

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TEMBUSU VIRUS (FLAVIVIRUS) CAUSING DISEASE IN DUCKS IN VIETNAM, 2023

Nguyen Hong Minh¹, Nguyen Tien Thanh¹, Nguyen Huu Dai¹, Nguyen Huu Hai¹,
Nguyen Minh Anh¹, Pham Thi Khanh Linh², Bui Van Ngoc², Nguyen Thi Thu Hien²,
Le Thi Hue², Luu Minh Duc², Doan Thi Thanh Huong^{2*}

¹CNC Veterinary Medicine Trading and Production Joint Stock Company

²Institute of Biotechnology (IBT) - Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 11/11/2024	Duck Tembusu virus (DTMUV) is an emerging pathogen that has caused significant economic losses to the duck farming industry in Vietnam in recent years. Despite its importance, research on the disease, the causative virus, and preventive vaccines remains limited. This study successfully isolated a DTMUV strain, BYDCNC10.1, from a diseased sample collected in Dong Nai province in 2023. After five continuous passages in BHK21 cell lines, the BYDCNC10.1 strain achieved a high titer (10^5 TCID ₅₀ /ml) and was stable and pure. Total RNA was extracted from the isolated virus, sequenced the E gene and analyzed. Phylogenetic analysis revealed that the BYDCNC10.1 strain belonged to cluster 2.1 and was closely related to Thai strains within the same genetic group, with nucleotide and amino acid identities of 99.6-100% and 99.1-100%, respectively. Our findings are consistent with previous reports in Vietnam, indicating that DTMUV cluster 2.1 is the predominant circulating strain in the country.
Revised: 10/6/2025	
Published: 11/6/2025	
KEYWORDS	
50% tissue culture infectious dose (TCID ₅₀)	
E gene	
Genotype	
Phylogeny	
Tembusu virus	

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ CỦA VIRUS TEMBUSU (FLAVIVIRUS) GÂY BỆNH TRÊN VỊT TẠI VIỆT NAM NĂM 2023

Nguyễn Hồng Minh¹, Nguyễn Tiến Thành¹, Nguyễn Hữu Đại¹, Nguyễn Hữu Hải¹,
Nguyễn Minh Anh¹, Phạm Thị Khánh Linh², Bùi Văn Ngọc², Nguyễn Thị Thu Hiền²,
Lê Thị Huệ², Lưu Minh Đức², Đoàn Thị Thanh Hương^{2*}

¹Công ty Cổ phần sản xuất và thương mại thuốc thú y CNC

²Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 11/11/2024	Virus Tembusu (DTMUV) là một loại virus mới nổi và gây nhiều thiệt hại về kinh tế cho ngành chăn nuôi vịt tại Việt Nam trong thời gian gần đây. Cho đến nay các nghiên cứu về bệnh, virus gây bệnh và vaccine phòng bệnh vẫn còn rất hạn chế. Nghiên cứu này đã phân lập thành công chủng virus Tembusu BYDCNC10.1 từ mẫu bệnh phẩm thu nhận tại tỉnh Đồng Nai năm 2023. Sau 5 đời gây nhiễm liên tục trên tế bào BHK21, chủng virus BYDCNC10.1 đạt được hiệu giá virus cao (10^5 TCID ₅₀ /ml), ổn định và thuần khiết. Virus sau phân lập được tách chiết RNA tổng số, giải trình tự và phân tích đặc điểm phân tử của gen kháng nguyên E. Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc cho thấy chủng virus Tembusu BYDCNC10.1 thuộc cluster 2.1 và có mối quan hệ gần gũi với các chủng của Thái Lan trong cùng nhóm di truyền, với tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và amino acid lần lượt là 99,6–100% và 99,1–100%. Kết quả nghiên cứu phù hợp với các công bố trước đây của Việt Nam cho thấy cluster DTMUV 2.1 là chủng virus đang lưu hành tại Việt Nam.
Ngày hoàn thiện: 10/6/2025	
Ngày đăng: 11/6/2025	
TỪ KHÓA	
Liều gây nhiễm 50% tế bào (TCID ₅₀)	
Gen E	
Genotype	
Phả hệ nguồn gốc	
Virus Tembusu	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.11531>

* Corresponding author. Email: doantthuong74@gmail.com

1. Giới thiệu

Trong vài năm trở lại đây, bệnh Tembusu do virus Tembusu (DTMUV) gây ra ở vịt đang trở nên phổ biến tại Việt Nam, gây thiệt hại về kinh tế cho người chăn nuôi. DTMUV lần đầu tiên được phân lập từ các mẫu muỗi thu thập ở Malaysia năm 1955 [1]; tiếp đó được công bố tại Thái Lan và Malaysia từ năm 1992 đến năm 2002 [2], [3]. Kể từ năm 2010, bệnh Tembusu bùng phát tại Trung Quốc và virus được phát hiện ở nhiều mẫu gia cầm bao gồm gà, vịt, ngỗng, chim bồ câu, chim sẻ [4], [5]. Vịt nhiễm virus DTMUV thường bị sụt cân, tiêu chảy, chậm phát triển và đặc biệt giảm đẻ trứng; tỷ lệ mắc bệnh có thể lên tới 90%, tỷ lệ chết dao động từ 5-30% [6], [7]. Virus rất dễ lây lan do đó gây thiệt hại to lớn cho ngành chăn nuôi vịt [7], [8]. Điều đáng chú ý là đã có công bố cho rằng virus DTMUV cũng có thể lây từ động vật sang người ở Trung Quốc [9]. Virus DTMUV cũng có thể lây nhiễm sang một số gia cầm khác như gà, ngỗng, chim bồ câu [5].

Virus DTMUV là một loại Flavivirus, thuộc họ Flaviviridae [10]. Virus có hệ gen là RNA sợi đơn dương, kích thước khoảng 11 kb và chứa duy nhất một khung đọc mở (Open Reading Frame - ORF) mã hóa cho một polyprotein lớn gồm ba protein cấu trúc và bảy protein không cấu trúc. Ba protein cấu trúc bao gồm protein capsid (C), protein tiền màng (prM) và protein vỏ (E). Bảy protein không cấu trúc bao gồm các protein NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b và NS5. Trong số các protein cấu trúc, protein E có vai trò quan trọng quyết định tính kháng nguyên và độc lực của virus, đồng thời là vùng gen có nhiều đột biến nhất trong toàn bộ hệ gen [11], [12]. Dựa trên phân tích dữ liệu gen E cho thấy, DTMUV lưu hành ở châu Á có thể chia thành ba nhóm (cluster) riêng biệt, bao gồm: cluster 1, cluster 2 (gồm subcluster 2.1 và 2.2) và cluster 3 [13]. Tại Trung Quốc gồm hai nhóm subcluster 2.1 (với các chủng phân lập gần đây) và subcluster 2.2 (với các chủng phân lập trước năm 2013) [14], [15]. Ngoài ra, công bố của Zhu và cộng sự [11] cho thấy đã xuất hiện thêm chủng DTMUV mới có quan hệ gần gũi hơn với các chủng của Thái Lan.

Tại Việt Nam, bệnh Tembusu đã xuất hiện và lưu hành rộng khắp tại nhiều địa phương, đặc biệt từ năm 2019 trở lại đây, gây thiệt hại lớn về kinh tế [16]. Tuy nhiên, vaccine phòng bệnh này vẫn còn rất hạn chế. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm lựa chọn chủng virus DTMUV tiềm năng để phục vụ phát triển vaccine phòng bệnh Tembusu cho vịt tại Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu bệnh phẩm là hỗn hợp phủ tạng (gan, não, tim, phổi, lách, buồng trứng) của vịt ốm có triệu chứng nghi ngờ do virus Tembusu gây ra năm 2023 tại trang trại vịt ở Đồng Nai (ký hiệu BYDCNC10.1). Mẫu bệnh phẩm được xử lý tại phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp 2 của Công ty Cổ phần sản xuất và thương mại thuốc thú y CNC.

Tế bào dòng BHK21 dùng trong gây nhiễm và xác định hiệu giá virus do Chi cục Thú y vùng VI cung cấp. Tế bào BHK21 được nuôi cấy trên chai nuôi cấy tế bào T25 và T75 cho đến khi đạt độ phủ kín bề mặt chai trên 90%.

Vịt âm tính với kháng thể kháng lại virus gây bệnh Tembusu, được ấp nở từ nguồn trứng của đàn bố mẹ đã được xác định không có kháng thể kháng virus gây bệnh Tembusu.

RNA tổng số được tách chiết bằng bộ kit của hãng Qiagen, sau đó tổng hợp cDNA bằng môi random hexamers.

Phản ứng PCR được thực hiện bằng bộ sinh phẩm Dream Taq PCR master mix của hãng Thermo.

Cặp mồi thu nhận gen E được thiết kế dựa trên so sánh trình tự nucleotide của các chủng virus Tembusu đăng kí trên GenBank (Hình 2). Thông tin về cặp mồi được trình bày ở Bảng 1.

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp gây nhiễm virus trên tế bào BHK21

Các bệnh phẩm (lách, gan, não) được nghiền thành huyền dịch trong môi trường DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) chứa thành phần chính là các loại muối vô cơ,

axit amin, vitamin và đường; sau đó lọc qua bộ lọc có kích thước 0,22 μm . Huyền dịch virus sau lọc được sử dụng để gây nhiễm trên tế bào BHK21.

Khi chai nuôi tế bào có mật độ tế bào phủ kín đáy, tiến hành loại bỏ hoàn toàn môi trường duy trì trong chai và tráng lại bằng dung dịch đệm phosphat (PBS) 1X.

Gây nhiễm 1 ml huyền dịch virus vào chai nuôi tế bào, lắng đều huyền dịch virus, ủ 37 °C/ 5% CO₂/ 1 giờ, sau đó loại bỏ huyền dịch và rửa lại bằng 10 ml PBS 1X. Bổ sung vào mỗi chai 25 ml môi trường DMEM và tiếp tục nuôi tế bào sau gây nhiễm ở 37 °C/ 5% CO₂. Hàng ngày quan sát biến đổi bệnh tích tế bào. Thu hoạch virus khi tế bào bị phá hủy đạt 80-90% diện tích đáy chai nuôi.

Hỗn dịch virus gây nhiễm trên tế bào được đông tan ba lần và ly tâm 4000 vòng/phút trong 20 phút để loại bỏ cặn tế bào [17].

Phương pháp xác định sự có mặt của DTMUV và kiểm tra thuần khiết

Huyền dịch virus sau gây nhiễm được tách chiết RNA tổng số và DNA tổng số để kiểm tra sự có mặt của virus Tembusu (DTMUV), virus cúm gia cầm (AIV); virus dịch tả vịt (DEV), virus rút mỏ vịt (GPV) và virus circo vịt (GoCV/DuCV) (Bảng 1).

Phương pháp xác định hiệu giá virus (TCID₅₀)

Dịch virus được pha loãng theo cơ số 10 bằng môi trường nuôi cấy tế bào thành các nồng độ từ 10⁻¹ đến 10⁻¹⁰. Gây nhiễm virus ở các nồng độ đã pha vào đĩa 96 giếng tế bào BHK21 đã nuôi. Ủ tế bào ở 37 °C; 5% CO₂ trong 60 phút. Loại bỏ huyền dịch trong các giếng, bổ sung 100 μl môi trường DMEM 1% FBS/giếng. Nuôi tế bào ở 37°C, 5% CO₂, theo dõi hàng ngày, trong 5 ngày liên tiếp.

Dựa vào bệnh tích tế bào của các nồng độ virus để tính toán liều gây bệnh tích tế bào 50% (TCID₅₀) theo công thức của Reed và Muench [18].

Phương pháp tách RNA tổng số

Do virus gây bệnh Tembusu (DTMUV) có hệ gen là RNA nên hệ gen của virus được tách chiết bằng bộ sinh phẩm tách chiết RNA tổng số QIAamp Viral Mini Kit (Qiagen, Đức), các bước thực hiện theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất và bảo quản ở -80 °C cho đến khi sử dụng.

Phương pháp chuyển đổi cDNA

DNA bổ sung (cDNA) được tổng hợp theo phương pháp chuyển đổi từ RNA hệ gen của virus bằng môi random hexamer và bộ kit chuyển đổi của hãng Thermo, Mỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thành phần phản ứng với tổng dung tích 20 μl gồm có: 2 μl (100 ng/ μl) RNA tổng số; 1 μl (100 picomol/ μl) môi hexamer; 2 μl dNTP mix (10 mM); 4 μl 5X Reaction buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT); 2 μl M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/ μL) và 1 μl RiboLock Rnase Inhibitor (20 U/ μl), nước DEPC cho vừa đủ 20 μl ; Phản ứng chuyển đổi được thực hiện ở 25 °C/5 phút, 37 °C/60 phút và kết thúc ở 70 °C/5 phút. Sản phẩm cDNA được bảo quản ở điều kiện -20 °C cho đến khi sử dụng để thực hiện phản ứng PCR.

2.2.2. Thiết kế môi và thực hiện PCR

Các cặp mồi khuếch đại gen E của virus DTMUV được thiết kế dựa vào so sánh trình tự chuỗi gen DTMUV trên Ngân hàng Gen. Phản ứng PCR sử dụng hỗn hợp phản ứng gồm 25 μl Dream Taq PCR Master Mix, 2 μl mồi xuôi, 2 μl mồi ngược và 2 μl DMSO, được bổ sung nước tinh khiết đến thể tích cuối cùng là 50 μl . Chu trình nhiệt gồm các bước: 94 °C/5 phút trong 1 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ ở 94 °C/1 phút, 46 °C/1 phút và 72 °C/2 phút; chu kỳ cuối kéo dài 10 phút ở 72 °C. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng QIAquick PCR Purification Kit và giải trình tự trực tiếp bằng phương pháp Sanger. Các cặp mồi phát hiện virus cúm gia cầm, virus dịch tả vịt, virus rút mỏ vịt và duck circovirus được dùng để đánh giá sự thuần khiết của chủng giống (Bảng 1).

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Chuỗi nucleotide được xử lý bằng chương trình Seqed1.3, so sánh bằng chương trình AssemblyLIGN1.9 và MacVector8.2 (Accelrys Inc.) trên máy tính Macintosh. Việc giám định chuỗi được thực hiện bằng cách truy cập vào GenBank sử dụng chương trình BLAST

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để xem xét thu nhận các chuỗi tương ứng cùng và khác loài/chi/họ để so sánh đối chiếu.

Các trình tự tương ứng với vùng gen E đăng ký tại GenBank được sử dụng để so sánh đối chiếu với chuỗi gen nghiên cứu, sử dụng chương trình GENEDOC2.7 (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>) [19].

Phân tích phả hệ nguồn gốc bằng chương trình MEGA10 (<https://www.megasoftware.net/>) với hệ số tin cậy 1000 bootstrap [20].

Bảng 1. Danh sách các cặp môi dùng trong nghiên cứu

Tên môi	Trình tự môi	Gen đích	Kích thước	Mục đích
DTMUVE-F	ATCCAGATGCCCAACCATGG	E	565 bp	Chẩn đoán virus Tembusu (DTMUV)
DTMUVE-R	TTCTTGATGATGCCAAAGCC			
DTMUVE-F1	TTCAGCTGTCTGGGGATG	E	1503 bp	Giải trình tự gen E của DTMUV
DTMUVE-R1	GGCATTGACATTTACTGCCA			
H5-F2	AGGACACACACAACGGGAAGC	H5	760 bp	Chẩn đoán virus cúm gia cầm
H5-R2	CCATTGGAGTTGACACTTGG			
DTV-F	GAAGGCGGGTATGTAATGTA	UL5/	0,45 kb	Chẩn đoán virus dịch tả vịt (DEV)
DTV-R	CAAGGCTCTATTCGGTAATG	DEV		
nGPV-VP1F	AGACTTATCAACAACCAAT	VP1/	0,8 kb	Chẩn đoán virus rết mỏ vịt (GPV)
nGPV-VP1R	TCACTTATTCCTGCTGTAG	GPV		
Circo-F	ATATTATTACCGGCGC(C/T) GTA	GoCV	256 bp/GoCV	Chẩn đoán virus circo vệt
Circo-R	TCAGGAATCCCTG(A/C)AGGTGA	DuCV	228 bp/DuCV	

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả phân lập chủng BYDCNC10.1

Chủng virus Tembusu BYDCNC10.1 được phân lập và cấy chuyển 5 đời liên tục trên tế bào BHK21. Kết quả cho thấy bệnh tích tế bào (CPE) bắt đầu xuất hiện từ lần cấy chuyển virus ở đời thứ hai và tăng lên ở các đời tiếp truyền sau, từ đời thứ ba đến đời thứ năm. Virus thu được ở đời tiếp truyền thứ năm có hiệu giá cao, đạt $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml. Kết quả kiểm tra hiệu giá virus cho thấy chủng BYDCNC10.1 là chủng có tiềm năng để tiếp tục nghiên cứu phát triển vaccine [21], [22].

3.2. Kết quả gây nhiễm trên vịt con

Chủng virus Tembusu BYDCNC10.1 ở đời gây nhiễm thứ năm tiếp tục được xác định độc lực bằng phương pháp gây nhiễm trên vịt con 14 ngày tuổi, theo dõi trong vòng 14 ngày. Kết quả thí nghiệm cho thấy vịt con sau khi bị gây nhiễm với virus đều thể hiện triệu chứng của bệnh gồm tiêu chảy phân trắng loãng, chảy nước mắt, nước mũi, mất thăng bằng. Mô khám bệnh tích cho thấy xuất hiện bệnh tích đặc trưng ở các cơ quan nội tạng như tim, lách.

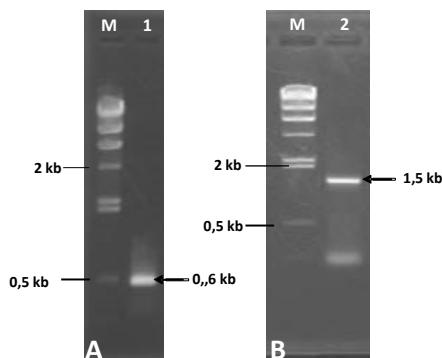
3.3. Kết quả xác định virus Tembusu sau phân lập

Huyền dịch virus thu được sau gây nhiễm 48 giờ được thu nhận, đông tan ba lần (ở -80°C), ly tâm 4.000 vòng/phút ở 4 °C trong 15 phút để loại cặn tế bào. Dịch virus Tembusu BYDCNC10.1 được sử dụng để tách RNA tổng số, chuyển cDNA và thực hiện PCR với cặp môi chẩn đoán virus Tembusu và cặp môi thu nhận vùng gen kháng nguyên E (kích thước dự kiến 1503 bp). Kết quả được trình bày ở Hình 1. Kết quả cho sản phẩm PCR dương tính với cả hai cặp môi, đơn băng và có chất lượng tốt. Từ đó cho thấy chủng BYDCNC10.1 đã được nhân lên thành công trên môi trường tế bào BHK21.

3.4. Kết quả kiểm tra thuần khiết

Chủng virus BYDCNC10.1 sau phân lập được tách chiết RNA tổng số và DNA tổng số để kiểm tra sự có mặt của virus cúm gia cầm, virus dịch tả vịt, virus rết mỏ vịt và duck circovirus

bằng kỹ thuật RT-PCR và PCR sử dụng các cặp mồi chẩn đoán ở Bảng 1. Kết quả kiểm tra cho thấy tất cả các sản phẩm PCR và RT-PCR đều âm tính, chứng tỏ chủng virus Tembusu BYDCNC10.1 hoàn toàn thuần khiết, không bị tạp nhiễm bốn loại virus trên.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi chẩn đoán virus Tembusu (A) và cặp mồi thu nhận gen kháng nguyên E (B) của chủng BYDCNC10.1. Giếng M (hình A và B): thang DNA chuẩn (DNA của thực khuẩn thể λ được cắt bằng enzyme HindIII); giếng 1 sản phẩm PCR của mẫu BYDCNC10.1 với cặp mồi chẩn đoán virus Tembusu; giếng 2 sản phẩm PCR của mẫu BYDCNC10.1 với cặp mồi thu nhận gen kháng nguyên E (dự kiến 1503 bp)

3.5. Kết quả giải trình tự và phân tích gen E của chủng virus Tembusu BYDCNC10.1

Sản phẩm PCR thu nhận vùng gen E của chủng BYDCNC10.1 được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp bằng phương pháp Sanger, gồm 1312 nucleotide. Trình tự gen E được đăng kí GenBank (mã số PQ963419) và tiến hành Blast để kiểm tra, so sánh và tìm kiếm các chuỗi gen đã được đăng ký trên GenBank dựa vào mức độ tương ứng về thành phần nucleotide.

3.6. Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc

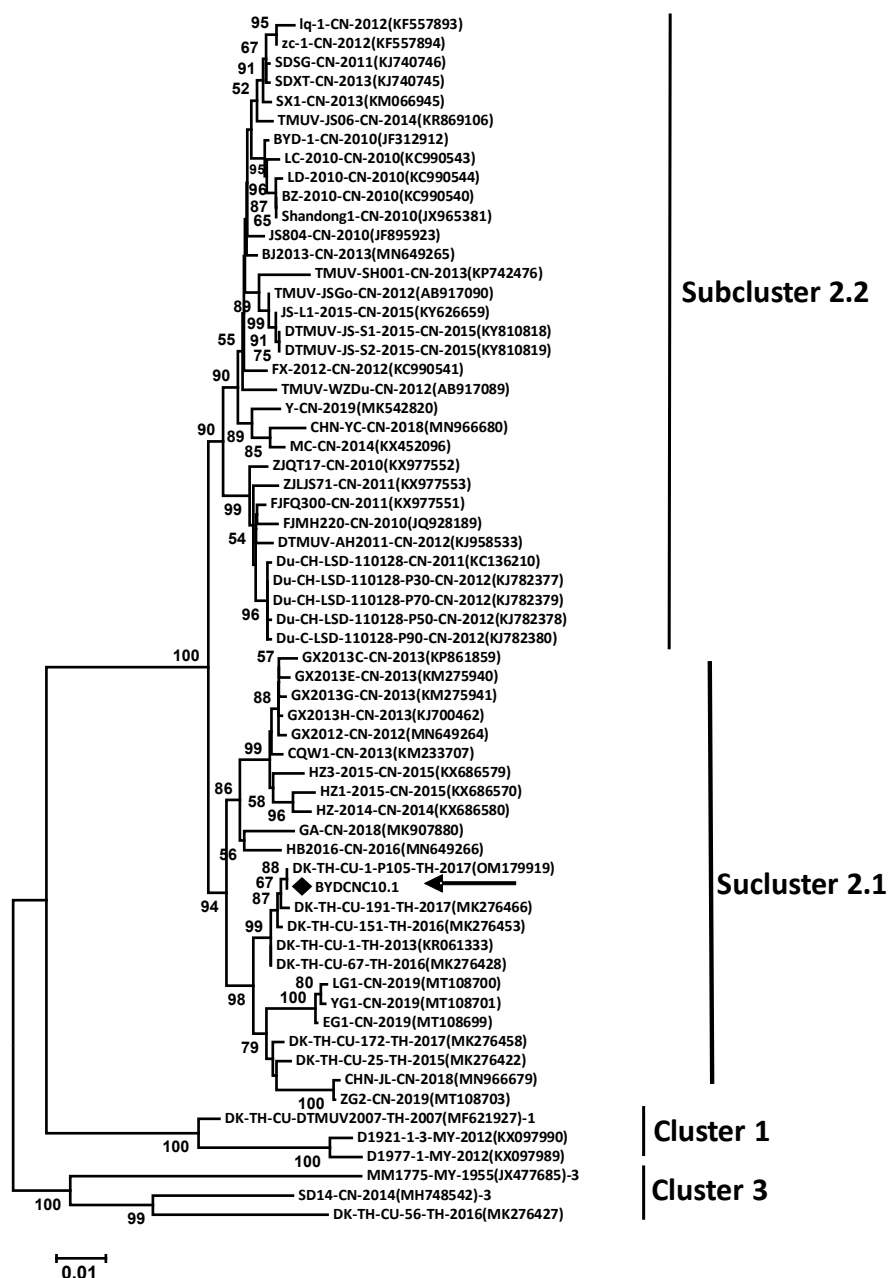
Trình tự nucleotide gen E của chủng BYDCNC10.1 nghiên cứu được phân tích phả hệ nguồn gốc cùng 62 chủng DTMUV của thế giới trên GenBank (Hình 2).

Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc phù hợp với công bố của Zhu và cộng sự [11], Ninvilai và cộng sự [13] cho thấy các chủng virus Tembusu được phân thành ba nhóm di truyền riêng biệt, bao gồm cluster 1, cluster 2 (gồm subcluster 2.1 và 2.2) và cluster 3.

Nhóm cluster 1 gồm các chủng DTMUV của Thái Lan và Malaysia. Nhóm cluster 2 gồm hai subcluster 2.1 và 2.2. Nhóm subcluster 2.1 gồm ba phân nhóm, trong đó phân nhóm thứ nhất gồm toàn bộ các chủng của Trung Quốc; phân nhóm thứ hai gồm các chủng của Thái Lan và chủng BYDCNC10.1 của Việt Nam trong nghiên cứu; và phân nhóm thứ ba gồm tập hợp một số chủng của Trung Quốc và Thái Lan. Nhóm subcluster 2.2, bao gồm toàn bộ các chủng DTMUV của Trung Quốc. Nhóm cluster 3 gồm các chủng của Malaysia, Thái Lan và Trung Quốc.

Cho đến nay, các chủng virus Tembusu của Trung Quốc được phân lập và công bố nhiều nhất, thuộc nhiều nhóm di truyền khác nhau. Tiếp đó là các chủng virus của Thái Lan. Tại Việt Nam có 6 trình tự vùng gen E được công bố trên GenBank, tuy nhiên các trình tự gen này chỉ gồm 401 bp nên không đủ kích thước để phân tích phả hệ nguồn gốc trong nghiên cứu này.

Kết quả phân tích phả hệ dựa trên gen kháng nguyên E cho thấy chủng virus BYDCNC10.1 của Việt Nam thuộc nhóm subcluster 2.1 cùng với các chủng của Thái Lan. Kết quả nghiên cứu phù hợp với công bố của Đặng Hữu Anh và cộng sự [16] cho thấy các chủng DTMUV phân lập tại Việt Nam năm 2019 gần gũi với các chủng của Thái Lan. Từ đó cho thấy chủng virus BYDCNC10.1 phân lập năm 2023 giống với các chủng virus đang lưu hành tại Việt Nam.



Hình 2. Cây phả hệ xác định mối quan hệ phả hệ của virus DTMUV dựa trên phân tích dữ liệu nucleotide của gen E. Ghi chú: Biểu tượng mũi tên để đánh dấu chủng BYDCNC10.1 của Việt Nam trong nghiên cứu.

Đại diện các chủng DTMUV trên ngân hàng gen thuộc 3 nhóm di truyền (cluster 1, subcluster 2.1, subcluster 2.2 và cluster 3). Trên mỗi chuỗi có tên chủng, tiếp theo là tên quốc gia và số đăng ký GenBank ở cuối chuỗi. Vạch ngang ở cuối hình (0.01) biểu thị sai khác nucleotide (1/100) ở mỗi nhánh.

3.7. Kết quả so sánh tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và amino acid giữa các chủng DTMUV

Kết quả so sánh tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và tương đồng về amino acid gen kháng nguyên E giữa các chủng DTMUV cho thấy các chủng DTMUV có tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và amino acid tương ứng từ 87,8–100% và từ 94,6–100%. Trong đó, các chủng trong cùng nhóm di truyền có tỷ lệ đồng nhất cao hơn. Cụ thể, các chủng trong cùng cluster 1 có tỷ lệ đồng nhất từ 96,3–98,9% về nucleotide, và từ 98,5–98,9% về amino acid; các chủng trong cùng cluster 3 có tỷ

lệ đồng nhất từ 89,8–93,9% về nucleotide, và từ 94,8–97,4% về amino acid; các chủng trong cùng subcluster 2.1 có tỷ lệ đồng nhất từ 96,3–100% về nucleotide, và từ 98,2–100% về amino acid; các chủng trong cùng subcluster 2.2 có tỷ lệ đồng nhất từ 98–99,4% về nucleotide, và từ 98,2–99,5% về amino acid. Giữa các cluster, tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và amino acid của gen E giữa các chủng đạt thấp hơn.

Chủng BYDCNC10.1 của Việt Nam có tỷ lệ đồng nhất cao với các chủng của Thái Lan trong cùng nhóm subcluster 2.1, tương ứng từ 99,6–100% về nucleotide và từ 99,1–100% về amino acid.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thống nhất với kết quả nghiên cứu dựa trên vùng gen NS5B của nhóm tác giả Đặng Hữu Anh và cộng sự [16] và công bố của Trương Minh Đạt và Hoàng Thanh Hải [23].

Cho đến nay các công bố về giải mã gen virus gây bệnh Tembusu tại Việt Nam còn rất hạn chế, cũng như còn thiếu vaccine để phòng căn bệnh này. Chính vì vậy việc phân lập, đánh giá đặc điểm sinh học và lựa chọn được các chủng virus tiềm năng để sản xuất vaccine là việc làm vô cùng cần thiết hiện nay. Chủng BYDCNC10.1 mà nghiên cứu tuyển chọn có hiệu giá virus cao, ổn định qua các đời tiếp truyền và có tính tương đồng cao với các chủng thực địa phân lập tại Việt Nam. Từ đó cho thấy đây là chủng tiềm năng để phát triển vaccine.

4. Kết luận

Chủng virus Tembusu BYDCNC10.1 phân lập tại Việt Nam có đặc tính sinh học ổn định sau 5 đời tiếp truyền, có hiệu giá virus cao (TCID₅₀ trung bình đạt 10⁵/ml) và thuần khiết. Nghiên cứu cũng đã thu nhận và giải trình tự gen kháng nguyên E của chủng DTMUV và phân tích phả hệ nguồn gốc. Kết quả phân tích đã xác định chủng virus BYDCNC10.1 phân lập thuộc subcluster 2.1, là các chủng virus đang gây bệnh phổ biến tại Việt Nam. Chủng virus BYDCNC10.1 sẽ được lưu giữ cho các nghiên cứu tiếp theo để phát triển vaccine phòng bệnh Tembusu cho vịt tại Việt Nam.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ kinh phí từ Nhiệm vụ Khoa học và Công nghệ cấp Quốc gia “Nghiên cứu chế tạo vắc xin vô hoạt nhũ dầu đa giá phòng hội chứng giảm đẻ, bệnh viêm gan và rớt mỏ ở thủy cầm” mã số ĐTĐL.CN.13/23 do TS. Nguyễn Hồng Minh chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] N. Karabatsos, *International catalogue of arthropod-borne viruses*, San Antonio (TX): American Society for Tropical Medicine and Hygiene, 3rd ed, 1985, p. 3.
- [2] B. D. Pandey, N. Karabatsos, B. Cropp, M. Tagaki, Y. Tsuda, A. Ichinose, and A. Igarashi, "Identification of a flavivirus isolated from mosquitos in Chiang Mai Thailand," *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, vol. 30, no. 1, pp. 161-165, 1999.
- [3] Y. Kono, K. Tsukamoto, M. A. Hamid, A. Darus, T. C. Lian, L. S. Sam, C. N. Yok, K. B. Di, K. T. Lim, and S. Yamaguchi, "Encephalitis and retarded growth of chicks caused by Sitiawan virus, a new isolate belonging to the genus Flavivirus," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 63, no. 1, pp. 94-101, 2000.
- [4] Y. Tang, Y. Diao, H. Chen, Q. Ou, X. Liu, X. Gao, C. Yu, and L. Wang, "Isolation and genetic characterization of a tembusu virus strain isolated from mosquitoes in Shandong, China," *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 62, no. 2, pp. 209-216, 2015.
- [5] M. Liu, S. Chen, Y. Chen, C. Liu, S. Chen, X. Yin, G. Li, and Y. Zhang, "Adapted Tembusu-like virus in chickens and geese in China," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, no. 8, pp. 2807-2809, 2012.
- [6] H. Q. Shen, W. C. Lin, Z. X. Wang, K. Zhang, Z. Q. Yan, Q. F. Zhou, J. P. Qin, Q. M. Xie, Y. Z. Bi, and F. Chen, "Pathogenicity and genetic characterization of a duck Tembusu virus associated with egg-dropping in Muscovy ducks," *Virus Research*, vol. 223, pp. 52-56, 2016.
- [7] P. Yan, Y. Zhao, X. Zhang, D. Xu, X. Dai, Q. Teng, L. Yan, J. Zhou, X. Ji, and S. Zhang, "An infectious disease of ducks caused by a newly emerged Tembusu virus strain in mainland China," *Virology*, vol. 417, no. 1, pp. 1-8, 2011.

- [8] L. Yan, P. Yan, J. Zhou, Q. Teng, and Z. Li, "Establishing a TaqMan-based real-time PCR assay for the rapid detection and quantification of the newly emerged duck Tembusu virus," *Virology Journal*, vol. 8, pp. 1-7, 2011.
- [9] Y. Tang, X. Gao, Y. Diao, Q. Feng, H. Chen, X. Liu, P. Ge, and C. Yu, "Tembusu virus in human, China," *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 60, no. 3, pp. 193-196, 2013.
- [10] P. Liu, H. Lu, S. Li, Y. Wu, G. F. Gao, and J. Su, "Duck egg drop syndrome virus: an emerging Tembusu-related flavivirus in China," *Science China Life Sciences*, vol. 56, pp. 701-710, 2013.
- [11] Y. Zhu, Z. Hu, X. Lv, R. Huang, X. Gu, C. Zhang, M. Zhang, J. Wei, Q. Wu, and J. Li, "A novel Tembusu virus isolated from goslings in China form a new subgenotype 2.1. 1," *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 69, no. 4, pp. 1782-1793, 2022.
- [12] K. Yu, Z. Sheng, B. Huang, X. Ma, Y. Li, X. Yuan, Z. Qin, D. Wang, S. Chakravarty, and F. Li, "Structural, antigenic, and evolutionary characterizations of the envelope protein of newly emerging Duck Tembusu Virus," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, 2013, Art. no. e71319.
- [13] P. Ninvilai, W. Tunterak, K. Oraveerakul, A. Amonsinsin, and A. Thontiravong, "Genetic characterization of duck Tembusu virus in Thailand, 2015-2017: Identification of a novel cluster," *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 66, no. 5, pp. 1982-1992, 2019.
- [14] L. Dai, Z. Li, and P. Tao, "Evolutionary analysis of Tembusu virus: evidence for the emergence of a dominant genotype," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 32, pp. 124-129, 2015.
- [15] P. Ninvilai, N. Nonthabenjawan, B. Limcharoen, W. Tunterak, K. Oraveerakul, W. Banlunara, A. Amonsinsin, and A. Thontiravong, "The presence of duck Tembusu virus in Thailand since 2007: A retrospective study," *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 65, no. 5, pp. 1208-1216, 2018.
- [16] H. A. Dang, V. G. Nguyen, and T. M. L. Huynh, "Some initial result of study on Tembusu virus in the infected ducks in Ha Noi," *Journal of Veterinary Science and Technology*, vol. 27, no. 1, pp. 22-28, 2020.
- [17] J. Zhang, Y. Huang, L. Li, J. Dong, M. Liao, and M. Sun, "Transcriptome analysis reveals the neuro-immune interactions in duck tembusu virus-infected brain," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 7, 2020, Art. no. 2402.
- [18] L. J. Reed and H. Muench, "A simple method of estimating fifty per cent endpoints," *American Journal of Epidemiology*, vol. 27, pp. 493-497, 1938.
- [19] K. B. Nicholas and H. B. Nicholas, "GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments," 1997. [Online]. Available: <https://genedoc.software.informer.com/2.7/>. [Accessed Oct. 15, 2024].
- [20] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar, "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 28, no. 10, pp. 2731-2739, 2011.
- [21] OIE, "World Organisation for Animal Health. Chapter 2.3.4: Minimum requirements for the production and quality control of vaccines," WOA Terrestrial Manual, 2022.
- [22] Ministry of Science and Technology, TCVN 8685-4:2011: "Vaccine testing procedure – Part 4: Egg drop syndrome vaccine, inactivated", 2011.
- [23] D. M. Truong and H. T. Hoang, "Isolation and genetic analysis of Tembusu virus in ducks," *The Journal of Agriculture and Development*, vol. 22, no. 4, pp. 42-48, 2023.