

ĐẶC TÍNH SINH HỌC VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA VIRUS VIÊM PHẾ QUẢN TRUYỀN NHIỄM GÂY BỆNH TRÊN GÀ TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM NĂM 2021

Nguyễn Thị Khuê^{1,2}, Đỗ Thị Roan^{1,2}, Phạm Văn Tiềm³, Đoàn Thị Thanh Hương^{1,2*}

¹Viện Công nghệ sinh học (IBT)

²Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (GUST), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

³Vụ Khoa học và Công nghệ các ngành kinh tế - kỹ thuật, Bộ Khoa học và Công nghệ (MOST)

TÓM TẮT

Hai chủng virus viêm phế quản truyền nhiễm phân lập năm 2021 tại Hưng Yên (ký hiệu IBHYM) và tại Hà Nội (ký hiệu IBHM) được đánh giá một số đặc tính sinh học và đặc tính sinh học phân tử. Kết quả nghiên cứu cho thấy hai chủng virus IBV đều có khả năng thích ứng và nhân lên trên phôi gà 10 ngày tuổi, thời gian gây chết phôi nằm trong khoảng 48 – 72 giờ sau gây nhiễm, cho giá trị EID₅₀/ml trung bình là 10^{5,4} với chủng IBHYM và 10^{5,7} với chủng IBHM. Toàn bộ gen kháng nguyên S (Spike) của hai chủng đã được thu nhận gồm 3.504 nucleotide mã hóa 1168 amino acid. Phân tích phả hệ dựa trên trình tự nucleotide của 40 chủng IBV cho thấy hai chủng IBHYM và IBHM thuộc nhóm genotype QX-like. Các chủng IBV QX-like có mối quan hệ gần gũi với các chủng nhóm HN08-type, LDT3-type và 4/91-type. Tính toán khoảng cách di truyền (KCDT) cho thấy giá trị KCDT của các chủng trong cùng nhóm QX-like có tỷ lệ có tỷ lệ sai khác từ 0,04% - 0,05%, KCDT giữa nhóm genotype QX-like với các nhóm khác có tỷ lệ sai khác khá cao 0,15% - 0,37%.

Từ khóa: Liều gây nhiễm 50% phôi (EID₅₀), gen S, phả hệ, viêm phế quản truyền nhiễm (IBV).

MỞ ĐẦU

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* thuộc họ *Coronaviridae* bộ *Nodovirales* gây ra. 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). Bệnh IB dễ lây lan qua tiếp xúc với những triệu chứng đặc trưng ở đường hô hấp như: ho, hắt hơi và có tiếng ran khí quản. Ngoài ra, bệnh có thể gây ảnh hưởng đến thận, gây viêm thận cấp hoặc mạn tính, gây chảy nước mũi ở gà con và tổn thương ống dẫn trứng, làm giảm năng suất và chất lượng trứng ở đàn gà đẻ (Cavanagh and Britton, 2008). Ngoài việc giảm sản lượng trứng, chất lượng trứng cũng bị giảm mạnh ở những đàn gà nhiễm bệnh do đó ảnh hưởng đến tỷ lệ nở (Cavanagh and Naqi, 2003). Đây là bệnh gây thiệt hại kinh tế rất lớn, bệnh xảy ra quanh năm và trên mọi lứa tuổi ở gà, bệnh xảy ra nghiêm trọng nhất ở gà dưới 6 tuần tuổi và gây thiệt hại nghiêm trọng cho gà nuôi lấy trứng giống và trứng thương phẩm.

Cho đến nay, bệnh IB đã lưu hành ở khắp các quốc gia, gây tổn thất nặng nề về kinh tế. Virus gây bệnh có khả năng biến chủng rất cao với nhiều các kháng nguyên đa dạng (Cavanagh, 2007). Ngoài genotype Massachusetts (Mass), đến nay đã có thêm nhiều sero/genotype mới được công bố trên khắp thế giới như Brazil, Mỹ, Úc, châu Âu, châu Phi, châu Á (Trung Quốc, Đài Loan, Ấn Độ, Nhật bản, Hàn Quốc, Thái Lan) (De Wit *et al.*, 2017; Cook *et al.*, 2012; Ghetas, 2021).

Hệ gen IBV có dạng RNA sợi đơn dương (+ssRNA), kích thước khoảng 27,5 kb đến 28 kb, gồm bốn loại protein cấu trúc: protein gai (Spike, S) gồm hai tiểu phần gen là S1 và S2; protein màng (Membrane, M); protein nhân (Nucleocapsid, N) và protein vỏ (Envelope, E). Hệ gen của IBV thường xuyên biến đổi, đặc biệt trên vùng gen S có nhiều vùng siêu biến đổi (HVR) (Wickramasinghe *et al.*, 2014). Những biến đổi này liên quan và quyết định tính gây bệnh của virus, đến tiến hóa phân tử, phân nhóm kháng nguyên và phân nhóm di truyền (Cavanagh, 2007; Valastro *et al.*, 2016; To *et al.*, 2017).

Giống như các virus ARN khác, những thay đổi tính kháng nguyên của virus IBV thường liên quan đến sự thay đổi về trình tự nucleotide và amino acid của hệ gen, dẫn đến việc tạo ra các kiểu gen khác nhau (Jackwood *et al.*, 2012). Một số nước đã tiến hành đánh giá sự bảo hộ của vaccine thương mại và cho thấy các chủng virus vaccine không tương đồng với chủng virus phân lập từ thực địa (Võ Thị Trà An *et al.*, 2014; Lin and Chen, 2017). Như vậy, những thay đổi trong hệ gen của virus, đặc biệt là ở các gen kháng nguyên dẫn đến biến đổi amino acid của epitope kháng nguyên không tương thích với kháng thể do vaccine có xuất xứ từ các chủng virus cũ tạo nên. Đây chính là nguyên nhân dẫn tới việc dù gà đã được tiêm phòng vaccine nhưng vẫn nhiễm bệnh. Tình trạng

này không chỉ xảy ra ở cả Việt Nam mà còn xảy ra ở rất nhiều quốc gia trên thế giới (Võ Thị Trà An *et al.*, 2014; Lin and Chen, 2017).

Trong nghiên cứu này, chủng virus viêm phế quản truyền nhiễm IBHYM phân lập tại Hưng Yên và IBHM phân lập tại Hà Nội năm 2021 đã được đánh giá một số đặc tính sinh học cũng như sinh học phân tử. Kết quả thu được là cơ sở cho việc bảo tồn nguồn gen tiềm năng phục vụ công tác nghiên cứu và sản xuất vaccine phòng bệnh cho gà tại Việt Nam.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu mẫu virus viêm phế quản truyền nhiễm

Mẫu bệnh phẩm là hỗn dịch phủ tạng (phổi, thận, ống dẫn trứng) thu nhận tại trang trại gà ở Hưng Yên năm 2021 (ký hiệu IBHYM) và Hà Nội (ký hiệu IBHM). Mẫu bệnh phẩm trước tiên được chẩn đoán dương tính IBV bằng phương pháp PCR bằng cặp mồi thiết kế trên vùng gen N đây được coi là cặp mồi chẩn đoán virus IBV đã được công bố trước đây (Feng *et al.*, 2012; Do Thi Roan *et al.*, 2023).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xác định khả năng thích ứng và ổn định của chủng virus IBV nghiên cứu trên phôi gà

Để kiểm tra về khả năng thích ứng và phát triển ổn định trên phôi gà, huyền dịch virus chủng IBHYM và IBHM được tiêm vào xoang niệu mô của trứng gà sạch có phôi 10-11 ngày tuổi, kèm với lô đối chứng tiêm bằng PBS 1X. Phôi gà sau khi gây nhiễm được tiếp tục ấp trong tủ ấm 37°C, theo dõi trong năm ngày, quan sát bệnh tích phôi và thu nước trứng xoang niệu mô đối với những phôi có bệnh tích đặc trưng để đánh giá kết quả.

Phương pháp xác định chỉ số EID₅₀ (liều gây nhiễm 50% phôi) của chủng virus IBHYM và IBHM

Phương pháp xác định chỉ số EID₅₀ được tiến hành gồm các bước như sau: Huyền dịch virus hai chủng IBV phân lập năm 2021 được pha loãng theo cơ số 10 (từ 10⁻¹ đến 10⁻¹⁰) trong nước sinh lý 0,9%. Mỗi độ pha loãng tiêm cho 5 phôi, mỗi phôi tiêm 0,2 ml, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sau khi tiêm, theo dõi phôi ở các thời điểm từ 1 – 5 ngày. Sau 5 ngày theo dõi, trứng được mổ và kiểm tra bệnh tích đặc trưng của phôi trứng do virus IB gây ra (phôi chậm phát triển, cuộn tròn cùng với chứng suy nhược các bắp cơ và lắng urate trong thận, nước xoang niệu mô trong), từ đó tính liều gây nhiễm của virus cho 50% phôi trứng (EID₅₀) theo công thức Spearman-Kärber (1938).

Phương pháp tách ARN tổng số

Do virus viêm phế quản truyền nhiễm (IBV) 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 mồi xác suất (hexamer primers), sử dụng 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 pmol/µl) mồi 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 (nuclease free) cho vừa đủ 20 µl; Phản ứng chuyển đổi được thực hiện: 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.

Thiết kế mồi và thực hiện PCR

Các cặp mồi được sử dụng để khuếch đại gen S được thiết kế dựa vào các trình tự nucleotide công bố trên Ngân hàng gen, nhằm mục đích xác định đặc điểm phân tử và nhóm di truyền của các chủng IBV đang lưu hành. Phản ứng PCR được thực hiện với khuôn cDNA và 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/3 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.

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 Ngân hàng gen 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 S đăng ký tại Ngân hàng gen 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/>; Nicholas KB., 2014).

Phân tích phả hệ nguồn gốc bằng chương trình MEGA11 (<https://www.megasoftware.net/>; Tamura *et al.*, 2021) sử dụng phương pháp “*tiếp cận cực đại*” (ML, maximum-likelihood), thuật toán Jones-Taylor-Thornton (JTT) và Nearest-Neighbor-Interchange (NNI) với hệ số tin cậy 1000 bootstrap.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả xác định khả năng thích ứng và ổn định của chủng IBHYM và IBHM trên phôi gà

Hai chủng IBHYM và IBHM được đã tiến hành gây nhiễm trên phôi trứng gà sạch 10 ngày tuổi. Mỗi chủng virus được pha loãng bằng dung dịch PBS 1X về nồng độ 10^{-2} , tiến hành gây nhiễm vào xoang niệu nang của 10 trứng gà sạch có phôi, mỗi quả tiêm 0,2 ml, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần. Hàn kín lỗ tiêm bằng keo nến, áp tiếp ở tủ áp 37°C và theo dõi trong 120 giờ sau tiêm. Lô đối chứng được tiêm dung dịch PBS 1X. Hàng ngày theo dõi tỷ lệ sống chết của phôi.

Kết quả cho thấy sau 120 giờ theo dõi, cả hai chủng virus cường độc IBHYM và IBHM đều thích ứng và nhân lên trên phôi gà 10 ngày tuổi. Tính thích ứng thể hiện ở sự nhân lên của virus trong phôi gà và thời gian gây chết phôi tập trung chủ yếu trong khoảng từ 48 – 72 giờ sau gây nhiễm. Sau thời gian này phôi không chết hoặc chết rất ít. Phôi chết có biểu hiện đặc trưng của IBV: xung huyết, còi cọc, chân co quắp, màng nhung niệu bám chặt lấy thai (OIE, 2018), kích thước phôi gà của các lô thí nghiệm đều nhỏ hơn $\frac{1}{2}$ so với lô đối chứng. Kết quả trên cho thấy hai chủng cường độc phân lập năm 2021 tại Hưng Yên (IBHYM) và Hà Nội (IBHM) có tính thích ứng cao và gây chết trên phôi gà 10 ngày tuổi.

Kết quả kiểm tra xác định chỉ số EID₅₀ của virus IBV cường độc

Hai chủng virus IBHYM và IBHM được gây nhiễm liên tục 10 đời trên phôi gà 10 ngày tuổi. Virus thu được ở đời tiếp truyền thứ mười được sử dụng để đánh giá hiệu giá virus EID₅₀, thí nghiệm được lặp lại ba lần. Kết quả đánh giá cho thấy chỉ số EID₅₀ của hai chủng virus nghiên cứu dao động từ $10^{5,2} - 10^{5,7}$ EID₅₀/ml. Cụ thể, hiệu giá virus của chủng IBHYM đạt từ $10^{5,2} - 10^{5,6}$ EID₅₀/ml, trung bình đạt $10^{5,4}$ EID₅₀/ml; hiệu giá virus của chủng IBHM đạt từ $10^{5,6} - 10^{5,8}$ EID₅₀/ml; trung bình đạt $10^{5,7}$ EID₅₀/ml (Bảng 1). Theo tiêu chuẩn quy định, hiệu giá EID₅₀ mỗi liều vaccine phải đạt hiệu giá ít nhất là 10^2 EID₅₀. Như vậy kết quả đánh giá chỉ số EID₅₀ của hai chủng IBHYM và IBHM cho thấy là các chủng có tiềm năng để có thể tiếp tục nghiên cứu phát triển tạo vaccine trong tương lai (OIE, 2018; TCVN, 2018).

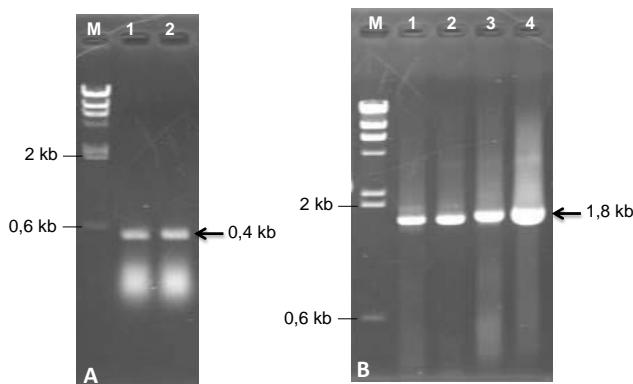
Bảng 1. Kết quả kiểm tra hiệu giá virus của ba chủng IBV nghiên cứu

Chủng thí nghiệm	Độ pha loãng virus	Hiệu giá EID ₅₀ /ml			Hiệu giá EID ₅₀ /ml trung bình
		Lần TN 1	Lần TN 2	Lần TN 3	
IBHYM	$10^{-1} - 10^{-10}$	$10^{5,5}$	$10^{5,2}$	$10^{5,6}$	$10^{5,4}$
IBHM	$10^{-1} - 10^{-10}$	$10^{5,6}$	$10^{5,8}$	$10^{5,7}$	$10^{5,7}$

Kết quả phân tích gen S của chủng IBVP7 cường độc

Đầu tiên, khuôn cDNA được sử dụng để thực hiện PCR với cặp mồi chẩn đoán (Feng *et al.*, 2012; Do Thi Roan *et al.*, 2023). Kết quả đã thu được sản phẩm PCR kích thước khoảng 0,4 kb đúng như dự kiến, cho thấy dịch niệu nang sau gây nhiễm chứa virus IBV (Hình 3.1A).

Tiếp theo, tiến hành thực hiện các phản ứng PCR với các cặp mồi thu nhận từng phân đoạn gen, mỗi phân đoạn gen có kích thước khoảng 1,8 kb nhằm mục đích thu được toàn bộ gen S có kích thước khoảng 3,6 kb. Kết quả cho thấy đã khuếch đại thành công các phân đoạn gen của vùng gen S với chất lượng tốt (Hình 3.1B).



Hình 3.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR của chủng IBHYM và IBHM

Ghi chú: Giếng M: Thang DNA chuẩn (DNA của thực khuẩn thể λ được cắt bằng enzyme HindIII); Hình 3.1A: Sản phẩm PCR nhân đoạn gen N (kích thước khoảng 0,4 kb) để chẩn đoán IBV; Giếng 1: Chủng IBHYM; Giếng 2: Chủng IBHM. Hình 3.1B: Sản phẩm PCR nhân gen S: Giếng 1: Sản phẩm PCR chủng IBHYM sử dụng cặp mồi F2038-R22210 (kích thước khoảng 1,8 kb); Giếng 2: Sản phẩm PCR chủng IBHYM sử dụng cặp mồi F22057-R23890 (kích thước khoảng 1,8 kb); Giếng 3: Sản phẩm PCR chủng IBHM sử dụng cặp mồi F2038-R22210 (kích thước khoảng 1,8 kb); Giếng 4: Sản phẩm PCR chủng IBHM sử dụng cặp mồi F22057-R23890 (kích thước khoảng 1,8 kb).

Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp bằng phương pháp Sanger. Kết quả đã thu nhận được toàn bộ gen S của hai chủng IBHYM và IBHM gồm 3504 nucleotide. Trình tự nucleotide thu nhận được tiến hành Blast trên Ngân hàng gen để kiểm tra, so sánh và tìm kiếm các chuỗi gen đã được đăng ký trong Ngân hàng gen dựa vào mức độ tương ứng về thành phần nucleotide.

Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc dựa trên trình tự gen S

Trình tự 3.504 nucleotide vùng gen S của hai chủng IBV nghiên cứu được phân tích phả hệ nguồn gốc cùng 40 chủng IBV của Việt Nam và thế giới trên Ngân hàng gen đại diện cho các genotype khác nhau (Hình 3.2).

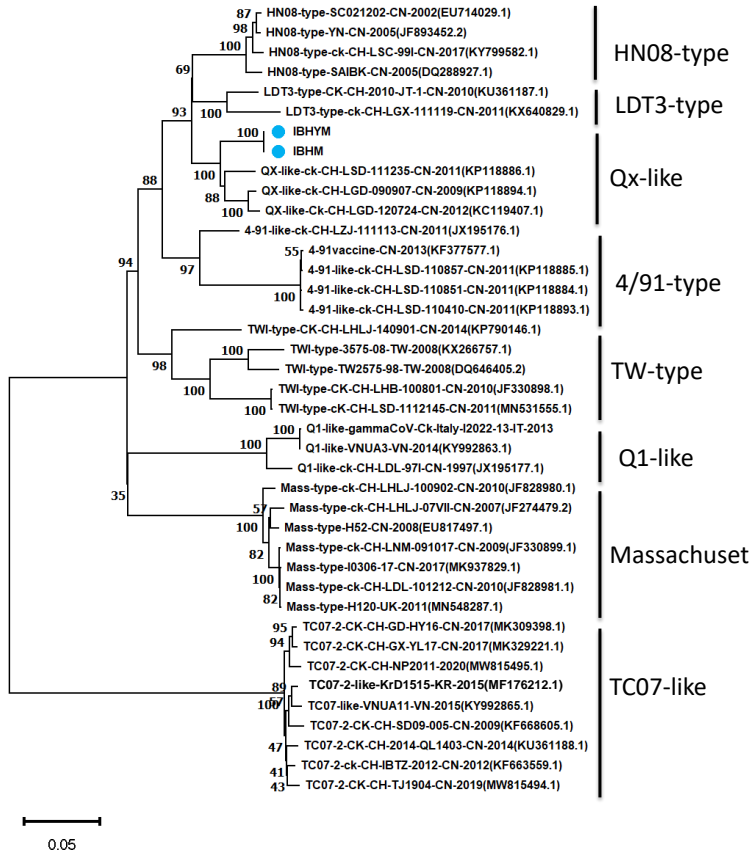
Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc cho thấy hai chủng IBV phân lập tại Hưng Yên và Hà Nội năm 2021 thuộc genotype QX-like với các chủng của Trung Quốc; và gần gũi với các chủng thuộc các nhóm genotype HN08 - type, LDT3 - type và 4/91- type. Đây đều là các chủng có nguồn gốc từ Trung Quốc. Kết quả phân 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. Theo một số ghi nhận của các bác sĩ thú y, IBV thể thận 4/91 cũng đã được nhắc đến tại Việt Nam với mức độ nghiêm trọng cao.

Nhóm genotype Massachuset gồm các chủng IBV của rất nhiều nước trên thế giới bao gồm chủ yếu là Mỹ, Úc, Ý, Netherlands, Trung Quốc, Ấn Độ và Việt Nam. Đây là genotype được công bố đầu tiên trên thế giới. Chủng vaccine IB-H52 hiện đang sử dụng tại Việt Nam thuộc genotype Massachuset.

Nhóm genotype Taiwan (TW-type) gồm các chủng của Đài Loan, Trung Quốc.

Genotype 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. Công bố của Nguyễn Thị Loan và cộng sự năm 2017 cũng phát hiện được genotype Q1-like trên mẫu gà bệnh tại huyện Ba Vì, Hà Nội.

Genotype TC07-like lần đầu tiên được phát hiện gần đây tại Trung Quốc (Jang *et al.*, 2018). Cho đến nay đây là chủng virus có nhiều đột biến nhất trong hệ gen của IBV. Các chủng IBV thuộc genotype TC07-like đứng tách thành một nhánh riêng độc lập với tất cả các genotype còn lại.



Hình 3.2. Cây phả hệ xác định mối quan hệ phả hệ của virus IBV dựa trên phân tích dữ liệu nucleotide của gen S

Ghi chú: Biểu tượng (●) để đánh dấu các chủng IBHYM và IBHM của Việt Nam trong nghiên cứu. Đại diện các chủng IBV trên ngân hàng gen thuộc 8 genotype: 4/91-type, HN08-type, LDT3-type, QX-like, TW-type, Q1-like, Massachuset và TC07-like. Trên mỗi chuỗi có tên chủng, tiếp theo là tên quốc gia và số đăng ký Ngân hàng gen ở cuối chuỗi. Vạch ngang ở cuối hình (0.05) biểu thị sai khác nucleotide (5/1000) ở mỗi nhánh.

Dựa vào giá trị khoảng cách di truyền (KCDT), cho thấy 2 chủng IBHYM và IBHM của Việt Nam có tỷ lệ sai khác thấp từ 0,04% - 0,05% so với 2 chủng của Trung Quốc (QX-like-2009, QX-like-2011) trong cùng nhóm genotype QX-like. Khoảng cách di truyền giữa các chủng QX-like và các chủng thuộc genotype khác dao động từ 0,15% - 0,37%; trong đó gần gũi nhất với các chủng thuộc genotype LDT3-type và HN08-type với khoảng cách di truyền tương ứng từ 0,08% - 0,11% và 0,1%. Điều này chứng tỏ rằng giữa các genotype QX-like, LDT3-type và HN08-type có mối quan hệ gần gũi với nhau. Hai chủng IBV nghiên cứu của Việt Nam có tỉ lệ sai khác về trình tự gen S với các chủng Massachuset, Taiwan và 4/91 - type tương ứng từ 0,15% - 0,21%. Các vaccine phòng IBV hiện nay chủ yếu là các chủng thuộc các genotype này; và một số vaccine QX-like đang bắt đầu được đưa vào sử dụng.

Trong số các chủng IBV, các chủng genotype TC07-like có tỉ lệ sai khác cao nhất với hai chủng của Việt Nam cũng như các chủng IBV thuộc các genotype khác, từ 0,35-0,37%.

Cho đến nay, tại Việt Nam đã có công bố về sự lưu hành của một số chủng IBV, trong đó phổ biến và gây nhiều thiệt hại nhất là các chủng thuộc QX-like. Chính vì vậy việc phân lập, đánh giá đặc điểm sinh học và lựa chọn được chủng QX-like làm chủng tiềm năng để sản xuất vaccine trong tương lai là việc làm vô cùng cần thiết hiện nay.

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy tầm quan trọng của việc tầm soát sự lưu hành của các chủng IBV tại Việt Nam, đặc biệt trong đó cần theo dõi sự xuất hiện của các biến chủng TC07-like khi vẫn chưa có vaccine phòng chủng này.

KẾT LUẬN

Hai chủng virus IBV phân lập tại Việt Nam (IBHYM và IBHM) có đặc tính sinh học ổn định sau 10 đời tiếp truyền trên phôi gà 10 ngày tuổi và có hiệu giá virus cao, EID₅₀ trung bình đạt 10^{5,4}/ml với chủng IBHYM và 10^{5,7}/ml với chủng IBHM. Nghiên cứu cũng đã thu nhận và giải trình tự được toàn bộ gen kháng nguyên S của hai chủng IBV với kích thước 3504 bp và phân tích phả hệ nguồn gốc. Kết quả phân tích đã xác định hai chủng virus phân lập thành công thuộc genotype QX-like, là các chủng virus đang gây bệnh phổ biến tại Việt Nam. Hai chủng virus IBV sẽ được lưu giữ cho các nghiên cứu tiếp theo trong tương lai để phát triển vaccine tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cavanagh D (2007). Corona virus avian infectious bronchitis virus, *Veterinary Research*. 38:281-297.
- Cavanagh D and Naqi SA (2003). Viral diseases. Infectious bronchitis. *Diseases of poultry*, books.
- Cavanagh D, Britton P (2008) Coronaviruses: General Features. In: Mahy BWJ, Regenmortel MHV (Eds.). *Encycl Virol*. Elsevier. UK:623-623.
- Cook JK, Jackwood AM, Jones RC (2012). The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathology*. 41:239-250.
- De Wit JJ, Cazaban C, Dijkman R, Ramon G, Gardin Y (2017). Detection of different genotypes of infectious bronchitis virus and of infectious bursal disease vi rút in European broilers during an epidemiological study in 2013 and the consequences for the diagnostic approach. *Avian Pathology*. 47: 140-151.
- Do Thi Roan, Nguyen Thi Khue, Luu Minh Duc, Nguyen Thi Thu Hien, Le Thanh Hoa, Le Thi Hue, Le Thi Kim Xuyen, Doan Thi Thanh Huong (2023) Whole genome sequencing analysis of avian infectious bronchitis virus isolated in Hung yen province in 2021.
- 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* 18(12):1994–2001.
- Ghetas AM (2021) Infectious Bronchitis Virus Genotypes in the Middle East. *Avian Dis* 65(4): 647–651.
- Lin SY, Chen HW (2017) Infectious bronchitis virus variants: molecular analysis and pathogenicity investigation. *Int J Mol Sci* 18(10):2030.
- Jackwood DJ (2012) Molecular epidemiologic evidence of homologous recombination in infectious bursal disease viruses. *Avian Disease* 56(3): 574–577.
- Jang IL, Lee HJ, Bae YC, Park SC, Lee HS, Choi KS (2018) Genetic and Pathologic Characterization of a Novel Recombinant TC07-2-Type Avian Infectious Bronchitis Virus. *Avian Dis* 62 (1): 109-113.
- OIE, World Organisation for Animal Health, 2018. Chapter 3.3.2. Avian infectious bronchitis
- Schalk A., Hawn M (1931) An apparently new respiratory disease of baby chicks. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 78:413–422.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol* 38: 3022–3027.
- To J, Surya W, Fung TS, Li Y, Verdià-Bàguena C, Queralt-Martin M, Aguilera VM, Liu DX, Torres J (2017) Channel-Inactivating Mutations and Their Revertant Mutants in the Envelope Protein of Infectious Bronchitis Virus. *J Virol* 91(5): e02158-16.
- Valastro V, Holmes EC, Britton P, Fusaro A, Jackwood MW, Cattoli G, Monne I (2016) S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infection Genetics and Evolution* 39: 349–364.
- Võ Thị Trà An và Nguyễn Thị Kim Yến (2014). So sánh hiệu quả phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm của 3 quy trình tiêm chủng vaccin trên gà. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*. XXI (5). 21-25.
- Wickramasinghe I. N., S. J. van Beurden, E. A. Weerts and M. H. Verheije (2014). The avian coronavirus spike protein. *Virus Res*. 194:37-48

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND MOLECULAR BIOLOGY OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS ISOLATED IN NORTHERN VIETNAM IN 2021

Nguyễn Thị Khuê^{1,2}, Đỗ Thị Roan^{1,2}, Phạm Văn Tiềm³, Đoàn Thị Thanh Hương^{1,2*}

¹*Institute of Biotechnology (IBT)*

²*Graduated University of Science and Technology (GUST), Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

³*Ministry of Science and Technology (MOST)*

SUMMARY

The infectious bronchitis virus strains IBHYM, isolated in Hung Yen, and IBHM, isolated in Hanoi in 2021, have been identified with certain biological and molecular biological characteristics. The research results show that both highly virulent IBV strains are capable of adapting and proliferating on 10-day-old chicken embryos, resulting in the death of the embryos after about 48-72 hours, with the average EID₅₀/ml value of 10^{5.4} with strain IBHYM and 10^{5.7} with strain IBHM. The entire S (Spike) antigen gene obtained from the two strains is 3,504 nucleotides encoding 1,168 amino acids. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences of 40 IBV strains shows that although the two strains, IBHYM and IBHM, are in the same QX-like genotype group, they are more closely related to the HN08-type and LDT3-type genotype groups. The calculation of their genetic distance shows that the genetic distance values of the strains within the QX-like group have a very low divergence rate, around 0.04% - 0.05%, while the genetic distance value between the QX-like genotype group and other groups has a higher divergence rate, specifically 0.15% - 0.37%.

Keywords: 50% Embryo Infective Dose (EID₅₀), gene Spike (S), phylogeny, infectious bronchitis virus (IBV).

* Author for correspondence: Tel: +84-988904605; Email: doantthuong74@gmail.com