023). Sử dụng bảng nhựa 96 giếng đáy chữ U theo hàng 12 giếng. Cho 25μL dung dịch borat pH=9 vào bảng nhựa 96 giếng đáy chữ U theo hàng 12 giếng. Cho 25μL mẫu kháng thể IgY vào giếng đầu tiên. Dùng pipet pha loãng bậc hai đến giếng 12. Cho 25μL kháng nguyên 8 đơn vị ngưng kết hồng cầu vào các giếng. Để tiếp xúc

tối thiểu 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Cho 50µL dung dịch hồng cầu ngỗng 0,33% có pH=6,0 vào tất cả các giếng, lắc nhẹ, để băng nhựa ở nhiệt độ phòng. Đọc kết quả sau 30 phút. Đồng thời làm các giếng đối chứng mẫu kháng thể IgY, đối chứng kháng nguyên có hiệu giá đã chuẩn độ, đối chứng hồng cầu ngỗng 0,33%. Đọc kết quả các giếng (+) khi hồng cầu lắng tụ, (-) khi hồng cầu ngưng kết. Hiệu giá virus là độ pha loãng cuối cùng có khả năng làm ngưng kết hồng cầu và được tính là 1 đơn vị ngưng kết.

Xử lý số liệu

Số liệu được tổng hợp, xử lý và phân tích sơ bộ ban đầu bằng MS. Excel 2018, sau đó được phân tích sâu bằng phần mềm Minitab 18. Nghiên cứu này sử dụng phương pháp thống

kê mô tả thông qua giá trị trung bình. Ngoài ra, nghiên cứu này còn sử dụng kiểm định ANOVA để kiểm định sự khác biệt giá trị trung bình giữa các yếu tố ảnh hưởng. Trong đó, các giá trị trung bình mang cùng một chữ cái thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định liều gây chết 50% phôi trứng (ELD₅₀) của chủng TMUV (REP.V1.01.22)

Trứng đã tiêm được quan sát hàng ngày ghi nhận số trứng có phôi bị chết và số phôi sống. Phôi chết có bệnh tích điển hình của bệnh TMUV như xuất huyết toàn thân, não phù nề (hình 1B, C). Kết quả chi tiết thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả chuẩn độ liều gây chết 50% phôi trứng (ELD₅₀) của virus tembusu (REP.V1.01.22)

Nồng độ virus pha loãng	Số phôi được tiêm	Số thí nghiệm		Số tích lũy		Số phôi chết/ tổng số	Tỷ lệ chết (%)
		Phôi sống	Phôi chết	Phôi sống	Phôi chết		
10 ⁻¹	5	0	5	0	24	24/24	100,00
10 ⁻²	5	0	5	0	19	19/19	100,00
10 ⁻³	5	0	5	0	14	14/14	100,00
10 ⁻⁴	5	0	5	0	9	9/9	100,00
10 ⁻⁵	5	2	3	2	4	4/6	66,66
10 ⁻⁶	5	4	1	6	1	1/7	14,24
10 ⁻⁷	5	5	0	11	0	0/11	0,00
10 ⁻⁸	5	5	0	16	0	0/16	0,00
10 ⁻⁹	5	5	0	21	0	0/21	0,00
10 ⁻¹⁰	5	5	0	26	0	0/26	0,00

Bảng 2 cho thấy, ở độ pha loãng 10⁻⁵ đạt được nồng độ virus thấp nhất gây chết trên 50% phôi và độ pha loãng 10⁻⁶ đạt được nồng độ virus cao nhất gây chết dưới 50% phôi với tỷ lệ tương ứng là 66,66% và 14,24%. Dựa vào tỷ lệ sống chết của phôi để tính toán liều ELD₅₀ theo công thức Reed và Muench (1938), kết quả tính toán được thể hiện theo công thức bên dưới:

Khoảng cách tỷ lệ dp giữa 2 độ pha loãng 10⁻⁵ và 10⁻⁶:

$$dp = \frac{50 - L < 50\%}{L > 50\% - L < 50\%} = \frac{50 - 14,24}{66,66 - 14,24} = 0,68$$

Log độ pha loãng gây chết 50% là:

$$\text{Log ELD}_{50} = \text{Log ELD} < 50\% + dp \times \text{Lgf} = -6 + 0,68 = -5,32 = 1/10^{5,32}$$

$$\text{ELD}_{50} = 10^{-5,32}$$



Hình 1. Phôi chết có bệnh tích điển hình của TMUV

A: Phôi vịt 15 ngày tuổi khi tiêm PBS (pH=7,2); B và C: Phôi vịt 15 ngày tuổi tiêm virus bị chết phôi, có bệnh tích điển hình của bệnh TMUV

Theo đó, liều ELD₅₀ được xác định là 10^{-5,32}. Như vậy, liều gây chết 50% phôi trứng là 10^{-5,32}/0,2 mL, tức là ở độ pha loãng 1/10^{5,32} khi tiêm 0,2mL huyền dịch TMUV (REP.V1.01.22) sẽ gây chết 50% phôi thí nghiệm (hay 0,2mL huyền dịch virus có chứa 10^{5,32} liều gây chết 50% phôi). Kết quả ELD₅₀ của chủng virus phân lập được từ nghiên cứu này tương đồng với ghi nhận của Nguyễn Thanh Ba và cs. (2022), 3 chủng TMUV (TMUV01, 08 và 09) phân lập được từ khu vực phía Bắc có giá trị ELD₅₀ từ 10^{-5,4} đến 10^{-5,8} ELD₅₀/mL. Tuy nhiên liều gây chết 50% phôi trứng trong nghiên cứu này cao hơn so với chủng TMUV-NL1 (10^{-4,5}/mL) (Trương

Minh Đạt và cs., 2023).

3.2. Kết quả bất hoạt chủng TMUV (REP.V1.01.22)

Thử nghiệm bất hoạt TMUV (REP.V1.01.22) với nồng độ 10^{-5,32}/0,2mL ELD₅₀ đã được thực hiện ở hai nhiệt độ khác nhau là 4°C và 37°C trong thời gian kéo dài từ 12 đến 48 giờ bằng dung dịch BEI nồng độ cuối cùng là 0,2%. Sau mỗi chu kỳ ủ, hiệu quả bất hoạt virus được kiểm tra bằng cách nuôi cấy trên tế bào muỗi *Aedes albopictus* dòng C6/36 và tiêm vào 5 trứng vịt có phôi 10 ngày tuổi. Kết quả chi tiết trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả thử nghiệm bất hoạt virus TMUV

Nhiệt độ (°C)	Nghiệm thức	Thời gian bất hoạt (giờ)	Thử nghiệm trên phôi trứng			Nuôi cấy trên tế bào C6/36
			Số phôi tiêm	Phôi sống	Phôi chết	CPE
4	T12	12	5	0	5	+
	T24	24	5	0	5	+
	T36	36	5	1	4	+
	T48	48	5	2	3	+
	TMUV không bất hoạt	48	5	0	5	+
	PBS (pH=7,2)	48	5	5	0	-
37	T12	12	5	4	1	+
	T24	24	5	5	0	-
	T36	36	5	5	0	-
	T48	48	5	5	0	-
	TMUV không bất hoạt	48	5	0	5	+
	PBS (pH=7,2)	48	5	5	0	-

Ghi chú: CPE: Cytopathic Effect (bệnh tích tế bào), (+): có CPE sau 10 ngày nuôi cấy, (-): không có CPE sau 10 ngày nuôi cấy.

Kết quả cho thấy khi bất hoạt virus ở 4°C sau 48 giờ, virus vẫn còn khả năng gây chết phôi vịt và hiện tượng CPE khi nuôi cấy tế bào muỗi *Aedes albopictus* dòng C6/36. Khi virus được bất hoạt ở 37°C sau 24 giờ không còn khả năng gây chết phôi vịt và không tạo ra CPE khi nuôi cấy trên tế bào C6/36. Vì vậy, chủng virus TMUV- REP.V1.01.22 đã được bất hoạt hoàn toàn với nồng độ BEI là 0,2% ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ. Chủng virus sau khi bất hoạt được sử dụng để gây miễn dịch cho gà mái đẻ giống ISA-Brown 6 tháng tuổi. Kết quả

này tương đồng so với báo cáo của Lin và cs. (2015), chủng Tembusu-HB được bất hoạt hoàn toàn ở 37°C trong 24 giờ bằng formaldehyde 0,1%; không ghi nhận có CPE sau khi nuôi cấy trên tế bào BHK-21.

3.3. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể (HGKT) tembusu trong máu gà

Máu gà được lấy 2 tuần/lần để kiểm tra hiệu giá kháng thể (HGKT). Kết quả kiểm tra HGKT của gà ở lô 10⁻¹ x ELD₅₀ qua các tuần được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong máu gà của lô thí nghiệm 10⁻¹ x ELD₅₀ qua các tuần

Nghiệm thức	HGKT trong máu gà qua các tuần (xlog2)									GMT± StDev
	T0	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14	T16	
10 ⁻¹ xELD ₅₀ /2	0,00 ⁱ	5,67 ^{gh}	5,11 ^{gh}	6,00 ^{fg}	6,44 ^{def}	6,22 ^{ef}	6,11 ^f	6,33 ^{def}	6,33 ^{def}	6,03±0,44 ^B
10 ⁻¹ xELD ₅₀ /3	0,00 ⁱ	6,11 ^f	5,00 ^h	7,11 ^{cde}	7,56 ^{abc}	7,56 ^{abc}	7,56 ^{abc}	7,22 ^{cd}	7,44 ^{bc}	6,94±0,92 ^{AB}
10 ⁻¹ xELD ₅₀ /4	0,00 ⁱ	5,56 ^{gh}	5,11 ^{gh}	7,78 ^{abc}	8,00 ^{abc}	8,44 ^a	8,22 ^{ab}	8,33 ^{ab}	8,33 ^{abc}	7,47±1,34 ^A
Đối chứng	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00 ⁱ	0,00±0,00 ^C

Ghi chú: Các ký tự a, b, c, A,B,C,... là thứ tự sắp xếp từ cao đến thấp theo nhóm giá trị HGKT. Các giá trị trung bình mang cùng một chữ cái thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức P<0,05. GMT: Hiệu giá kháng thể trung bình theo từng nghiệm thức từ T2 đến T16. 10⁻¹ xELD₅₀/2: Nghiệm thức gây miễn dịch 2 lần với liều 10⁻¹ xELD₅₀; 10⁻¹ xELD₅₀/3: Nghiệm thức gây miễn dịch 3 lần với liều 10⁻¹ xELD₅₀; 10⁻¹ xELD₅₀/4: Nghiệm thức gây miễn dịch 4 lần với liều 10⁻¹ xELD₅₀

Kết quả kiểm tra HGKT trong máu gà của lô thí nghiệm 10⁻¹ x ELD₅₀ qua các tuần cho thấy ở cả 3 nghiệm thức trước khi gây miễn dịch đều không có kháng thể kháng TMUV và sau khi gây miễn dịch có hiệu giá kháng thể dao động từ 5,00 đến 8,44 log2. Cả 3 nghiệm thức gây miễn dịch đều có kháng thể trong máu cao sau 2 tuần từ 5,56 đến 6,11 log2 và giảm nhẹ vào tuần T4 (2 tuần sau khi gây miễn dịch lần 2). Đối với nghiệm thức 10⁻¹ x ELD₅₀/2 và 10⁻¹ x ELD₅₀/3, HGKT đạt cao nhất vào tuần T8 lần lượt là 6,44 và 7,56 log2 sau đó duy trì ổn định đến tuần T16. Nghiệm thức 10⁻¹ x ELD₅₀/4, HGKT đạt cao nhất vào tuần T10 (8,44 log2), sau đó duy trì ổn định đến tuần T16. Nhìn chung, 3 nghiệm thức gây miễn dịch với liều 10⁻¹ x ELD₅₀ thì nghiệm thức gây miễn dịch 4 lần đạt HGKT

trung bình từ tuần T2 đến T16 cao nhất (7,47 log2), sau đó đến nghiệm thức gây miễn dịch 3 và 2 lần (lần lượt là 6,94 và 6,03 log2), sự khác biệt HGKT trung bình giữa 3 nghiệm thức có ý nghĩa thống kê ở mức P<0,05.

Kết quả kiểm tra HGKT trong máu gà của lô thí nghiệm 10⁰ x ELD₅₀ (bảng 5) cho thấy cả 3 nghiệm thức gây miễn dịch điều không có kháng thể ở tuần T0 và có kháng thể trong máu cao sau 2 tuần từ 7,11 đến 7,56 log2 và giảm nhẹ vào tuần T4. Đối với nghiệm thức 10⁰ x ELD₅₀/2, HGKT đạt thấp nhất trong 3 nghiệm thức vào và duy trì ổn định từ tuần T6 đến T8 (dao động 7,33 đến 7,56 log2). Nghiệm thức 10⁰ x ELD₅₀/3 và 10⁰ x ELD₅₀/4 đạt HGKT cao hơn; dao động từ tuần T6 đến T16 là 9,00 đến 9,89 log2. Nhìn chung,

3 nghiệm thức gây miễn dịch với liều $10^0 \times ELD_{50}$ thì nghiệm thức gây miễn dịch 3 lần đạt HGKT trung bình cao nhất (8,94 log2) và

sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$ đối với nghiệm thức $10^0 \times ELD_{50}$ (8,75 log2).

Bảng 5. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong máu gà của lô thí nghiệm $10^0 \times ELD_{50}$ qua các tuần

Nghiệm thức	HGKT trong máu gà qua các tuần (xlog2)									
	T0	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14	T16	GMT± StDev
$10^0 \times ELD_{50}/2$	0,00 ^d	7,56 ^b	6,22 ^c	7,33 ^{bc}	7,44 ^b	7,56 ^b	7,44 ^b	7,56 ^b	7,56 ^b	7,33±0,46 ^B
$10^0 \times ELD_{50}/3$	0,00 ^d	7,11 ^{bc}	6,44 ^{bc}	9,67 ^a	9,55 ^a	9,89 ^a	9,67 ^a	9,67 ^a	9,56 ^a	8,94±1,35 ^A
$10^0 \times ELD_{50}/4$	0,00 ^d	7,22 ^{bc}	6,22 ^c	9,11 ^a	9,00 ^a	9,44 ^a	9,67 ^a	9,78 ^a	9,56 ^a	8,75±1,31 ^A
Đối chứng	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00±0,00 ^C

Ghi chú: Các ký tự a, b, c, A, B, C, ... là thứ tự sắp xếp từ cao đến thấp theo nhóm giá trị HGKT. Các giá trị trung bình mang cùng một chữ cái thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$. GMT: Hiệu giá kháng thể trung bình theo từng nghiệm thức từ T2 đến T16. $10^0 \times ELD_{50}/2$: Nghiệm thức gây miễn dịch 2 lần với liều $10^0 \times ELD_{50}$. $10^0 \times ELD_{50}/3$: Nghiệm thức gây miễn dịch 3 lần với liều $10^0 \times ELD_{50}$. $10^0 \times ELD_{50}/4$: Nghiệm thức gây miễn dịch 4 lần với liều $10^0 \times ELD_{50}$.

Kết quả kiểm tra HGKT trong máu gà từ lô thí nghiệm $10^1 \times ELD_{50}$ (bảng 6) cho thấy rằng cả 3 nghiệm thức trước khi gây miễn dịch không ghi nhận sự có mặt của kháng thể TMUV. Tuy nhiên, sau khi gây miễn dịch 2 tuần, mức độ kháng thể trong máu đã tăng cao từ 7,22 đến 7,89 log2 và sau đó giảm nhẹ vào tuần T4. Đối với nghiệm thức $10^1 \times ELD_{50}/2$ HGKT đạt thấp nhất trong 3 nghiệm thức và duy trì ổn định từ tuần T6 đến T16 (dao động

6,22 đến 8,00 log2). Nghiệm thức $10^1 \times ELD_{50}/3$ và $10^1 \times ELD_{50}/4$ đạt HGKT cao hơn; dao động lần lượt từ 8,67 đến 9,78 log2 duy trì ổn định từ tuần T6 đến T16. Nhìn chung, 3 nghiệm thức gây miễn dịch với liều $10^1 \times ELD_{50}$ thì nghiệm thức gây miễn dịch 3 và 4 lần có hiệu giá kháng thể trung bình cao hơn so với gây miễn dịch 2 lần (lần lượt là 8,81; 8,76 và 7,53 log2) và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

Bảng 6. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong máu gà của lô thí nghiệm $10^1 \times ELD_{50}$ qua các tuần

Nghiệm thức	HGKT trong máu gà qua các tuần (xlog2)									
	T0	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14	T16	GMT± StDev
$10^1 \times ELD_{50}/2$	0,00 ^h	7,33 ^{efg}	6,22 ^g	7,44 ^{efg}	7,78 ^{def}	7,78 ^{def}	7,78 ^{def}	7,89 ^{cdef}	8,00 ^{bcdef}	7,53±0,57 ^B
$10^1 \times ELD_{50}/3$	0,00 ^h	7,89 ^{cdef}	6,56 ^{fg}	8,67 ^{abcde}	9,22 ^{abcd}	9,67 ^a	9,44 ^{ab}	9,56 ^{ab}	9,44 ^{ab}	8,81±1,08 ^A
$10^1 \times ELD_{50}/4$	0,00 ^h	7,22 ^{efg}	6,00 ^g	9,00 ^{abcd}	9,33 ^{abc}	9,78 ^a	9,56 ^a	9,56 ^a	9,67 ^a	8,76±1,38 ^{AB}
Đối chứng	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00±0,00 ^C

Ghi chú: Các ký tự a, b, c, A, B, C, ... là thứ tự sắp xếp từ cao đến thấp theo nhóm giá trị HGKT. Các giá trị trung bình mang cùng một chữ cái thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$. GMT: Hiệu giá kháng thể trung bình theo từng nghiệm thức từ T2 đến T16. $10^1 \times ELD_{50}/2$: Nghiệm thức gây miễn dịch 2 lần với liều $10^1 \times ELD_{50}$. $10^1 \times ELD_{50}/3$: Nghiệm thức gây miễn dịch 3 lần với liều $10^1 \times ELD_{50}$. $10^1 \times ELD_{50}/4$: Nghiệm thức gây miễn dịch 4 lần với liều $10^1 \times ELD_{50}$.

Kết quả kiểm tra HGKT trong máu gà từ lô thí nghiệm tiêm vaccin TMUV Inactivated Strain HB (bảng 7) cho thấy rằng cả 3 nghiệm thức trước khi gây miễn dịch không ghi nhận sự có mặt của kháng thể TMUV. Tuy nhiên, sau khi gây miễn dịch 2 tuần, mức độ kháng thể trong máu đã tăng cao từ 6,89 đến 7,67 log₂ và sau đó giảm nhẹ vào tuần T4 sau đó

tăng lên ở tuần T6 và duy trì ổn định đến tuần T16. Nhìn chung, 3 nghiệm thức gây miễn dịch bằng vaccin TMUV với 2, 3 và 4 lần tiêm nhắc lại thì nghiệm thức gây miễn dịch 3 và 4 lần đạt HGKT trung bình cao hơn so với nghiệm thức gây miễn dịch 2 lần (lần lượt là 7,57; 8,01 và 6,86 log₂); sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức P<0,05.

Bảng 7. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong máu gà của lô thí nghiệm vaccin qua các tuần

Nghiệm thức	HGKT trong máu gà qua các tuần (xlog ₂)									GMT± StDev
	T0	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14	T16	
Vaccin/2	0,00 ^d	6,89 ^{abc}	6,33 ^c	6,78 ^{abc}	6,89 ^{abc}	7,00 ^{abc}	7,11 ^{abc}	7,00 ^{abc}	6,89 ^{abc}	6,86±0,24 ^B
Vaccin/3	0,00 ^d	7,67 ^{abc}	6,44 ^{bc}	7,56 ^{abc}	7,78 ^{abc}	7,89 ^{abc}	7,67 ^{abc}	7,78 ^{abc}	7,78 ^{abc}	7,57±0,47 ^A
Vaccin/4	0,00 ^d	6,89 ^{abc}	6,67 ^{abc}	8,22 ^{abc}	8,33 ^{abc}	8,67 ^a	8,56 ^{ab}	8,44 ^{abc}	8,33 ^{abc}	8,01±0,78 ^A
Đối chứng	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00±0,00 ^C

Ghi chú: Các ký tự a, b, c, A, B, C, ... là thứ tự sắp xếp từ cao đến thấp theo nhóm giá trị HGKT. Các giá trị trung bình mang cùng một chữ cái thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức P<0,05. GMT: Hiệu giá kháng thể trung bình theo từng nghiệm thức từ T2 đến T16. Vaccin/2: Nghiệm thức gây miễn dịch 2 lần. Vaccin/3: Nghiệm thức gây miễn dịch 3 lần. Vaccin/4: Nghiệm thức gây miễn dịch 4 lần.

Kết quả kiểm tra HGKT trong máu gà từ các nghiệm thức cho thấy HGKT trung bình ở nghiệm thức gây miễn dịch 3 lần với liều 10⁰ và 10¹ ELD₅₀ (lần lượt 8,94 và 8,81 log₂) cao hơn so với nghiệm thức gây miễn dịch với liều 10⁻¹ ELD₅₀ và nghiệm thức vaccin (lần lượt 6,94 và 7,57 log₂), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức P<0,05. Trung bình HGKT theo tuần thấp nhất vào tuần T4 (6,11 log₂) và duy trì ổn định từ tuần T6 đến T16, cao nhất ở tuần T10 đạt 8,75 log₂. Như vậy, nghiệm thức gây miễn dịch với liều 10⁰ ELD₅₀ tiêm nhắc lại 3 lần cho hiệu quả tối ưu về khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch trên gà.

Theo nghiên cứu của Dalin He và cs. (2019), chủng virus Tembusu SDS-70 được làm giảm độc lực bằng cách cấy chuyển vào

phôi vịt 9 ngày tuổi sau 70 thế hệ đã được sử dụng làm vaccin với tá dược PEG2000, sau khi tiêm vào vịt 7 ngày tuổi, hiệu giá kháng thể TMUV được kiểm tra bằng ELISA sau mỗi 3 ngày. Kháng thể được tạo ra ở nhóm tiêm chủng tăng lên nhanh chóng và đạt cực đại ở mức 1,55µg/mL sau 16 ngày tiêm mũi thứ nhất và sau khi tiêm nhắc lại mũi thứ 2 (sau 14 ngày tính từ mũi thứ nhất) kháng thể duy trì ổn định đến sau 45 ngày khảo sát. Theo Zhang và cs. (2017), chủng TMUV JXS₂₋₃ bất hoạt bằng Beta-Propiolactone (BPL) được sử dụng tiêm dưới da (0,5mL/con) vịt 7 ngày tuổi, hiệu giá kháng thể TMUV trong huyết thanh vịt được xác định bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho nhóm Flavivirus dựa trên phương pháp ELISA blocking tại thời điểm 0, 14 và 21 ngày sau khi tiêm mũi thứ nhất và 14,

49 và 112 ngày sau khi tiêm mũi thứ 2. Kết quả cho thấy không phát hiện kháng thể trước khi tiêm vaccin và phát hiện 65% số vịt có kháng thể vào ngày thứ 14, đến ngày 21 thì phát hiện 97% số vịt có kháng thể. Đối với vịt được tiêm vaccin lần thứ 2, HGKT tăng lên đáng kể vào ngày 14 và ngày 49 sau khi tiêm nhắc lại và bắt đầu giảm vào ngày thứ 112. Như vậy, sự xuất hiện kháng thể đặc hiệu trong nghiên cứu này chậm hơn so với nghiên cứu của Dalin He và cs. (2019) nhưng nhanh và mạnh hơn so với nghiên cứu Zhang và cs. (2017), điều này có thể do ảnh hưởng của tá dược bổ sung, liều

kháng nguyên, cũng như phương pháp chế tạo vaccin của các nghiên cứu khác nhau và sự đáp ứng miễn dịch ở gà và vịt cũng khác nhau.

3.4. Kết quả tạo chế phẩm kháng thể IgY

Sau khi xác định được liều 10^0 ELD₅₀ là tối ưu dùng để gây miễn dịch cho gà, trứng gà của các nghiệm thức trong lô này đã được thu thập, lòng đỏ của 3 trứng trong mỗi tuần được đồng nhất và tiến hành tách chiết IgY. Kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể IgY bằng phương pháp HI được thể hiện ở bảng 8.

Bảng 8. Kết quả kiểm tra HGKT IgY trong lòng đỏ trứng gà qua các tuần sau khi gây miễn dịch với liều 10^0 xELD₅₀

Nghiệm thức	HGKT IgY trong lòng đỏ trứng gà qua các tuần (xlog2)									GMT± StDev
	T0	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14	T16	
10^0 xELD ₅₀ /2	0,00 ^g	5,00 ^f	6,00 ^{de}	6,44 ^{cd}	7,00 ^{bc}	7,11 ^{bc}	7,00 ^{bc}	7,11 ^{bc}	7,22 ^{bc}	6,61±0,77 ^A
10^0 xELD ₅₀ /3	0,00 ^g	5,11 ^{ef}	5,56 ^{def}	7,89 ^{ab}	8,56 ^a	8,56 ^a	8,33 ^a	8,44 ^a	8,56 ^a	7,63±1,44 ^A
10^0 xELD ₅₀ /4	0,00 ^g	5,11 ^{ef}	5,67 ^{def}	7,78 ^{ab}	8,33 ^a	8,56 ^a	8,44 ^a	8,22 ^a	8,44 ^a	7,57±1,37 ^A
Đối chứng	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00±0,00 ^B

Ghi chú: Các ký tự a, b, c, A, B, C,...là thứ tự sắp xếp từ cao đến thấp theo nhóm giá trị HGKT. Các giá trị trung bình mang cùng một chữ cái thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P<0,05$. GMT: Hiệu giá kháng thể trung bình theo từng nghiệm thức từ T2 đến T16. 10^0 x ELD₅₀/2: Nghiệm thức gây miễn dịch 2 lần với liều 10^0 x ELD₅₀; 10^0 x ELD₅₀/3: Nghiệm thức gây miễn dịch 3 lần với liều 10^0 x ELD₅₀; 10^0 x ELD₅₀/4: Nghiệm thức gây miễn dịch 4 lần với liều 10^0 x ELD₅₀.

Kết quả kiểm tra HGKT trong lòng đỏ trứng gà của lô thí nghiệm 10^0 x ELD₅₀ (bảng 8) cho thấy cả 3 nghiệm thức gây miễn dịch đều không có kháng thể ở tuần T0 và bắt đầu có kháng thể trong lòng đỏ trứng sau 2 tuần từ 5,00 log2 đến 5,11 log2. HGKT trung bình của nghiệm thức 10^0 x ELD₅₀/3 đạt cao nhất, kế tiếp là nghiệm thức 10^0 x ELD₅₀/4 và 10^0 x ELD₅₀/2 (lần lượt là 7,63; 7,57 và 6,61 log2). Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ở mức $P<0,05$.

IV. KẾT LUẬN

Chủng virus TMUV- REP.V1.01.22 với liều gây chết 50% phôi vịt (ELD₅₀) là $10^{-5,32}$ đã được

bất hoạt hoàn toàn với nồng độ BEI là 0,2% ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ.

Chủng virus TMUV- REP.V1.01.22 sau khi bất hoạt, gây miễn dịch lặp lại 3 lần, mỗi lần cách nhau 2 tuần với liều 10^0 ELD₅₀ trên gà mái đẻ giống ISA Brown 20 tuần tuổi đạt hiệu giá kháng thể cao nhất (9,89 log2), kéo dài và ổn định.

Hiệu giá kháng thể TMUV trong huyết thanh và lòng đỏ trứng duy trì ổn định từ tuần 6 đến tuần 16, đạt cao nhất vào tuần T10.

Trung bình hiệu giá kháng thể IgY trong lòng đỏ trứng được thu từ gà mái gây miễn dịch với liều 10^0 ELD₅₀, lặp lại 3 lần, sau khi tinh sạch có hiệu giá kháng thể TMUV đạt 7,63 log2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Anh Việt, Trần Thị Ngọc Quy, Nguyễn Thị Bích Thương, Trà Toàn, Huỳnh Thị Kim Loan, Phạm Thái Bình, Ngô Quốc Cường, 2023. Xây dựng quy trình phát hiện kháng thể kháng virus Tembusu trong huyết thanh vịt. *Khoa học kỹ thuật thú y*, 30 (6): 35-39.
2. Đặng Hữu Anh, Nguyễn Văn Giáp, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, 2020. Một số kết quả bước đầu về Tembusu virus ở vịt bệnh tại Hà Nội. *Khoa học kỹ thuật thú y*, 28 (1) : 22-28.
3. Trương Minh Đạt và Hoàng Thanh Hải, 2023. Phân lập và phân tích đặc điểm di truyền của virus Tembusu (flavivirus) trên vịt. *Nông nghiệp và Phát triển*. 22 (4): 42-48.
4. Ko K.Y., Ahn D. U., 2007. Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. *Poultry Science*. 86 (2): 400-407.
5. Cao Z., Zhang C., Liu Y., Ye W., Han J., Ma G., Zhang D., Xu F., Gao X., Tang Y., 2011. Tembusu virus in ducks, China. *Emerging infectious diseases*.17(10): 1873.
6. Su J., Li S., Hu X., Yu X., Wang Y., Liu P., 2011. Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu-related flavivirus. *PLoS ONE*. 6:e18106.
7. Zhang W., Chen S., Mahalingam S., Fu M., Cheng A., 2017. An updated review of avian-origin Tembusu virus: a newly emerging avian Flavivirus. *Journal of General Virology*. 98 (10): 2413-2420.
8. Nguyễn Thanh Ba, Nguyễn Thị Bích, Quách Thị Minh Hiền, Nguyễn Thu Trang Trang, Nguyễn Thùy Ninh, và Trần Văn Khánh, 2022. Phân lập và xác định một số đặc điểm sinh học của Duck Tembusu Virus tại một số tỉnh phía Bắc. *Khoa học kỹ thuật thú y*, 29(5): 5-13.
9. Reed L. J., Muench H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3): 493–497.
10. Vũ Thị Thu Hằng, Lê Quốc Hòa, Trịnh Thị Bích Ngọc, Vũ Xuân Đăng, Nguyễn Thị Yến, Nguyễn Văn Tâm, Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Thị Lan, và Lê Văn Phan, 2019. Tinh chế kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng gà và ứng dụng trong phòng và trị bệnh Gumboro trên gà. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 17(12): 976-985.
11. Nguyễn Văn Tâm, Vũ Thị Thu Hằng, Trịnh Thị Bích Ngọc, Vũ Xuân Đăng, và Nguyễn Thị Yến, 2020. Ứng dụng kháng thể IgY chế từ lòng đỏ trứng gà để phòng và trị bệnh Newcastle trên gà. *Khoa học kỹ thuật chăn nuôi*. 256: 90-98.
12. Dalin H., Xin Z., Lin C., Yi T., Youxiang D., 2019. Development of an attenuated live vaccine candidate of duck Tembusu virus strain. *Veterinary Microbiology*. 231: 218-225.
13. Zhang L., Li Z., Zhang Q., Sun M., Li S., Su W., Hu X., He W., Su J., 2017. Efficacy assessment of an inactivated Tembusu virus vaccine candidate in ducks. *Research in Veterinary Science*. 110: 72-78.

Ngày nhận: 5-7-2024

Ngày phản biện: 18-7-2024

Ngày đăng: 1-11-2024