

MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA CHỦNG VIRUS DỊCH TẢ VỊT NHƯỢC ĐỘC DỊCH TẢ VỊT DP-EG-2000

Nguyễn Bá Hiên, Lê Văn Phan, Đặng Hữu Anh, Lê Huỳnh Thanh Phương
Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Dịch tả vịt (Duck viral enteritis) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm, gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng đối với ngành chăn nuôi vịt của Việt Nam. Virus dịch tả vịt là một loại DNA virus thuộc họ *Herpesviridae*. Trong nghiên cứu này, gen UL30-UL31 và US7 của chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000 đã được giải trình tự gen, được phân tích và so sánh về trình tự nucleotide (nt) với các chủng virus dịch tả vịt tham chiếu khác. Kết quả phân tích về trình tự nt cho thấy chủng virus vaccin DP-EG-2000 có mức độ tương đồng cao khi so sánh với các chủng virus dịch tả vịt tham chiếu khác trên ngân hàng gen, tỷ lệ tương đồng về nt từ 98,4 – 100% đối với trình tự vùng gen UL30 - UL31, và từ 96,5 – 99,6% đối với gen US7. Khi so sánh chủng DP-EG-2000 với chủng virus vaccin VAC của Trung Quốc, tỷ lệ tương đồng về trình tự nt đối với vùng gen UL30-UL31 và US7 tương ứng là 100 và 96,5%. Chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000 trong nghiên cứu này là chủng virus có khả năng nuôi cấy và phát triển ổn định trên phôi trứng gà 9 – 11 ngày tuổi với các chỉ số ELD50 và EID50 tương ứng là $10^{-4,3}$ và $10^{-5,3}/0,2$ ml.

Từ khóa: Dịch tả vịt, Đặc tính sinh học, Đặc tính sinh học phân tử, Gen, Giải trình tự.

Some molecular biology and biological characteristics of the DVE DP-EG-2000 attenuated vaccine strain

Nguyen Ba Hien, Le Van Phan, Dang Huu Anh, Le Huynh Thanh Phuong

SUMMARY

Duck viral enteritis (DVE) is a serious, acute, contagious disease causing heavily economic loss in the commercial duck production in Viet Nam. Duck enteritis virus is a DNA virus of the Herpesviridae family. In this study, the UL30-UL31 and US7 gene sequences of the DVE DP-EG-2000 attenuated vaccine strain were sequenced, analyzed and compared with those of other reference DVE strains in GenBank. The result of nucleotide (nt) sequence comparison of the UL30-UL31 and US7 genes showed that the DP-EG-2000 strain closely related to other reference DVE strains, sharing high similarity level (98.4 – 100% and 96.5 – 99.6% , respectively). When comparison of the DP-EG-2000 strain with the attenuated DVE VAC strain of China, the nt sequence similarity of UL30-UL31 and US7 gene was 100 % and 96.5%, respectively. The present attenuated DVE DP-EG-2000 vaccine strain in this study was capable for culturing and stable development on the egg embryos at 9–11 days old with the EID50 and ELD50 indexes were $10^{-4,3}$ and $10^{-5,3}/0.2$ ml, respectively.

Keywords: Duck viral enteritis, Biological characteristic, Molecular biology characteristic, Gene sequence

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, ngành chăn nuôi gia cầm nói chung và chăn nuôi vịt nói riêng đã và đang đóng góp

đáng kể vào sự phát triển nền kinh tế Việt Nam. Theo số liệu thống kê của Bộ Nông nghiệp và PTNT, số lượng đàn gia cầm trên cả nước đã

tăng từ 214,6 triệu (2006) tới 308,5 triệu (2012), trong đó đàn thủy cầm, chủ yếu là vịt, tăng từ 62,6 triệu (2006) lên tới 84,7 triệu con (2012). Tuy nhiên, việc chăn nuôi các loài thủy cầm thường ở quy mô nhỏ tại các hộ gia đình (Edan và Bourgeois, 2006), dẫn đến nguy cơ lây nhiễm không kiểm soát của các loại dịch bệnh (Edan và Bourgeois, 2006).

Dịch tả vịt là một bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm, gây tỉ lệ tử vong cao ở các loài vịt, ngan, ngỗng, gây thiệt hại kinh tế đáng kể đối với ngành chăn nuôi thủy cầm ở Việt Nam và thế giới. Dịch tả vịt lần đầu tiên xuất hiện ở Hà Lan năm 1923, và sau đó lan rộng ra khắp châu Âu, châu Á và châu Mỹ (Nguyễn Bá Hiên và Huỳnh Thị Mỹ Lệ, 2013). Riêng ở Việt Nam, dịch tả vịt xuất hiện đầu tiên vào khoảng những năm 1960 và gây thiệt hại đối với ngành chăn nuôi gia cầm lên tới 20% mỗi năm (Morrissey và cộng sự, 2004). Bệnh do Duck enteritis virus (DEV), một virus thuộc họ *Herpesviridae* gây ra. Bệnh có tỉ lệ chết cao, lên tới 90% ở các đàn vịt không được tiêm phòng. Bên cạnh đó, việc kiểm soát sự lây lan của bệnh gặp rất nhiều khó khăn do virus có thể tồn tại lâu trong môi trường hoặc truyền lây qua các kí chủ tự nhiên (Burgess và Yuill, 1975; Wolf và Burke, 1982). Ngoài ra, sự phát triển của ngành chăn nuôi vịt đã làm xuất hiện các biến chủng mới, làm giảm hiệu quả bảo hộ của các loại vaccin hiện có (Li và cộng sự, 2009). Đặc biệt, Nguyễn Đức Hiên (2012) đã chỉ ra sự khác nhau về hiệu quả bảo hộ của các loại vaccin hiện có đối với các chủng virus DEV lưu hành trên vịt và ngan ở Việt Nam.

Những nghiên cứu gần đây trên thế giới cho thấy một số chủng virus vaccin dịch tả vịt và chủng virus phân lập được ngoài thực địa đã được giải trình tự toàn bộ genome (Li và cộng sự, 2009; Wang và cộng sự, 2011; Wu và cộng sự, 2012; Yang và cộng sự, 2013). Bên cạnh đó, các nghiên cứu về vai trò và chức năng của một số gen của virus dịch tả vịt cũng đã được công bố (Wu và cộng sự, 2012). Ở Việt Nam, theo hiểu biết của chúng tôi, chúng ta chưa có nhiều

nghiên cứu tập trung vào mối quan hệ di truyền giữa các chủng DEV đang lưu hành ngoài thực địa với các chủng virus vaccin hiện có. Trong nghiên cứu này, chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000 đã được nghiên cứu về một số đặc tính sinh học và sinh học phân tử.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chủng virus được sử dụng trong nghiên cứu là chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000 do Bộ môn Vi sinh vật – Truyền nhiễm, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

2.2. Phương pháp tách DNA tổng số

200 µl dung dịch virus được ủ với 500 µl Lysis buffer (27% sucrose, 1x SSC, 1 mM EDTA, 1% SDS, 200 µg/ml protease K) trong điều kiện 56°C/1 giờ. Huyền dịch trên được trộn với hỗn hợp Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol (tỉ 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 vào một ống Eppendorf mới (với lượng khoảng 500µl). Tủa DNA của virus bằng cách bổ sung 500 µl dung dịch Isopropanol, ly tâm 12.000 vòng/phút, trong 10 phút ở 4°C. Rửa tủa DNA bằng 1 ml dung dịch Ethanol 70%, ly tâm 12.000 vòng/phút, trong 10 phút ở 4°C. Tủa DNA được hòa tan trong 50 µl nước vô trùng đã loại *DNase* và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng

2.3. Phản ứng PCR để khuếch đại đoạn gen UL30-UL31 và US7

DNA của virus được bổ sung trực tiếp vào ống phản ứng PCR sử dụng kit AccuPower PCR PreMix (BIONEER). Kit này chứa DNA taq-polymerase và các thành phần cần thiết cho quá trình khuếch đại DNA. Mỗi (primer) được sử dụng để nhân vùng gen UL30-UL31 là cặp mỗi đã được công bố bởi OIE- 2012, và mỗi để nhân gen US7 là cặp mỗi được thiết kế mới (bảng 1). Phản ứng PCR được thực hiện theo chương trình như sau: 25 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 sang công ty Macrogen của Hàn Quốc để giải trình tự gen.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự (5' - 3')	Gen khuếch đại	Kích thước sản phẩm	Tham khảo
DEV-7F	GAAGGCGGGTATGTAATGTA	UL30-UL31	446 bp	OIE-2012
DEV-7R	CAAGGCTCTATTCCGGTAATG			
DEV-US7F	GAAGCCTGTGACCGTTCCTA	US7	557 bp	Nghiên cứu này
DEV-US7R	CAAACCTCCGCGCATAATACA			

2.4. Phân tích trình tự gen và xây dựng cây phát sinh chủng loại

Trình tự gen UL30-UL31 và US7 sau khi được giải trình tự sẽ được phân tích bằng phần mềm BioEdit và DNASTAR và tiến hành so sánh với các trình tự gen tham chiếu khác được công bố trên ngân hàng GenBank. Cây phả hệ (phylogenetic tree) được xây dựng bằng phần mềm MEGA6 sử dụng thuật toán Maximum Likelihood.

2.5. Nghiên cứu một số đặc tính sinh học của chủng virus vaccin nhược độc DP-EG-2000

Khả năng thích ứng và ổn định khi truyền đời qua phôi gà của chủng virus nhược độc DP-EG-2000 được đánh giá bằng phương pháp tiêm truyền trên trứng gà có phôi 9 ngày tuổi. Các chỉ số như liều virus gây chết 50% phôi trứng (ELD50) và liều virus gây nhiễm 50% phôi trứng (EID50) được xác định theo phương pháp của Reed và Muench (1938).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khuếch đại trình tự đoạn gen UL30-UL31 và US7

Phản ứng PCR đã và đang là công cụ hữu hiệu dùng để chẩn đoán cũng như khuếch đại các gen 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 vaccin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000 đã được tách chiết và được dùng cho phản ứng

PCR để khuếch đại vùng gen UL30-UL31 và US7. Kết quả chạy điện di trên gel agarose cho thấy sản phẩm PCR khi sử dụng cặp mồi DEV-7F/DEV-7R đặc hiệu cho gen UL30-UL31 có kích thước khoảng 446 bp và sản phẩm PCR khi sử dụng cặp mồi DEV-US7F/DEV-US7R đặc hiệu cho gen US7 có kích thước khoảng 557 bp, đúng với kích thước như đã được công bố trước đây (OIE-2012) (Hình 1).



Hình 1. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR trên gel Agarose

M: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); giếng 1: Gen UL30-UL31 (446 bp); giếng 2: Gen US7 (557 bp)

3.2. Phân tích trình tự vùng gen UL30-UL31

Kết quả phân tích trình tự vùng gen UL30-UL31 cho thấy chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000 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 dữ liệu GenBank quốc tế, mức độ tương đồng

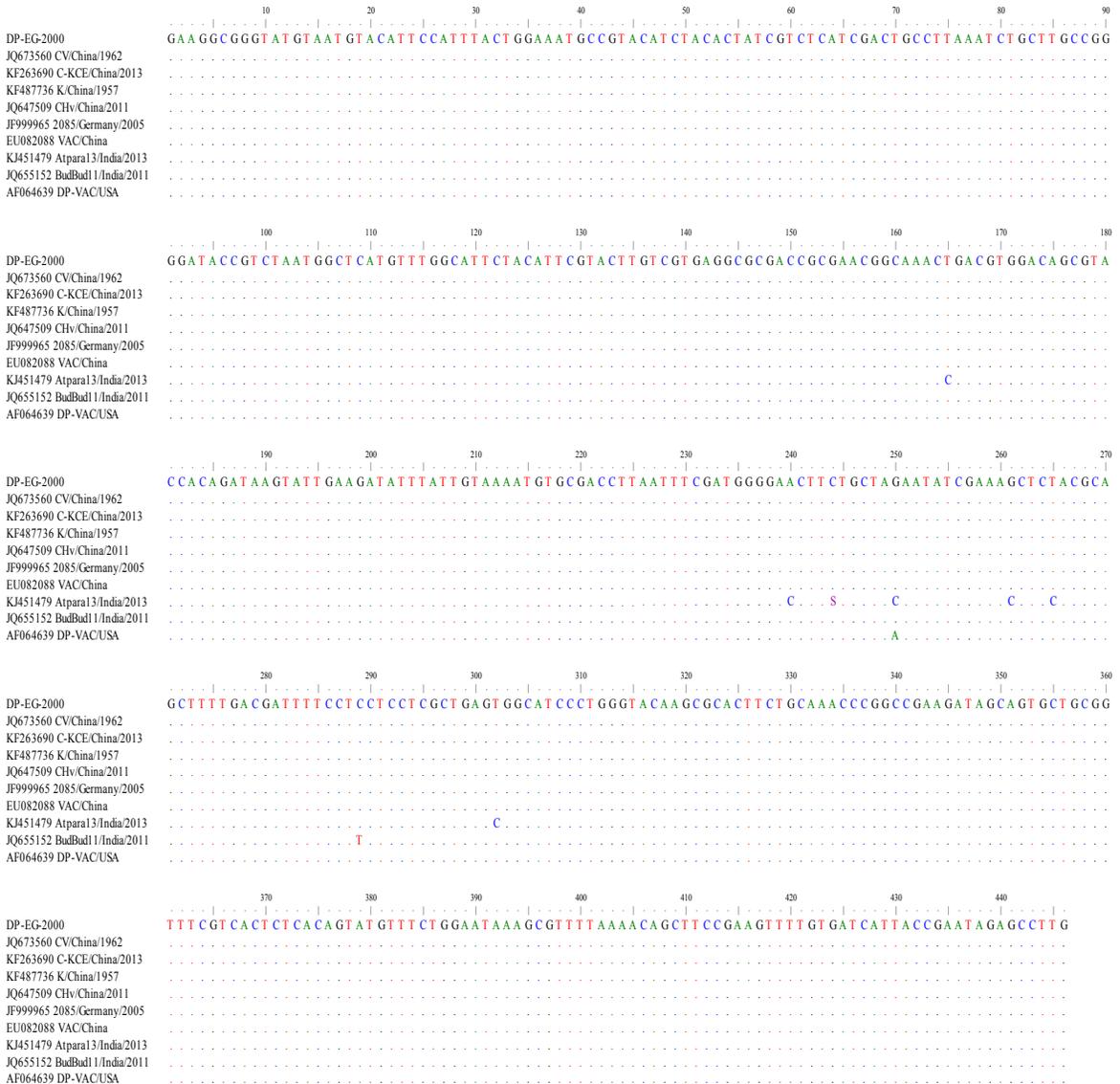
về trình tự nucleotide (nt) dao động từ 98,4 – 100%. Khi so sánh với chủng virus vaccin dịch tả vịt VAC của Trung Quốc (mã số truy cập ngân hàng GenBank: EU082088), mức độ tương đồng về trình tự vùng gen UL30-UL31 là 100% (Bảng 2).

Bảng 2. Mức độ tương đồng về trình tự nucleotide gen UL30-UL31 giữa chủng virus vaccin DP-EG-2000 và các chủng virus dịch tả vịt tham chiếu khác trên thế giới

STT	Chủng virus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	DP-EG-2000										
2	JQ673560 CV/China/1962	100									
3	KF263690 C-KCE/China/2013	100	100								
4	KF487736 K/China/1957	100	100	100							
5	JQ647509 CHv/China/2011	100	100	100	100						
6	JF999965 2085/Germany/2005	100	100	100	100	100					
7	EU082088 VAC/China	100	100	100	100	100	100				
8	KJ451479 Atpara13/India/2013	98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	98.4			
9	JQ655152 BudBud11/India/2011	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	98.2		
10	AF064639 DP-VAC/USA	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	98.4	99.5	

Phân tích sự sai khác về trình tự nt cho thấy, chủng virus vaccin DP-EG-2000 chỉ có sự sai khác ở vị trí 250 (G ↔ A) so với chủng vaccin DP-VAC của Mỹ (mã số truy cập ngân hàng GenBank: AF064639) và ở vị trí 289 (C ↔ T) khi so sánh với chủng BudBud11 của Ấn Độ (mã số

truy cập ngân hàng GenBank: JQ655152). Khác biệt giữa chủng DP-EG-2000 so với chủng Atpara13 của Ấn Độ (mã số truy cập ngân hàng GenBank: KJ451479) xảy ra ở 7 vị trí: 165 (T ↔ C), 240 (A ↔ C), 244 (C ↔ S), 250 (G ↔ C), 261 (G ↔ C), 265 (T ↔ C), 302 (T ↔ C) (Hình 2).



Hình 2. So sánh trình tự vùng gene UL30-UL31 giữa chủng virus vaccin DP-EG-2000 và các chủng virus dịch tả vệt tham chiếu khác

3.3. Phân tích sự sai khác trình tự gen US7

Vùng gen US7 được cho là gen có mức độ đa dạng khá cao trong genome của virus dịch tả vệt (Wu và cộng sự, 2012). Mức độ tương đồng về trình tự nucleotide vùng gen US7 giữa chủng virus vaccin DP-EG-2000 và các chủng virus dịch tả vệt tham chiếu khác dao động trong

khoảng từ 96,5% - 99,6% (Bảng 3). Khi so sánh với chủng virus vaccin dịch tả vệt VAC của Trung Quốc (mã số truy cập ngân hàng Gen-Bank: EU082088), mức độ tương đồng về trình tự vùng gen US giữa hai chủng là 96,5% (Bảng 3).

Bảng 3. Mức độ tương đồng về trình tự nucleotide vùng gen US7 giữa chủng DP-EG-2000 và các chủng tham chiếu khác trên thế giới

STT	Chủng virus	1	2	3	4	5	6	7	8
1	DP-EG-2000								
2	JQ673560 CV/China/1962	99.4							
3	KF263690 C-KCE/China/2013	99.6	99.8						
4	KF487736 K/China/1957	99.4	100	99.8					
5	JQ647509 CHv/China/2011	99.4	100	99.8	100				
6	JF999965 2085/Germany/2005	99.1	99.6	99.4	99.6	99.6			
7	EU082088 VAC/China	96.5	96.7	96.9	96.7	96.7	96.4		
8	HQ009801 DEV clone-03/China	99.6	99.8	100	99.8	99.8	99.4	96.9	

Khi phân tích sự sai khác về trình tự nucleotide vùng gen US7 cho thấy, chủng virus vaccin DP-EG-2000 sai khác so với các chủng còn lại ở 2 vị trí: 193 (T↔C) và 396 (T↔A) (Hình 3). Ngoài ra, chủng virus vaccin DP-EG-2000 có sự sai khác so với chủng K (mã số truy cập ngân hàng GenBank: KF487736), chủng CV (mã số truy cập ngân hàng GenBank: JQ673560), chủng 2085 (mã số truy cập ngân hàng GenBank: JF999965), và chủng CHv (mã số truy cập ngân hàng GenBank: JQ647509) ở vị trí 555 (T↔G). Bên cạnh đó, sự sai khác giữa chủng virus DP-

EG-2000 và chủng 2085 còn xuất hiện ở vị trí 288 (A↔G) và 512 (C↔A). Khác biệt về trình tự nucleotide giữa chủng virus DP-EG-2000 và chủng virus vaccin VAC đang sử dụng ở Trung Quốc xảy ra ở 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 VAC xuất hiện thêm đột biến T ở vị trí 314 làm thay đổi khung đọc của vùng gen US7 ở chủng này so với các chủng khác (Hình 3).



Hình 3. So sánh trình tự vùng gen US7 giữa chủng virus vaccin DP-EG-2000 và các chủng virus dịch tả vẹt tham chiếu khác

Trong nghiên cứu này, mức độ tương đồng về trình tự amino acid đầu C của glycoprotein I giữa chủng virus vaccin DP-EG-2000 với các chủng virus dịch tả vẹt tham chiếu khác cũng được khảo sát. Kết quả phân tích cho thấy chủng virus DP-EG-2000 có mức độ tương đồng là 100% khi so sánh với các chủng virus khác là

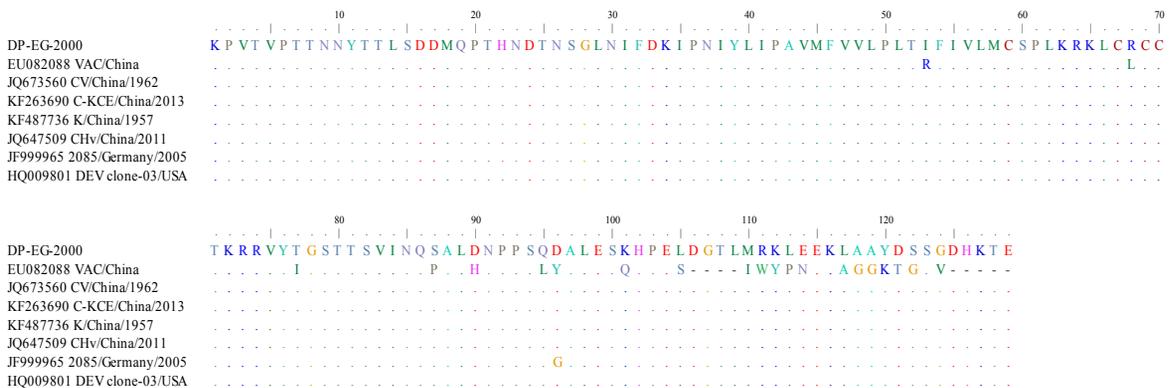
CV, CHv, C-CKE, K, và chủng DEV clone-03. Khi so sánh với chủng virus vaccin dịch tả vẹt VAC của Trung Quốc (mã số truy cập ngân hàng GenBank: EU082088), mức độ tương đồng về trình tự amino acid đầu C của glycoprotein I giữa hai chủng là 76,7% (Bảng 4).

Bảng 4. Mức độ tương đồng về trình tự amino acid đầu C của glycoprotein I giữa chủng virus vaccin DP-EG-2000 và các chủng virus dịch tả vịt tham chiếu khác trên thế giới

STT	Chủng virus	1	2	3	4	5	6	7	8
1	DP-EG-2000								
2	EU082088 VAC/China	76.7							
3	JQ673560 CV/China/1962	100	76.7						
4	KF263690 C-KCE/China/2013	100	76.7	100					
5	KF487736 K/China/1957	100	76.7	100	100				
6	JQ647509 CHv/China/2011	100	76.7	100	100	100			
7	JF999965 2085/Germany/2005	99.2	76.7	99.2	99.2	99.2	99.2		
8	HQ009801 DEV clone-03/China	100	76.7	100	100	100	100	99.2	

Sự sai khác về trình tự amino acid đầu C của glycoprotein I cũng được khảo sát. Kết quả cho thấy chủng virus vaccin DP-EG-2000 chỉ khác biệt ở vị trí amino acid 96 (D↔G) khi so với chủng virus 2085 của Đức (mã số truy cập ngân hàng GenBank: JF999965). Khi so sánh với

chủng virus vaccin dịch tả vịt VAC của Trung Quốc (mã số truy cập ngân hàng GenBank: EU082088), mức độ sai khác giữa hai chủng là rất lớn và có đến 21 vị trí amino acid khác nhau (Hình 4).



Hình 4. Sai khác về trình tự amino acid đầu C của glycoprotein I giữa chủng virus vaccin DP-EG-2000 với các chủng virus dịch tả vịt tham chiếu khác

3.4. Phân tích cây phả hệ (phylogenetic tree) dựa trên trình tự vùng gen UL30-UL31 và gen US7

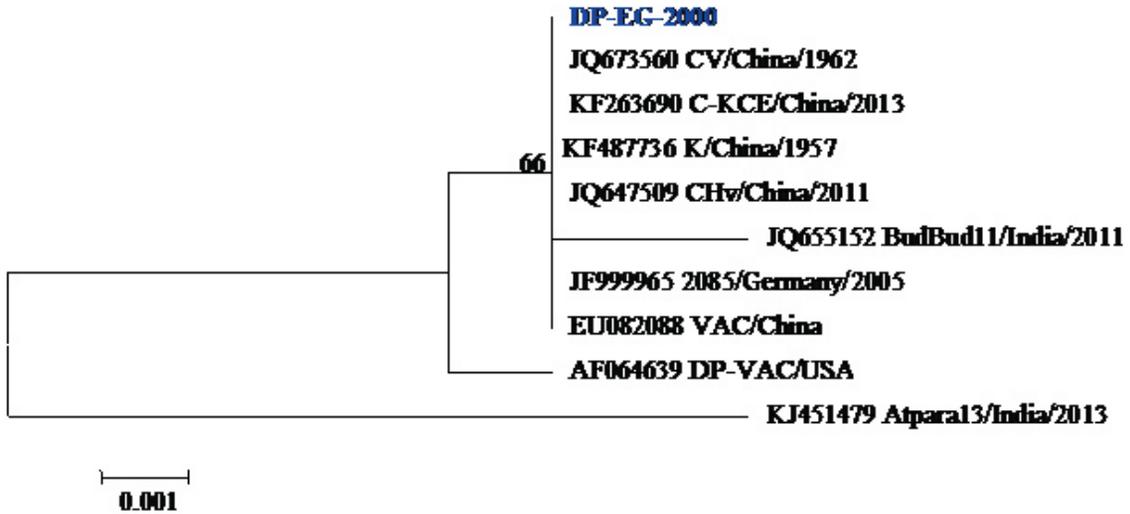
Nhằm đánh giá mối quan hệ di truyền giữa chủng virus vaccin DP-EG-2000 với các chủng virus dịch tả vịt tham chiếu khác, trình tự nucleotide của vùng gen UL30-UL31 và gen US7 đã được sử dụng để xây dựng cây phả hệ.

Dựa vào trình tự vùng gen UL30-UL31,

chủng virus vaccin DP-EG-2000 nằm cùng nhánh với các chủng virus dịch tả vịt phân lập được từ thực địa (chủng CV, C-KCE, K, và CHv) cũng như với chủng virus dùng làm vaccin VAC của Trung Quốc (Hình 5). Kết quả nghiên cứu thu được khi phân tích trình tự vùng gen UL30-UL31 của chúng tôi phù hợp với những công bố trước đây về sự bảo thủ của vùng gen UL30-UL31 giữa các chủng virus dịch tả vịt khác nhau (Hansen và cộng sự, 1999). Vùng

gen UL30-UL31 này đã được dùng để thiết kế mỗi (primer) đặc hiệu dùng để chẩn đoán bệnh

dịch tả vịt (OIE, 2012) trên vịt.

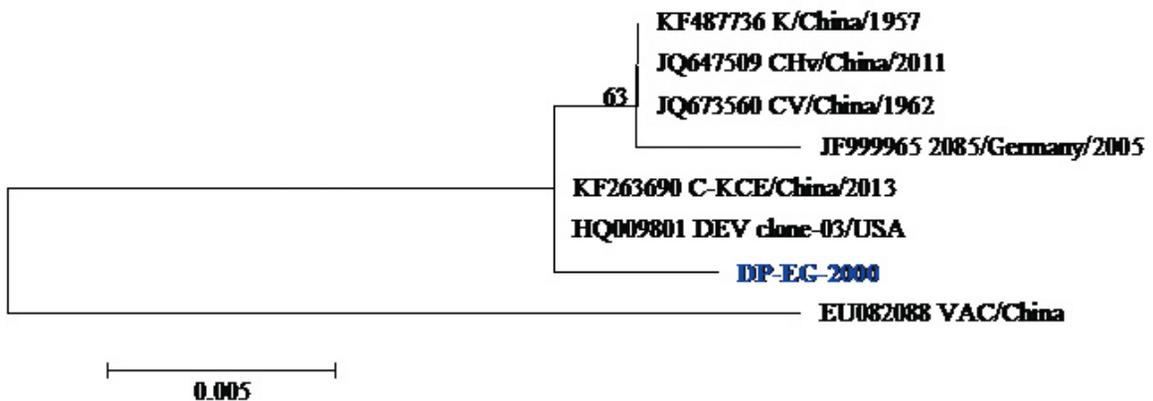


Hình 5. Cây phả hệ biểu thị mối quan hệ di truyền giữa chủng virus vaccin DP-EG-2000 với các chủng virus dịch tả vịt tham chiếu khác dựa trên trình tự vùng gen UL30-UL31

Trình tự vùng gen US7 được cho là có sự đa dạng di truyền khi so sánh giữa các chủng virus dịch tả vịt với nhau, vì vậy chúng tôi tiến hành đánh giá mối quan hệ di truyền giữa chủng virus vaccin DP-EG-2000 và các chủng virus dịch tả vịt tham chiếu khác dựa trên trình tự gen US7.

Kết quả phân tích cây phả hệ cho thấy, chủng virus vaccin DP-EG-2000 cũng có mối quan

hệ di truyền gần gũi với các chủng virus dịch tả vịt phân lập được tại Trung Quốc trong những năm gần đây, tương tự với kết quả phân tích cây phả hệ dựa trên vùng gen UL30-UL31. Kết quả phân tích cây phả hệ ở hình 6 cũng cho thấy chủng virus vaccin DP-EG-2000 nằm khác nhánh với chủng virus vaccin VAC của Trung Quốc (Hình 6).



Hình 6. Mối quan hệ di truyền giữa chủng virus vaccin DP-EG-2000 với các chủng virus dịch tả vịt tham chiếu khác dựa trên trình tự gen US7

3.5. Đánh giá một số đặc điểm sinh học của chủng virus vaccin DP-EG-2000

3.5.1. Kết quả xác định chỉ số ELD50 của chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000

Theo Lê Văn Lĩnh (1991), chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt Jansen khi nuôi cấy trên phôi gà có chỉ số ELD50 biến động trong khoảng từ $10^{-4.2}/0,2$ ml đến $10^{-4.5}/0,2$ ml.

Theo OIE (2000), một chủng virus nhược độc dịch tả vịt khi thích nghi trên phôi trứng gà dùng làm vaccin phải có nồng độ virus tối thiểu là 10^3 ELD50/một liều sử dụng. Trong nghiên cứu này, kết quả kiểm tra của chúng tôi đối với chủng virus vaccin DP-EG-2000 cho thấy chỉ số ELD50 qua các lần chuẩn độ là ổn định, dao động từ $10^{-4.2}/0,2$ ml đến $10^{-4.5}/0,2$ ml. ELD50 trung bình của chủng virus vaccin DP-EG-2000 đạt $10^{-4.3}/0,2$ ml (Bảng 5).

Bảng 5. Kết quả xác định chỉ số ELD50 của chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000

Đợt kiểm tra	Độ pha loãng virus	Liều gây nhiễm (ml)	Số phôi TN	ELD50	ELD50 trung bình
1	$10^{-1} - 10^{-7}$	0,2	5	$10^{-4.2}$	$10^{-4.3}$
2	$10^{-1} - 10^{-7}$	0,2	5	$10^{-4.2}$	
3	$10^{-1} - 10^{-7}$	0,2	5	$10^{-4.5}$	

3.5.2. Kết quả xác định chỉ số EID50 của chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000

Chỉ số EID50 qua các lần chuẩn độ là ổn định, biến động từ $10^{-5.2}/0,2$ ml đến $10^{-5.4}/0,2$ ml. EID50 trung bình của chủng virus vaccin DP-EG-2000 là $10^{-5.3}/0,2$ ml.

Bảng 6. Kết quả xác định chỉ số EID50 của chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000

Đợt kiểm tra	Độ pha loãng virus	Liều gây nhiễm (ml)	Số phôi TN	EID50	EID50 trung bình
1	$10^{-1} - 10^{-7}$	0,2	5	$10^{-5.4}$	$10^{-5.3}$
2	$10^{-1} - 10^{-7}$	0,2	5	$10^{-5.4}$	
3	$10^{-1} - 10^{-7}$	0,2	5	$10^{-5.2}$	

Như vậy, kết quả xác định chỉ số ELD50 và EID50 cho thấy chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000 thích ứng và phát triển ổn định trên phôi gà.

Trong nghiên cứu sản xuất vaccin, việc xác định được chỉ số EID50 của chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000 là vô cùng quan trọng giúp cho việc nghiên cứu xác định được liều gây nhiễm virus thích hợp trên trứng. Trong thực tế sản xuất, để chắc chắn phôi trứng gà bị nhiễm virus, người ta thường dùng nồng

độ 100 - 1000 lần liều EID50.

IV. KẾT LUẬN

Chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000 có độ tương đồng về trình tự nucleotide và amino acid cao khi so sánh với những chủng virus dịch tả vịt tham chiếu khác trên thế giới.

Chỉ số sinh học ELD50 và EID50 của chủng virus vaccin nhược độc dịch tả vịt DP-EG-2000 ổn định sau những lần cấy chuyển trên phôi

trứng gà, chỉ số ELD50 và EID50 tương ứng là $10^{-4,3}$ và $10^{-5,3}/0,2$ ml, đáp ứng được yêu cầu trong sản xuất vacxin phòng bệnh dịch tả vịt cho vịt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Edan, M., & Bourgeois, N. (2006). Review of free-range duck farming systems in Northern Vietnam and assessment of their implication in the spreading of the Highly Pathogenic (H5N1) strain of Avian Influenza (HPAI). *Edan M*, 1-101.
- Hu, Y., Zhou, H., Yu, Z., Chen, H. and Jin, M. (2009). Characterization of the genes encoding complete US10, SORF3, and US2 proteins from duck enteritis virus. *Virus Genes*, 38, 295-301
- Lưu Phước Hậu (2005), Điều tra và lập bản đồ dịch tễ bệnh lở mồm long móng, dịch tả heo, dịch tả vịt tại Cần Thơ, *Kiểm nghiệm các công trình nghiên cứu, ứng dụng KHCN TP. Cần Thơ giai đoạn 2001-2005*, tr 30-37
- Lê Văn Lãnh (1991), “Khảo sát một số đặc tính sinh học giống virus vacxin Jansen và chế vacxin phòng bệnh dịch tả vịt”, *Tuyển tập công trình nghiên cứu KHKT Nông nghiệp 1986-1991*, NXB Nông nghiệp, tr. 120-121.
- Li, Y., Huang, B., Ma, X., Wu, J., Li, F., Ai, W.,... & Yang, H. (2009). Molecular characterization of the genome of duck enteritis virus. *Virology*, 391 (2), 151-161.
- Morrissy, C. J., Daniels, P. W., Lowther, S. L., Goff, W., Pritchard, I., và Tran, D. T. (2003). Duck plague in Vietnam and the development of diagnostic capability. Proceedings of a workshop held at NAVETCO, Ho Chi Minh City, Vietnam, 18-20 August 2003.
- Nguyễn Bá Hiền và Huỳnh Thị Mỹ Lệ (2013) *Bệnh truyền nhiễm của động vật nuôi và biện pháp khống chế*, NXB Nông nghiệp
- Nguyễn Đức Hiền (2012). Đáp ứng miễn dịch tạo thành sau tiêm chủng vacxin phòng bệnh dịch tả vịt ở vịt xiêm. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, 18 (5), 1-5.
- OIE (2000), *Manual of Standards for diagnostic test and vaccines*, http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00111.htm.
- 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
- Wang, J., Höper, D., Beer, M., & 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 research*, 160 (1), 316-325.
- Wolf, K., & Burke, C. N. (1982). Survival of duck plague virus in water from Lake Andes National Wildlife Refuge, South Dakota. *Journal of wildlife diseases*, 18 (4), 437-440.
- Wu, Y., Cheng, A., Wang, M., Zhu, D., Jia, R., Chen, S.,... & Chen, X. (2012). Comparative genomic analysis of duck enteritis virus strains. *Journal of virology*, 86 (24), 13841-13842.
- Yang, C., Li, Q., Li, J., Zhang, G., Li, H., Xia, Y.,... & Yu, K. (2014). Comparative genomic sequence analysis between a standard challenge strain and a vaccine strain of duck enteritis virus in China. *Virus genes*, 48 (2), 296-303.
- Zhang, S., Xiang, J., Cheng, A., Wang, M., Wu, Y., Yang, X., Zhu, D., Jia, R., Luo, Q., Chen, Z. and Chen, X. (2011). Characterization of duck enteritis virus UL53 gene and glycoprotein K. *Virol J*, 8, 235.

Nhận ngày 20-8-2015

Phản biện ngày 20-9-2015