

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và một số thành viên khác, các thành viên đều đã đồng ý cho tôi sử dụng các kết quả trong luận án này. Các kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận án là trung thực, khách quan và chưa từng được sử dụng được bảo vệ ở bất kỳ học vị nào.

Tôi xin cam đoan rằng mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện luận án đã được cảm ơn, các thông tin trong luận án đều được chỉ rõ nguồn gốc.

Hà Nội, ngày tháng năm 2026

Tác giả

Trần Anh Tuấn

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình thực hiện đề tài và hoàn thành bản luận án, tôi luôn nhận được sự giúp đỡ của nhiều tổ chức và cá nhân. Nhân dịp này tôi xin cảm ơn Ban lãnh đạo VIỆN CHĂN NUÔI VÀ THÚ Y VIỆT NAM đã tạo điều kiện cho tôi được theo học chương trình đào tạo nghiên cứu sinh tại Viện.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Cục Chăn nuôi và Thú y cùng tập thể cán bộ Chi cục Chăn nuôi và Thú y vùng III đã tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ cho tôi hoàn thành nghiên cứu của mình.

Tôi xin cảm ơn đề tài độc lập cấp nhà nước “*Nghiên cứu đặc điểm sinh học và sinh học phân tử của các chủng vi rút gây bệnh Viêm da nổi cục đang lưu hành tại Việt Nam*” đã cung cấp kinh phí cho tôi thực hiện nghiên cứu và sử dụng số liệu để hoàn thành luận án này.

Tôi xin cảm ơn tập thể Bộ môn Hóa sinh Miễn dịch cùng các đồng nghiệp tại VIỆN CHĂN NUÔI VÀ THÚ Y VIỆT NAM đã tạo điều kiện, hỗ trợ, giúp đỡ cho tôi trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến thầy, cô hướng dẫn khoa học đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài và hoàn thành luận án.

Tôi luôn biết ơn gia đình, bạn bè và đồng nghiệp đã luôn bên cạnh, động viên và giúp đỡ tôi hoàn thành nghiên cứu và luận án.

Hà Nội, ngày tháng năm 2026

Tác giả

Trần Anh Tuấn

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC BẢNG.....	vii
DANH MỤC HÌNH.....	ix
DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	xii
TRÍCH YẾU LUẬN ÁN.....	xv
1. Tóm tắt mở đầu	xv
2. Nội dung bản trích yếu.....	xv
2.1 Mục đích và đối tượng nghiên cứu của luận án	xv
2.2. Phương pháp nghiên cứu	xv
2.3. Các kết quả chính và kết luận	xv
THESIS ABSTRACT	xviii
1. Summary	xviii
2. Objective and research subject.....	xviii
3. Method.....	xviii
4. Main Result and Conclusion.....	xviii
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	xxi
PHẦN 1. MỞ ĐẦU.....	1
1.1. Tính cấp thiết của đề tài	1
1.2. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài	2
1.3. Ý nghĩa khoa học của đề tài	2
1.4. Ý nghĩa thực tiễn của đề tài	2
1.5. Những đóng góp mới của đề tài	2
PHẦN 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
2.1. Lịch sử và tình hình bệnh Viêm da nổi cục	4
2.1.1. Lịch sử và tình hình bệnh Viêm da nổi cục trên thế giới	4
2.1.2. Tình hình bệnh Viêm da nổi cục tại Việt Nam và vùng Bắc Trung Bộ	5
2.2. Các đặc điểm sinh học cơ bản vi rút LSD.....	6

2.2.1. Căn bệnh và cấu trúc của vi rút LSD	6
2.2.2. Sự nhân lên của vi rút trên tế bào.....	8
2.2.3. Tương tác giữa vật chủ và vi rút LSD.....	9
2.2.4. Sinh bệnh học và ảnh hưởng của vi rút Viêm da nổi cục lên cơ thể vật chủ	11
2.3. Đặc điểm sinh học phân tử của vi rút Viêm da nổi cục	14
2.3.1. Các gen đặc trưng của vi rút Viêm da nổi cục	14
2.4.2. Phả hệ di truyền và phân nhóm vi rút Viêm da nổi cục	15
2.4. Đáp ứng miễn dịch trong bệnh Viêm da nổi cục.....	19
2.5. Đặc điểm dịch tễ học.....	22
2.5.1. Vật chủ.....	22
2.5.2. Tính kháng của vi rút LSD.....	22
2.5.3. Lây truyền	23
2.6. Chẩn đoán bệnh VDNC	24
2.6.1. Chẩn đoán sơ bộ.....	24
2.6.2. Chẩn đoán xác nhận.....	24
2.6.3. Chẩn đoán phân biệt.....	26
2.7. Kiểm soát dịch bệnh.....	26
2.7.1. Vắc xin phòng bệnh	26
2.7.2. Chất khử trùng	28
PHẦN 3. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	30
3.1. Nội dung nghiên cứu.....	30
3.2. Vật liệu dùng trong nghiên cứu.....	30
3.3. Đối tượng nghiên cứu	30
3.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	30
3.5. Phương pháp nghiên cứu.....	31
3.5.1. Bố trí thí nghiệm	31
3.5.2. Phương pháp thu thập và xử lý mẫu bệnh phẩm.....	33
3.5.3. Chẩn đoán sinh học phân tử.....	34
3.5.4. Giải trình tự và phân tích di truyền	36

3.5.5. Phương pháp nuôi cấy tế bào và phân lập vi rút	38
3.5.6. Định lượng và xác định đặc tính sinh học của vi rút (In-vitro).....	40
3.5.7. Xét nghiệm miễn dịch học và huyết thanh học	42
3.5.8. Phương pháp gây nhiễm trên động vật (In-vivo)	43
3.5.9. Phương pháp đánh giá đáp ứng miễn dịch của vật chủ.....	44
3.5.10. Phương pháp đánh giá hiệu quả chất sát trùng	46
3.5.11. Phân tích dữ liệu và thống kê.....	46
PHẦN 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	47
4.1. Nghiên cứu xác định sự có mặt của vi rút LSD lưu hành tại vùng Bắc Trung Bộ.....	47
4.1.1. Kết quả thu thập và xác định mẫu dương tính với vi rút LSD	47
4.1.2. Kết quả xác định giá trị Ct đối với các loại mẫu bằng phương pháp real-time PCR	48
4.2. Kết quả nghiên cứu đặc tính sinh học phân tử của các chủng vi rút gây bệnh viêm da nổi cục đang lưu hành tại khu vực Bắc Trung Bộ	50
4.2.1. Kết quả xác định kiểu gen của vi rút LSD từ mẫu thực địa	50
4.2.2. Xây dựng cây phả hệ các chủng vi rút LSD dựa vào trình tự các đoạn gen chỉ bảo	54
4.3. Kết quả nghiên cứu đặc tính sinh học của các chủng vi rút thực địa gây bệnh VDNC tại vùng Bắc Trung Bộ	62
4.3.1. Kết quả phân lập vi rút LSD trên môi trường tế bào MDBK.....	62
4.3.2. Kết quả chuẩn độ vi rút (TCID ₅₀) trên môi trường tế bào MDBK.....	65
4.3.3 Đánh giá khả năng nhân lên của các chủng vi rút LSD trên tế bào dòng MDBK	67
4.3.4. Kết quả giải trình tự toàn bộ genome của vi rút LSD phân lập từ thực địa	62
4.3.5. Kết quả phân tích mối quan hệ giữa các chủng vi rút LSD tại Việt Nam với các chủng tham chiếu đã được công bố trên ngân hàng gen (Genbank) dựa vào trình tự toàn bộ genome	77

4.3.6. Tính ổn định di truyền của 03 chủng vi rút LSD gây bệnh VDNC qua các đời cấy chuyển trên tế bào dòng MDBK.	81
4.3.7. Xác định sự có mặt của vi rút LSD sau khi gây nhiễm trên động vật bằng chủng thực địa.....	83
4.3.8. Kết quả đánh giá các triệu chứng lâm sàng của bê được gây nhiễm vi rút LSD chủng NA06	85
4.3.9. Kết quả đánh giá các bệnh tích đại thể của bê sau gây nhiễm	89
4.3.10.Đánh giá tính sinh miễn dịch của chủng vi rút gây bệnh VDNC phân lập tại thực địa bằng phương pháp trung hòa vi rút	98
4.3.11. Biểu hiện của các cytokine miễn dịch trên tế bào dòng MDBK sau khi gây nhiễm vi rút gây bệnh VDNC chủng thực địa.....	100
4.3.12.Biểu hiện của các cytokine miễn dịch trên động vật sau khi gây nhiễm vi rút LSD chủng thực địa	103
4.4. Đánh giá sự miễn cảm của một số thuốc sát trùng thông dụng đối với vi rút LSD theo khuyến cáo của WOAHA.....	110
PHẦN 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	117
5.1. Kết luận.....	118
5.2. Kiến nghị.....	129
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. So sánh tình hình dịch bệnh VDNC của vùng Bắc Trung Bộ so với tình hình dịch bệnh VDNC của cả nước.....	6
Bảng 3.1. Bố trí thí nghiệm theo nội dung nghiên cứu	31
Bảng 3.2. Bảng các chỉ tiêu đánh giá triệu chứng lâm sàng.....	44
Bảng 3.3. Trình tự cặp mồi oligonucleotide phản ứng real-time RT-PCR	45
Bảng 4.1. Kết quả thu thập, hồi cứu và chẩn đoán các mẫu bệnh phẩm nghi mắc bệnh VDNC do vi rút LSD gây ra tại khu vực Bắc Trung Bộ.....	48
Bảng 4.2. Giá trị Ct của các loại mẫu bằng phương pháp real-time PCR.....	48
Bảng 4.3. Danh sách mẫu bệnh phẩm dương tính vi rút gây bệnh VDNC được đăng tải trên ngân hàng dữ liệu genbank thế giới	53
Bảng 4.4. Sự tương đồng nucleotide giữa vi rút LSD phân lập tại Việt Nam và các trình tự tham chiếu khác	55
Bảng 4.5. Kết quả đánh giá bệnh tích tế bào của các chủng vi rút LSD trên tế bào dòng MDBK sau 120h gây nhiễm qua 03 lần cấy chuyển.....	63
Bảng 4.6. Kết quả chuẩn độ vi rút LSD trên tế bào dòng MDBK	66
Bảng 4.7. Bảng kết quả real-time PCR xác định sự có mặt của 06 chủng vi rút LSD gây nhiễm trên tế bào MDBK ở các liều gây nhiễm khác nhau.....	70
Bảng 4.8. Bảng dữ liệu giải trình tự NGS 3 chủng vi rút LSD	71
Bảng 4.9. Khoảng cách di truyền về trình tự nucleotide của ba chủng vi rút LSD phân lập tại Việt Nam và các chủng tham chiếu trên thế giới dựa vào trình tự toàn bộ genome vi rút.....	79
Bảng 4.10. Kết quả đánh giá sự có mặt của vi rút LSD và kháng thể kháng vi rút gây bệnh VDNC của bò trước khi gây nhiễm.....	83
Bảng 4.11. Kết quả kiểm tra sự xuất hiện của vi rút LSD trong máu bò thí nghiệm bằng phương pháp Real time PCR.....	84
Bảng 4.12. Đánh giá triệu chứng lâm sàng của bò thí nghiệm gây nhiễm.....	88
Bảng 4.13. Kết quả đánh giá bệnh tích đại thể của bò sau gây nhiễm vi rút LSD chủng thực địa.....	90
Bảng 4.14. Kết quả xác định sự nhân lên của vi rút LSD trong mẫu máu toàn phần của bò sau gây nhiễm.....	93

Bảng 4.15. Kết quả xác định sự có mặt của vi rút LSD trong mẫu dịch hầu họng, mũi của bò sau gây nhiễm	94
Bảng 4.16. Xác định sự có mặt của vi rút LSD trong mẫu phủ tạng của bò sau 14 ngày gây nhiễm	96
Bảng 4.17. Xác định sự có mặt của vi rút LSD trong mẫu phủ tạng của bò sau 28 ngày gây nhiễm	97
Bảng 4.18. Bảng kết quả VNT đánh giá khả năng sản sinh kháng thể của bò sau tiêm vi rút LSD bất hoạt	99
Bảng 4.19. Kết quả chuẩn độ vi rút LSD sau khi xử lý bằng một số chất sát trùng theo khuyến cáo của WOAHA.....	111

DANH MỤC HÌNH

Hình 2.1. Bản đồ lịch sử và sự lây lan của bệnh VDNC trên thế giới	5
Hình 2.2. Cấu trúc chung của vi rút bệnh VDNC	7
Hình 2.3. Minh hoạ bệnh tích VDNC trong các ngày trên tế bào dòng MDBK.....	9
Hình 2.4. Tổn thương trên da ở bò bị nhiễm vi rút gây bệnh VDNC	12
Hình 2.5. Sơ đồ minh hoạ con đường lây truyền của bệnh VDNC.....	23
Hình 3.1. Sơ đồ thực hiện nghiên cứu.....	31
Hình 3.2. Các bước thực hiện giải trình tự toàn bộ genome vi rút.....	37
Hình 3.3. Sơ đồ phương pháp TCID ₅₀ (50% Tissue Culture Infective Dose)	40
Hình 4.1. Kết quả xác định sự có mặt của DNA vi rút gây bệnh VDNC bằng phương pháp real-time PCR	47
Hình 4.2. Kết quả PCR minh hoạ 03 gen chỉ báo là P32, RPO30, và GPCR.....	51
Hình 4.3. Minh hoạ kết quả giải trình tự đoạn gen p32 chủng vi rút gây bệnh VDNC tại vùng Bắc Trung Bộ	51
Hình 4.4. Kết quả giải trình tự đoạn gen GPCR chủng vi rút gây bệnh VDNC tại vùng Bắc Trung Bộ	52
Hình 4.5. Kết quả giải trình tự đoạn gen RPO30 chủng vi rút gây bệnh VDNC tại vùng Bắc Trung Bộ.....	52
Hình 4.6. Cây phả hệ của các chủng vi rút LSD dựa trên trình tự đoạn gen p32 với các chủng tham chiếu.	57
Hình 4.7. Cây phả hệ của các chủng vi rút LSD dựa trên trình tự đoạn gen RPO30 với các chủng vi rút tham chiếu.....	58
Hình 4.8. Cây phả hệ của các chủng vi rút LSD thu thập tại dựa trên trình tự đoạn gen GPCR với các chủng vi rút tham chiếu	59
Hình 4.9. Hình ảnh bệnh tích tế bào ở lần phân lập đầu tiên với độ phóng đại 10X (LS16: chủng đối chứng dương)	64
Hình 4.10: Hình ảnh minh hoạ kết quả bệnh tích tế bào sau 3 đời cấy chuyển, với độ phóng đại 10X (LS16: chủng đối chứng dương).....	65
Hình 4.11. Kết quả chuẩn độ (TCID ₅₀) của chủng NA06 trên tế bào dòng MDBK... 66	
Hình 4.12. Đường cong sinh trưởng của vi rút gây bệnh VDNC tại các liều gây nhiễm khác nhau chủng vi rút LSD NA06.....	67

Hình 4.13. Minh hoạ hình ảnh bệnh tích ở các liều gây nhiễm khác nhau của vi rút LSD chủng NA06 , với độ phóng đại 10X.....	68
Hình 4.14. Đường cong tăng trưởng của các chủng vi rút gây bệnh VDNC trên tế bào MDBK ở liều gây nhiễm 0.01MOI	70
Hình 4.15. Hình ảnh của vi rút LSD qua kính hiển vi điện tử (tỷ lệ:1µm)	71
Hình 4.16. Kết quả chất lượng giải trình tự gen.....	72
Hình 4.17. Cấu trúc và thành phần gen của toàn bộ genome vi rút LSD phân lập từ tỉnh Nghệ An (NA06).....	72
Hình 4.18. Cấu trúc và thành phần gen của toàn bộ genome vi rút LSD phân lập từ tỉnh Hà Tĩnh (HT18)	73
Hình 4.19. Cấu trúc và thành phần gen của toàn bộ genome vi rút LSD phân lập từ tỉnh Quảng Bình (Quảng Trị) (QB09).....	73
Hình 4.20. So sánh kết quả giải trình tự toàn bộ genome vi rút LSD phân lập từ tỉnh Nghệ An (NA06) trên ngân hàng dữ liệu Genbank	74
Hình 4.21. So sánh kết quả giải trình tự toàn bộ genome vi rút LSD phân lập từ tỉnh Hà Tĩnh (HT18) trên ngân hàng dữ liệu Genbank.	75
Hình 4.22. So sánh kết quả giải trình tự toàn bộ genome vi rút LSD phân lập từ tỉnh Quảng Bình (QB09) trên ngân hàng dữ liệu Genbank.....	76
Hình 4.23. Cây phả hệ phát sinh mối quan hệ của một số chủng vi rút LSD phân lập tại Việt Nam và trên thế giới dựa vào toàn bộ trình tự genome của vi rút.....	77
Hình 4.24. Kết quả alignment trình tự P32 của 3 chủng vi rút LSD phân lập tại Việt Nam sau 10 đời, 20 đời và 30 đời cấy chuyển so với chủng Tân Cương Trung Quốc 2019	82
Hình 4.25. Kết quả kiểm tra thân nhiệt của bê sau khi gây nhiễm vi rút LSD.....	85
Hình 4.26. Kết quả đánh giá triệu chứng lâm sàng của bò sau khi gây nhiễm	87
Hình 4.27. Hình ảnh minh hoạ triệu chứng lâm sàng của bò sau gây nhiễm vi rút LSD chủng thực địa	89
Hình 4.28. Biểu hiện bệnh tích bò nhiễm vi rút LSD chủng thực địa.....	91
Hình 4.29. Minh hoạ phản ứng trung hoà của một số mẫu huyết thanh bò thí nghiệm sau tiêm vi rút LSD bất hoạt với độ phóng đại 10X	100
Hình 4.30. Sự điều chỉnh đáp ứng Cytokine trên tế bào MDBK sau gây nhiễm vi rút LSD (LS16: chủng đối chứng dương).....	101

Hình 4.31. Mức độ đáp ứng của các Cytokine trong máu của bò sau gây nhiễm vi rút gây bệnh VDNC chủng thực địa	104
Hình 4.32a. Kết quả đánh giá khả năng ức chế vi rút LSD của một số chất sát trùng bằng phương pháp chuẩn độ vi rút.....	110
Hình 4.32b. Kết quả đánh giá khả năng ức chế vi rút LSD của một số chất sát trùng bằng phương pháp chuẩn độ vi rút.....	112
Hình 4.32c. Kết quả đánh giá khả năng ức chế vi rút LSD của một số chất sát trùng bằng phương pháp chuẩn độ vi rút.....	113
Hình 4.33. Kết quả chuẩn độ vi rút LSD sau khi xử lý bằng Iodine 3% trên tế bào dòng MDBK sau 30, 60 và 180 phút gây nhiễm ở ngày thứ 5 với độ phóng đại 10x.....	114
Hình 4.34. Kết quả đánh giá khả năng ức chế vi rút LSD của chất sát trùng Phenol 2% theo khuyến cáo của WOAAH bằng phương pháp chuẩn độ vi rút (với độ phóng đại 10x).....	115
Hình 4.35. Hình ảnh minh họa kết quả đánh giá khả năng ức chế vi rút LSD của chất sát trùng Virkon S 2% theo khuyến cáo của WOAAH bằng phương pháp chuẩn độ vi rút (với độ phóng đại 10x)	116

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tên đầy đủ
LSDV	Lumpy skin diseases virus
LSD	Lumpy skin diseases
CaPV	Capripoxvirus
SPPV	Sheep pox virus
GTPV	Goat pox virus
MV	Mature virion
EV	Extracellular vesicle
p32	Envelope protein
bp	Base pair
RPO30	30 kDa RNA polymerase subunit
GPCR	G-protein-coupled chemokine receptor
dsDNA	Double-stranded DNA
mRNA	Messenger RNA
OA3.Ts	Ovine testis cell
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
CMI	Cell mediated immunity
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CPE	Cytopathogenic Effect (Bệnh tích tế bào)
VDNC	Viêm da nổi cục
DNA	Deoxyribonucleic Acid
AGID	Agar gel immunodiffusion
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAO	Food and Agriculture Organization
FBS	Fetal Bovine Serum
HSMD	Hóa sinh - Miễn dịch
IPMA	Immuno- Peroxidase Monolayer Assay

Viết tắt	Tên đầy đủ
IFAT	Immunofluorescence antibody test
WB	Western blot
LT	Lamb testis
INF	Interferon
NK	Natural Killer Cell
CD4+	CD4 T lymphocytes
CD8+	CD8 T lymphocytes
Th	T helper cell
IL	Interleukin
GMCSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
INFG	Interferon-gamma
TNF- α	Tumour necrosis factor-alpha
MEM	Minimum Eagle Medium
MDBK	Madin–Darby bovine kidney
mRNA	messenger RNA
WOAH	World Organism of Animal Health
TAE	Tris-acetate-EDTA
UV	Ultraviolet
OD	Optical density
PBS	Phosphate Buffer Saline
RNA	Ribonucleic Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
SPF	specific pathogen free
TCID50	50% Tissue Culture Infectious Dose
VNT	Virus Neutralization Test
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing

Viết tắt	Tên đầy đủ
DPC	Day Post Challenge
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ORF	Open Reading Frame
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Fetal Bovine Serum
CPE	Cytopathic effect
OsO ₄	Osmi tetroxide
MEM	Minimum Essential Medium
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
RP-L19	Ribosomal protein L19
SEM	Standard Error of the Mean
Ct	Cycle threshold
TGFβ	Transforming growth factor beta
JAK	Janus kinase
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
MAPK	Mitogen - activated protein kinase
ERK	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
AKT	Protein Kinase B

TRÍCH YẾU LUẬN ÁN

1. Tóm tắt mở đầu

Họ và tên nghiên cứu sinh: Trần Anh Tuấn

Tên đề tài luận án: “Nghiên cứu một số đặc tính sinh học và sinh học phân tử của các chủng vi rút gây bệnh Viêm da nổi cục ở trâu, bò lưu hành tại vùng Bắc Trung Bộ, Việt Nam”.

Chuyên ngành: Ký sinh trùng và Vi sinh vật học thú y

Mã số: 9640104

Người hướng dẫn khoa học: 1. TS. Đặng Vũ Hoàng
2. TS. Trần Thị Thanh Hà

Tên cơ sở đào tạo: VIỆN CHĂN NUÔI VÀ THÚ Y VIỆT NAM

2. Nội dung bản trích yếu

2.1 Mục đích và đối tượng nghiên cứu của luận án

Mục đích: Nghiên cứu đặc điểm sinh học và sinh học phân tử của các chủng vi rút gây viêm da nổi cục đang lưu hành tại 6 tỉnh Bắc Trung Bộ, Việt Nam.

Đối tượng nghiên cứu: Vi rút gây bệnh Viêm da nổi cục lưu hành tại vùng Bắc Trung Bộ, Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các phương pháp nghiên cứu sử dụng trong luận án bao gồm: (i) Thu thập và xử lý mẫu bệnh phẩm; (ii) Chẩn đoán sinh học phân tử; (iii) Giải trình tự và phân tích di truyền; (iv) Nuôi cấy tế bào và phân lập vi rút; (v) Định lượng và xác định đặc tính sinh học của vi rút (*In-vitro*); (vi) Xét nghiệm miễn dịch học và huyết thanh học; (vii) Gây nhiễm trên động vật (*In-vivo*); (viii) Đánh giá đáp ứng miễn dịch của vật chủ; (ix) Đánh giá hiệu quả chất sát trùng; (x) Phân tích dữ liệu và thống kê.

2.3. Các kết quả chính và kết luận

Các kết quả chính:

Xác định 100% dương tính vi rút LSD trên mẫu lâm sàng (200/200 mẫu bệnh phẩm) tại vùng Bắc Trung Bộ bằng phương pháp real-time PCR theo tiêu chuẩn WOAHA.

Đặc điểm trình tự và phân nhóm phylogentic: Gen p32 đồng nhất 100% giữa các chủng khu vực Bắc Trung Bộ và rất giống với chủng khác đã báo cáo ở Việt Nam và Trung Quốc. Phân tích gen GPCR cho thấy các chủng thực địa thuộc Cluster 2.5 (tái tổ hợp) cùng nhóm với chủng tại Trung Quốc, Hồng Kông. Phân tích gen RPO30 xếp các chủng Việt Nam vào Subgroup III, cùng nhóm với chủng vi rút gây bệnh ở Trung Quốc. Ba chủng vi rút phân lập (NA06, HT18, QB09) có độ tương đồng 99.6–99.8% với các chủng vi rút tại Trung Quốc như LSDV/China/GD01/2019 và XJ201901.

Nuôi cấy và đánh giá độc lực in vitro đã phân lập thành công 10 chủng trên tế bào MDBK, với hiệu giá vi rút dao động từ 6.3-7.1 log₁₀ TCID₅₀/ml. Tốc độ vi rút nhân lên trên tế bào MDBK ở liều 0.01 MOI là cao nhất, vi rút đạt nồng độ cao nhất sau ~120 giờ trên tế bào MDBK. Cả ba chủng QB09, HT18, NA06 đều cho thấy sự ổn định về di truyền, không thay đổi trình tự nucleotide sau 10, 20 và 30 đời nuôi cấy.

Nghiên cứu in vivo: Gây nhiễm thành công chủng NA06 trên bò. Khi gây nhiễm với liều 2×10⁷ TCID₅₀/ml, vi rút xuất hiện trong máu sau 3 ngày. Với liều 2×10⁶–2×10^{6.5} TCID₅₀/ml, vi rút xuất hiện từ sau 5-7 gây nhiễm, sau đó tăng lên và đạt đỉnh ở ngày 11-14 sau gây nhiễm. Bò thí nghiệm bắt đầu đào thải vi rút qua dịch tiết hầu họng, miệng, mũi sau 5-7 ngày, kéo dài đến ít nhất ngày thứ 21. Nốt sần là nơi tập trung lượng vi rút cao nhất.

Bò được tiêm vi rút LSD (bất hoạt bằng BEI 10mM trong 24h) đạt tỉ lệ bảo hộ 100% sau 28 ngày. Đáp ứng cytokine, quan sát thay đổi nồng độ các cytokine tiền viêm (IFN-γ, IL-1α, TNF-α) và kháng viêm (IL-6, IL-10, TGF-β1) trong máu và tế bào, phản ánh cơ chế miễn dịch chống vi rút.

Các hóa chất sát khuẩn theo khuyến cáo của WOA, như SDS 0.8%, Iodine 3%, formalin 1%, chloroform 5%, ether 20%, phenol 2%, NaOH 3%, NH₄ 0.5% và Virkon 2% (30 - 60 phút) có thể tiêu diệt và ức chế vi rút LSD phân lập tại Việt Nam.

Kết luận:

Nghiên cứu đã xác định được ba chủng vi rút LSD tại Bắc Trung Bộ gồm NA06, HT18 và QB09. Các chủng này có đặc tính phân tử đồng nhất, ổn định và

có khả năng gây bệnh tích trên tế bào dòng MBDK và trên bò thí nghiệm. Bò được tiêm vi rút LSD bất hoạt (BEI 10 mM/24 h) tạo kháng thể bảo vệ sau 28 ngày. Các hoá chất sát trùng theo khuyến cáo của WOAH cho thấy hiệu quả kiểm soát đáng tin cậy.

Đề nghị mở rộng giám sát phân tử và sinh học của VDNC tại các vùng khác. Đồng thời, cần thúc đẩy nghiên cứu sâu về đáp ứng miễn dịch và phát triển vắc xin vô hoạt để sớm có sản phẩm thương mại nội địa, an toàn góp phần chủ động phòng, chống dịch trong tương lai.

Người hướng dẫn khoa học

Nghiên cứu sinh

TS. Đặng Vũ Hoàng TS. Trần Thị Thanh Hà

Trần Anh Tuấn

THESIS ABSTRACT

1. Summary

Full name of PhD candidate: Tran Anh Tuan

Title of thesis: “Biological and molecular characterization of Lumpy Skin Disease virus strains in cattle and buffaloes circulating in the North Central region, Vietnam”.

Major: Veterinary Parasitology and Microbiological Sciences

Code number: 9640104

Supervisors: 1. Dang Vu Hoang, PhD
2. Tran Thi Thanh Ha, PhD

Educational Institution: National Institute of Veterinary Research

2. Objective and research subject

Objective

To characterize the biological and molecular properties of Lumpy skin disease virus strains circulating in six provinces of Vietnam's North Central region.

Research Subject:

LSDV strains circulating in the North Central region of Vietnam.

3. Method

Research methods used in this study include: (i) Sample collection and processing; (ii) Molecular diagnostics; (iii) Sequencing and genetic analysis; (iv) Cell culture and virus isolation; (v) Virus quantification and biological characterization (*In-vitro*); (vi) Immunological and serological assays; (vii) Animal infection (*In-vivo*); (viii) Assessment of host immune response; (ix) Disinfectant efficacy evaluation; (x) Data analysis and statistics

4. Main Result and Conclusion

Main result:

All 200 clinical samples collected from six provinces in the North Central region tested positive for LSDV using real-time PCR, in accordance with WOAH guidelines.

Genomic and phylogenetic characterization: The p32 gene showed 100% identity among all regional strains, closely resembling those previously reported in Vietnam and China. GPCR gene analysis placed the strains in Cluster 2.5 (recombinant), aligning with strains from China and Hong Kong. RPO30 gene analysis grouped the Vietnamese isolates into Subgroup III, consistent with pathogenic Chinese strains. Three isolates (NA06, HT18, QB09) exhibited 99.6–99.8% sequence homology with Chinese reference strains such as LSDV/China/GD01/2019 and XJ201901.

Virus isolation and in vitro virulence: 10 LSDV strains were successfully isolated using MDBK cell cultures. These strains demonstrated moderate to high virulence, with titers ranging from 6.3 to 7.1 log₁₀ TCID₅₀/ml. Virulence levels were consistent across provinces within the same ecological zone. At a multiplicity of infection (MOI) of 0.01, LSDV is the highest, reached peak titers on MDBK cells after approximately 120 hours. The nucleotide sequences of isolates QB09, HT18, and NA06 remained unchanged after 10, 20, and 30 serial passages, confirming their genetic stability—an essential trait for vaccine development.

In vivo infection studies: Cattle inoculated with the NA06 strain at a dose of 2×10⁷ TCID₅₀/ml exhibited viremia within 3 days. Lower doses (2×10⁶–2×10^{6.5} TCID₅₀/ml) resulted in viremia between days 5 and 7, peaking on days 11–14. Virus shedding occurred via nasopharyngeal, oral, and nasal secretions from days 5–7 and persisted until at least day 21. The highest viral concentrations were found in skin nodules.

Cattle inoculated with inactivated LSDV (BEI 10 mM/24 h) achieved 100% protection 28 days post-innoculation. Significant changes were observed in the levels of key cytokines, including pro-inflammatory markers (IFN- γ , IL-1 α , TNF- α) and anti-inflammatory markers (IL-6, IL-10, TGF- β 1), in both blood and cell cultures. These findings provide insights into the host immune response to LSDV infection.

According to WOAHA recommendations, disinfectants including 0.8% SDS, 3% iodine, 1% formalin, 5% chloroform, 20% ether, 2% phenol, 3% NaOH, 0.5% ammonium hydroxide, and 2% Virkon were effective in inactivating and inhibiting Vietnamese LSDV isolates after 30–60 minutes of exposure

Conclusion:

The study successfully identified three LSDV strains NA06, HT18, and QB09 in the North Central region of Vietnam. These strains exhibit molecular homogeneity, genetic stability, and high virulence both *in vitro* and *in vivo*. Cattle inoculated with the inactivated LSD virus (BEI 10 mM/24 h) developed protective antibodies after 28 days. Disinfectants recommended by WOAHA demonstrated reliable effectiveness in controlling the virus.

It is recommended to expand molecular and biological surveillance of LSDV to other regions and to promote further research on immune responses and the development of attenuated vaccines. These efforts will support the timely availability of domestic commercial products and enhance proactive epidemic prevention and control.

Supervisor

PhD candidate

Dang Vu Hoang, PhD Tran Thi Thanh Ha, PhD

Tran Anh Tuan

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

- Đã đăng ký trình tự đầy đủ gen của 03 chủng vi rút NA06, HT18 và QB09 đã được đăng tải trên ngân hàng dữ liệu genebank thế giới với mã số đăng ký là từ PQ859562-PQ859564.

- Đặc điểm trình tự và phân nhóm phylogenetic: Gene p32 đồng nhất 100% giữa các chủng khu vực Bắc Trung bộ và rất giống với chủng đã báo cáo ở Việt Nam và Trung Quốc. Phân tích GPCR cho thấy các chủng địa phương thuộc Cluster 2.5 (tái tổ hợp) cùng nhóm với chủng tại Trung Quốc, Hồng Kông. Phân tích RPO30 xếp các chủng Việt Nam vào Subgroup III, cùng nhóm với chủng gây bệnh ở Trung Quốc. Ba chủng phân lập (NA06, HT18, QB09) có độ tương đồng 99.6–99.8% với các chủng Trung Quốc như LSDV/China/GD01/2019 và XJ201901.

- Nuôi cấy và độc lực in vitro Đã phân lập thành công 10 chủng trên tế bào MDBK, với độc lực dao động 6.3–7.1 log₁₀ TCID₅₀/ml (cấp độ vừa–cao).

- Tốc độ nhân lên ở môi trường 0.01 MOI, vi rút đạt nồng độ cao nhất sau ~120 giờ trên tế bào MDBK. Ổn định di truyền của 03 chủng QB09, HT18, NA06 duy trì không thay đổi về trình tự nucleotide sau 10, 20 và 30 đời cấy và cơ sở quan trọng cho phát triển vaccine nhược độc hoặc bất hoạt.

- Nghiên cứu in vivo gây nhiễm thành công chủng NA06 trên bò: Liều 2×10⁷ TCID₅₀/ml, xuất hiện vi rút trong máu sau 3 ngày. Liều 2×10⁶–2×10^{6.5} TCID₅₀/ml, xuất hiện vi rút từ ngày 5–7, tăng đỉnh ngày 11–14. Bò thí nghiệm bắt đầu đào thải vi rút qua dịch tiết hầu họng, miệng, mũi sau 5–7 ngày, kéo dài đến ít nhất ngày 21. Nốt sần là nơi tập trung nồng độ vi rút cao nhất.

- Chủng vi rút VDNC NA06 bất hoạt (BEI 10 mM/24 h) đạt tỉ lệ bảo hộ 100% sau 28 ngày, thể hiện qua kháng thể đặc hiệu. Đáp ứng cytokine, quan sát thay đổi nồng độ các cytokine tiền viêm (IFN γ , IL 1 α , TNF α) và kháng viêm (IL 6, IL 10, TGF β 1) trong máu và tế bào, phản ánh cơ chế miễn dịch chống vi rút.

- Tác dụng của hóa chất sát khuẩn Theo khuyến cáo WOAH, các hóa chất như SDS 0.8%, Iodine 3%, formalin 1%, chloroform 5%, ether 20%, phenol 2%, NaOH 3%, NH₄ 0.5% và Virkon 2% (30–60 phút) có thể tiêu diệt và ức chế vi rút VDNC phân lập tại Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học

Nghiên cứu sinh

TS. Đặng Vũ Hoàng

TS. Trần Thị Thanh Hà

Trần Anh Tuấn

PHẦN 1. MỞ ĐẦU

1.1. Tính cấp thiết của đề tài

Trong những năm gần đây, sự xuất hiện ngày càng nhiều các bệnh mới nổi và tái nổi lây truyền qua biên giới đã trở thành mối lo ngại lớn đối với sức khỏe vật nuôi và gây thiệt hại kinh tế toàn cầu. Một trong những bệnh nguy hiểm đối với động vật nhai lại như trâu, bò là bệnh Viêm da nổi cục (VDNC). Tổ chức Thú y Thế giới (WOAH) đã liệt kê VDNC vào danh mục các bệnh bắt buộc công bố dịch, xác định đây là bệnh truyền nhiễm do vi rút LSD (Lumpy skin disease) thuộc họ *Poxviridae*, chi *Capripoxvirus* gây ra. Mặc dù không gây bệnh cho người, VDNC gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi do giảm năng suất, khả năng sinh sản, gây sảy thai, tổn thương da, và hạn chế vận chuyển, thương mại (Das và cs, 2021; Tadesse Degu và Fesseha, 2020; Clemmons và cs, 2021).

Bệnh được ghi nhận lần đầu tại Zambia (1929), sau đó lan rộng khắp châu Phi, Trung Đông, Đông Âu, và châu Á. Tại Việt Nam, VDNC xuất hiện từ tháng 10/2020 và đến tháng 6/2025 đã gây ảnh hưởng tại 55 tỉnh, thành phố với hơn 212.000 ca mắc. Đặc biệt, vùng Bắc Trung Bộ chịu thiệt hại nặng nề, chiếm khoảng 30% tổng số ca mắc cả nước (Mathijs và cs, 2021; Tran và cs, 2021a; Cục Thú y, 2025). Bệnh VDNC được đặc trưng bởi tỷ lệ mắc bệnh cao lên tới 90% và tỷ lệ chết thường nhỏ hơn 10% tùy thuộc vào phản ứng miễn dịch của vật chủ. Bệnh VDNC lây truyền trực tiếp qua tinh dịch (giao phối tự nhiên hoặc thụ tinh nhân tạo) (EFSA, 2015); lây truyền gián tiếp qua tiếp xúc gần gũi với động vật bị nhiễm bệnh hoặc dùng chung máng thức ăn và nước uống bị ô nhiễm (Moudgil và cs, 2023); lây truyền cơ học qua ruồi, muỗi đốt, ve, mòng (Mulatu và Feyisa, 2018).

Vi rút LSD vốn có tốc độ tiến hóa chậm, bộ gen được bảo tồn cao và chỉ xuất hiện biến đổi đáng kể ở các gen liên quan đến khả năng trốn tránh miễn dịch. Tuy nhiên, sự lây lan nhanh chóng của VDNC trên toàn cầu cũng như tại Việt Nam gần đây đặt ra nhiều vấn đề nghiên cứu, bao gồm: liệu sự gia tăng đột biến trong bộ gen có dẫn đến sự xuất hiện và lưu hành đồng thời của nhiều biến thể hay không; các đặc tính sinh học như khả năng thích nghi, nhân lên trên tế bào dòng và tính sinh miễn dịch của các chủng VDNC tại Việt Nam có điểm gì tương đồng hoặc

khác biệt so với các chủng đang lưu hành trên thế giới; và nếu có sự biến đổi trong bộ gen, thì khả năng kích thích sinh miễn dịch cũng như sự miễn cảm của vi rút có thay đổi so với các chủng trước đây hay không.

Trước thực trạng đó, đề tài ***“Nghiên cứu một số đặc tính sinh học và sinh học phân tử của các chủng vi rút gây bệnh Viêm da nổi cục trên trâu, bò lưu hành tại vùng Bắc Trung Bộ, Việt Nam”*** được thực hiện nhằm cung cấp cơ sở khoa học cho công tác phòng, chống dịch bệnh hiệu quả.

1.2. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài

Nghiên cứu đặc điểm sinh học và sinh học phân tử của các chủng vi rút gây viêm da nổi cục đã và đang lưu hành tại 6 tỉnh Bắc Trung Bộ của Việt Nam.

1.3. Ý nghĩa khoa học của đề tài

Các kết quả nghiên cứu sẽ là cơ sở khoa học cho việc nghiên cứu phát triển phương pháp chẩn đoán nhanh chính xác, sản xuất vắc xin chủng vi rút phân lập ở nội địa, và là nguồn tư liệu sử dụng trong công tác giảng dạy.

1.4. Ý nghĩa thực tiễn của đề tài

- Nghiên cứu về đặc điểm sinh học phân tử có ý nghĩa quan trọng trong định hướng sử dụng vắc xin phòng bệnh VDNC

- Nghiên cứu về sự miễn cảm của vi rút LSD đối với các loại chất sát trùng thông thường có ý nghĩa quan trọng trong định hướng sử dụng các chất sát trùng phù hợp với chủng vi rút lưu hành tại thực địa

1.5. Những đóng góp mới của đề tài

- Cung cấp bộ dữ liệu khoa học có hệ thống về đặc điểm sinh học và sinh học phân tử của vi rút gây bệnh viêm da nổi cục lưu hành tại khu vực Bắc Trung Bộ, Việt Nam; trong đó làm rõ khả năng thích nghi, nhân lên trên dòng tế bào MDBK, đặc điểm gây bệnh, tính sinh miễn dịch và mức độ miễn cảm với một số chất sát trùng thông dụng.

- Cung cấp dữ liệu hệ gen của các chủng vi rút LSD lưu hành tại khu vực nghiên cứu, thông qua phân tích trình tự các gen đặc trưng (p32, RPO30, GPCR) và trình tự toàn bộ bộ gen, qua đó làm rõ mối quan hệ phả hệ và mức độ tương đồng di truyền với các chủng trong nước và trên thế giới.

- Đây là những dữ liệu có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, là cơ sở cho nghiên

cứu ứng dụng dựa trên gen trong chẩn đoán, giám sát dịch bệnh và phát triển vắc xin phòng bệnh phù hợp, hiệu quả; đồng thời cung cấp tư liệu phục vụ đào tạo và nghiên cứu trong lĩnh vực thú y.

PHẦN 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Lịch sử và tình hình bệnh Viêm da nổi cục

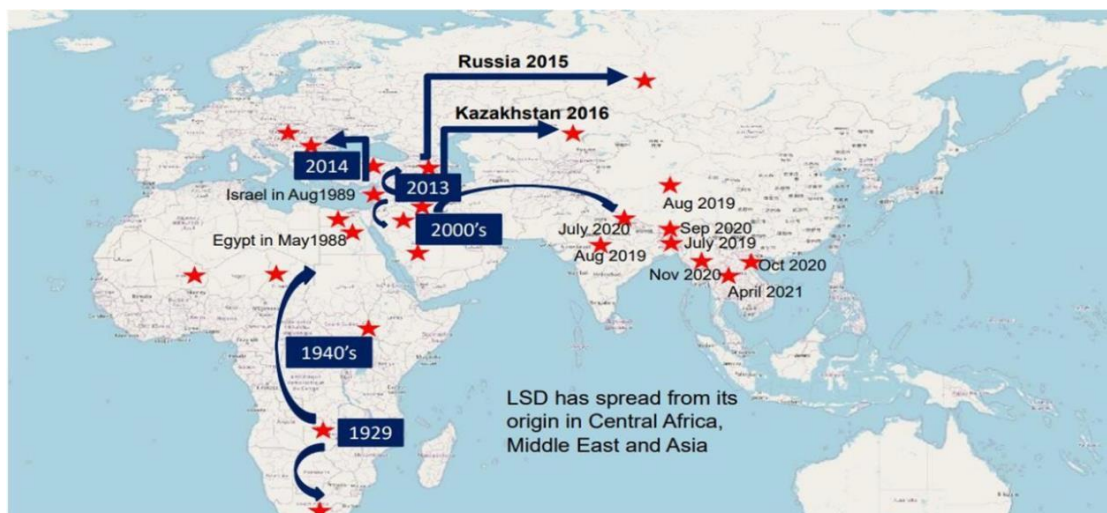
2.1.1. Lịch sử và tình hình bệnh Viêm da nổi cục trên thế giới

Bệnh VDNC lần đầu tiên được báo cáo vào năm 1929 tại phía Bắc Rhodesia, Zambia. Thời gian sau đó có những đợt bùng phát đặc biệt nghiêm trọng được ghi nhận vào các năm 1953, 1954, 1957 và 1962. Năm 1957 tại Nam Phi, vi rút LSD được xác nhận gây bệnh bằng việc xác định poxvi rút và chủng Neethling của loại vi rút này được phân lập từ tỉnh Western Cape của Nam Phi và đã trở thành chủng điển hình cho đến nay. Sau khoảng cách 14 năm, Sudan đã báo cáo sự bùng nổ của bệnh VDNC vào năm 1971, ở Nigeria vào năm 1974 (Wolff và cs, 2022b). Bệnh lần đầu tiên được phát hiện ở Ethiopia vào năm 1983 và lan rộng ra hầu hết các vùng trong cả nước (Gumbe, 2018). Ngoài ra, một số các ổ dịch nhỏ lẻ cũng được báo cáo ở Tanzania, Kenya, Zimbabwe, Somalia và Cameroon và sự tái xuất hiện các ổ dịch bệnh mang tính chất địa phương tại các quốc gia châu Phi đã được ghi nhận trong giai đoạn nửa sau của thế kỷ 20 (Roche và cs, 2021).

Báo cáo dịch bệnh đầu tiên ngoài khu vực các nước châu Phi cận Sahara là tại Ai cập vào năm 1988, tiếp đó là Israel vào năm 1989. Kuwait (1991), Lebanon và Bahrain (1993), Yemen (1995), Các Tiểu vương quốc Ả Rập thống nhất (2000) và Iraq năm 2013 (Rouby và cs, 2021).

Bệnh VDNC được báo cáo ở châu Âu vào năm 2013 với các ổ dịch xảy ra tại Thổ Nhĩ Kỳ. Nguyên nhân xảy ra dịch được cho là đến từ các nước láng giềng ở Trung Đông. Sau đó, dịch bệnh nhanh chóng lan rộng trên các vùng chăn nuôi của đất nước này và lây sang các nước Liên minh Châu Âu bao gồm Hy Lạp và Anbani vào năm 2015 (Tuppurainen và Oura, 2012). Cũng vào thời điểm đó, bệnh VDNC đã được báo cáo tại các nước Balkan và Nga. Tuy nhiên, đợt bùng phát lớn chỉ được ghi nhận ở Nga và một số quốc gia ở châu Âu vào năm 2017 nơi dịch bệnh hầu như được kiểm soát thành công bằng tiêm chủng hàng loạt. Sau đó, dịch lan đến các quốc gia châu Âu khác bao gồm Bulgaria, Macedonia, Serbia, Kosovo. Sự lây lan của dịch bệnh được cho là do di chuyển tự do giữa các nước láng giềng

và đặt các quốc gia chưa từng có dịch vào nhóm nguy cơ cao (Mercier và cs, 2018; Mulatu và Feyisa, 2018a).



Hình 2.1. Bản đồ lịch sử và sự lây lan của bệnh VDNC trên thế giới

(Nguồn: WOA, 2021c)

Sự bùng phát bệnh VDNC ở châu Á được ghi nhận ở Trung Quốc vào năm 2019 khi ổ dịch đầu tiên được báo cáo vào tháng 9 năm 2019 tại khu vực Tân Cương, sau đó lây lan nhanh trên phạm vi cả nước. Vi rút đã làm dấy lên sự lo ngại về sự xâm nhập của nó vào các quốc gia chưa có dịch với lượng trâu bò lớn như Úc (Akther và cs, 2023b). Đến nay, dịch bệnh đã lây lan sang phần lớn các nước châu Á bao gồm Ấn Độ (Sudhakar và cs, 2020a), Nepal (Acharya và Subedi, 2020), Bangladesh (Hasib và cs, 2021), Mông Cổ, Hồng Kông (Zan và cs, 2022) và các nước Đông Nam Á như Thái Lan, Lào, Myanmar, Campuchia, Indonesia và Việt Nam (Maw và cs, 2022; Singhla và cs, 2022; Tran và cs, 2021a). Theo WOA, từ tháng 7 năm 2019 cho đến nay, dịch bệnh VDNC đã và đang diễn ra tại trên 20 quốc gia, vùng lãnh thổ và ước tính thiệt hại do bệnh VDNC gây ra tại các nước khu vực Châu Á trên 1.5 tỷ USD.

2.1.2. Tình hình bệnh Viêm da nổi cục tại Việt Nam và vùng Bắc Trung Bộ

Bệnh VDNC trên trâu, bò lần đầu được phát hiện ở Việt Nam vào tháng 10 năm 2020 tại tỉnh Lạng Sơn và Cao Bằng, sau đó lây lan hầu hết các tỉnh thành của Việt Nam. Theo báo cáo của Cục Thú y tính đến hết tháng 9 năm 2021 dịch đã lây ra diện rộng, tại 4.269 xã của 55 tỉnh, thành phố, với tổng số 208.484 con gia súc

mắc bệnh, trong đó có 29.078 con bị chết và tiêu hủy. Việc áp dụng chương trình tiêm phòng vắc xin đã được thực hiện là biện và sau 1 năm triển khai chương trình vắc xin trên diện rộng, giảm gần 92% số trâu bò mắc bệnh và giảm 98% chết và tiêu hủy (Cục Thú y, 2023). Tính từ tháng 10/2022 đến tháng 6/2025, số xã có dịch từ lần đầu tiên xuất hiện đến nay là 4.806 xã với 212.885 con trâu bò mắc bệnh, trong đó có 30.013 ca chết và tiêu hủy (Cục Thú y, 2025).

Ô dịch đầu tiên tại vùng Bắc Trung Bộ được nghi nhận tại huyện Quỳnh Hợp, tỉnh Nghệ An vào tháng 12/2020, sau đó tiếp tục được phát hiện tại Quảng Trị và các tỉnh khác trong vùng. Thiệt hại kinh tế lớn nhất do bệnh VDNC gây ra được ghi nhận ở vùng Bắc Trung Bộ Việt Nam, nơi có khoảng 47.182 ca mắc bệnh và 9.053 ca mắc bệnh và tiêu hủy, chiếm tỷ lệ khoảng 30% tổng số trâu bò nhiễm bệnh và tiêu hủy của cả nước (Cục Thú y, 2025).

Bảng 2.1. So sánh tình hình dịch bệnh VDNC của vùng Bắc Trung Bộ so với tình hình dịch bệnh VDNC của cả nước

Chỉ tiêu so sánh	Cả nước	Bắc Trung Bộ
Số tỉnh, thành phố có dịch	55	6
Số huyện có dịch	465	84
Số xã có dịch	4.806	1.150
Số ổ dịch	5.009	1.223
Số thôn có dịch	19.690	5.430
Số hộ có dịch	130.392	35.033
Số mắc bệnh	212.885	47.182
Tổng chết, hủy	30.013	9.053

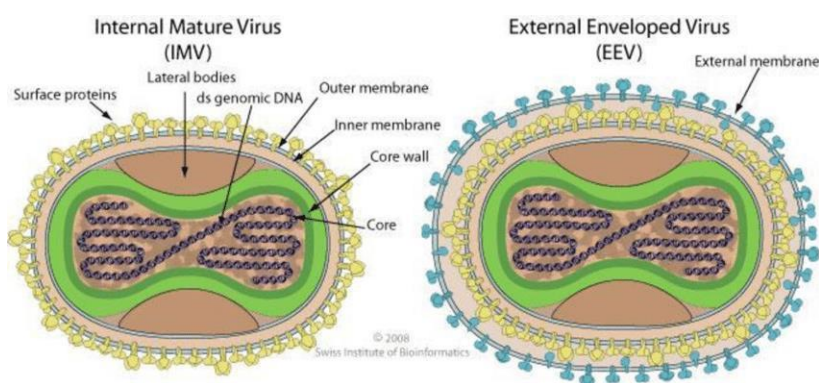
2.2. Các đặc điểm sinh học cơ bản vi rút LSD

2.2.1. Căn bệnh và cấu trúc của vi rút LSD

Bệnh VDNC, còn gọi là bệnh da sần hoặc giả mê đay, là bệnh truyền nhiễm gây ra ở trâu, bò, do một loại vi rút thuộc chi *Capripoxvirus* (CaPV), phân họ *Chordopoxvirinae* trong họ *Poxviridae*. Chi *CaPV* bao gồm vi rút đậu cừu (SPPV), vi rút đậu dê (GTPV) và vi rút LSD. Về mặt kháng nguyên, vi rút LSD có liên quan chặt chẽ với vi rút gây bệnh đậu cừu, dê, và tất cả chúng đều có khả năng bảo

hệ chéo khoảng 96% (Lojkić và cs, 2018). Vì vậy, những vi rút này không thể phân biệt bằng các xét nghiệm huyết thanh học thông thường.

Vi rút VDNC có hình bầu dục hoặc hình viên gạch, với độ dài 294 nm và rộng 262 nm, gồm lõi hình quả tạ được bao phủ bởi lớp lipid kép. Cấu trúc bộ gen của vi rút LSD tương tự như các poxvi rút khác, bao gồm các sợi kép DNA tuyến tính, chiều dài khoảng 151 kbp và mã hóa khoảng 156 khung đọc mở (ORF). Trong số đó có 146 gen được bảo tồn mã hóa các protein liên quan đến phiên mã mRNA, chuyển hóa nucleotide, sao chép DNA, xử lý protein, cấu trúc và lắp ráp virion, độc lực của vi rút và phạm vi vật chủ. Lõi vi rút bao gồm một phân tử DNA sợi đôi lớn và khoảng 80 protein. Hai mươi protein được liên kết với quá trình phiên mã và biến đổi mRNA (Moss, 2012). Các thân hai bên được gắn vào bề mặt của lõi và chứa các protein có chức năng điều hòa miễn dịch, cho phép vi rút trốn tránh khả năng phòng vệ chống vi rút của vật chủ (Schmidt và cs, 2013). Có hai dạng hạt vi rút khác nhau của *poxvirus*. Một là trưởng thành nội bào vi rút (MV) chứa một màng đơn và màng còn lại là vi rút bao bọc ngoại bào (EV) chứa hai màng (Haftu, 2012; Moss, 2012) (Hình 2.2)



Hình 2.2. Cấu trúc chung của vi rút bệnh VDNC

(Nguồn: Huang và cs, 2012)

Protein cấu trúc p32, GPCR, hay PRO30 đóng vai trò trong khả năng bám dính, xâm nhiễm, trốn tránh hệ thống miễn dịch của cơ thể, kích thích vật chủ sản sinh kháng thể của vi rút gây bệnh VDNC. Gen p32 của vi rút LSD có độ dài là 969 bp, mã hoá cho 323 amino acid. Protein p32 (envelope protein) là một protein cấu trúc có tính kháng nguyên cao của tất cả các chủng CaPV bao gồm SPPV,

GTPV, và LSDV, gen p32 được sử dụng để phát hiện huyết thanh học và chẩn đoán gen học của các vi rút thuộc gia đình nhà CaPV (Tasioudi và cs, 2016; Hamdi và cs, 2020a). Gen RPO30 (30 kDa RNA polymerase subunit), tương đồng với gen E4L của vi rút vắc xin, mã hóa tiểu đơn vị RNA polymerase 30 kDa đóng vai trò quan trọng trong quá trình sao chép và nhân lên của vi rút LSD (Lamien và cs, 2011a; Santhamani và cs, 2014; Sprygin và cs, 2018d). Gen GPCR (G-protein-coupled chemokine receptor) là gen mã hóa thụ thể chemokine kết hợp với protein G, đóng vai trò liên kết màng, tham gia vào quá trình điều hòa miễn dịch của vật chủ (Santhamani và cs, 2014; Sudhakar và cs, 2020c).

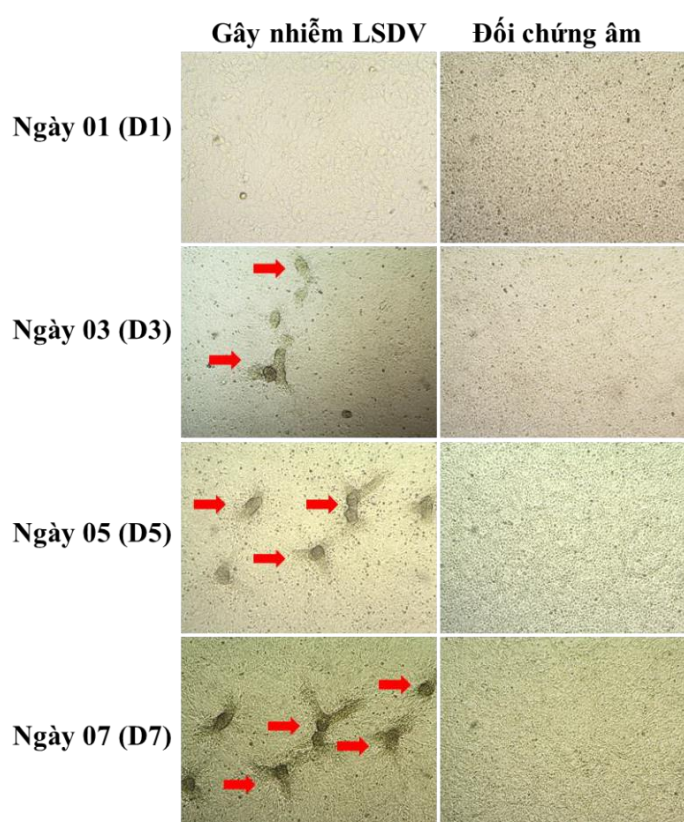
2.2.2. Sự nhân lên của vi rút trên tế bào

Giống như các thành viên khác của họ *poxviridae*, vi rút LSD thể hiện chu kỳ sao chép tế bào chất, trong đó DNA mạch kép (dsDNA) là enzyme trung gian cho sản xuất RNA thông tin (mRNA) và sao chép bộ gen cho virion con cháu. Tổng hợp DNA của vi rút bắt đầu từ 1,5 đến 6 giờ sau khi nhiễm vi rút và hai loại virion gây nhiễm (màng đơn và màng kép) được giải phóng khỏi các tế bào bị nhiễm (Zewdie, 2021). Vi rút nhân lên trong một số loại tế bào chính bao gồm tế bào thận cừu và bê, tế bào thận phôi cừu và nguyên bào sợi phôi gà. Tuy nhiên, sự phát triển của nó bị hạn chế ở tế bào thận khỉ xanh châu Phi (Vero) (Xie và cs, 2024). Ngoài ra, vi rút LSD có khả năng nhân lên trên màng đệm túi niệu của phôi gà, nơi nó tạo thành các tổn thương dạng mụn nước mà không gây chết phôi (Pervin và cs, 2023).

Loại tế bào được sử dụng phổ biến nhất để nuôi cấy và phân lập các loại CaPV là tế bào thận cừu và tinh hoàn cừu sơ cấp. Tuy nhiên, quần thể tế bào sơ cấp không đồng nhất và dễ nhiễm vi rút khác như vi rút bluetongue (Beard, 2016a). Vì vậy, trong những năm gần đây các dòng tế bào như tế bào tinh hoàn buồng trứng OA3.Ts (Ovine testis cell- tế bào tinh hoàn cừu) và tế bào MDBK đã được sử dụng trong phòng thí nghiệm nuôi cấy và phân lập vi rút gây bệnh VDNC (Fay và cs, 2020). Tế bào Vero cũng đã được thử nghiệm để nuôi cấy vi rút gây bệnh VDNC nhưng được chứng minh là có khả năng sao chép CaPV kém hơn so với tế

bào MDBK và OA3.Ts và do đó không được khuyến khích để phân lập vi rút (Rhazi và cs, 2021).

Tại Việt Nam, ngay sau khi dịch xảy ra, nhóm nghiên cứu của VIỆN CHĂN NUÔI VÀ THÚ Y VIỆT NAM đã tiến hành thu thập mẫu bệnh phẩm và tiến hành phân lập vi rút gây bệnh VDNC trên tế bào dòng MDBK. Kết quả cho thấy bệnh tích tế bào đặc trưng bắt đầu xuất hiện từ ngày thứ 3 sau gây nhiễm. Các bệnh tích tế bào tăng dần ở ngày thứ 5 và đạt đỉnh ở ngày thứ 7 (Sanz-Bernardo và cs, 2021; Tran và cs, 2021).



Hình 2.3. Bệnh tích VDNC trong các ngày trên tế bào dòng MDBK

(Nguồn: Tran và cs, 2021b)

2.2.3. Tương tác giữa vật chủ và vi rút LSD

Vi rút VDNC có tính đặc hiệu cao với vật chủ và chỉ gây bệnh ở các loài gia súc như bò và trâu nước, trong khi các loài thuần hóa khác như cừu, dê, lợn và ngựa không bị ảnh hưởng do tính đặc hiệu của vật chủ (Akther và cs, 2023). Bò là vật chủ chính, nhưng kháng thể đặc hiệu với vi rút đã được tìm thấy ở nhiều loài động vật nhai lại hoang dã như linh dương và hươu cao cổ bất cứ khi nào thực hiện gây nhiễm thử nghiệm (Pal và Paulos Gutama, 2023). Tuy nhiên, cần phải quan

sát và theo dõi thường xuyên các đợt bùng phát dịch bệnh và vi rút đột biến để dự đoán khả năng lây nhiễm sang vật chủ khác. Mức độ nghiêm trọng của VDNC ở vật chủ phụ thuộc vào một số yếu tố vật chủ và môi trường. Mặc dù giống, độ tuổi và giới tính dường như không đóng vai trò quyết định mức độ nghiêm trọng của bệnh (Elhaig và cs, 2017), một số nghiên cứu cho thấy bò *Bos taurus* dễ mắc bệnh nặng hơn bò bản địa (*Bos indicus*) và bò Zebu (Sudhakar và cs, 2020) do đặc điểm da mỏng và năng suất sữa cao. Bò Zebu đực thường dễ mắc bệnh do làm việc như động vật kéo cày, dẫn đến trầy xước da, trở thành nơi thu hút vật chủ trung gian. Bê con có xu hướng biểu hiện các dấu hiệu lâm sàng nghiêm trọng hơn bò trưởng thành (Amenu và cs, 2018).

Trong điều kiện môi trường lý tưởng, quần thể vật chủ trung gian có thể sinh sôi nảy nở và tiếp xúc thường xuyên hơn với vật chủ mẫn cảm. Chăn nuôi ở vùng đất thấp với các vùng nước tồn đọng tạo điều kiện ẩm ướt phù hợp cho sự sinh trưởng của ruồi, muỗi, ve (Amenu và cs, 2018). Hệ thống chăn nuôi được thiết kế cho bò sữa năng suất cao kết hợp với điều kiện môi trường thuận lợi cho vật chủ trung gian có thể tạo ra tình trạng căng thẳng, có thể gây ức chế miễn dịch ở vật chủ và phát sinh bệnh (Tageldin và cs, 2014).

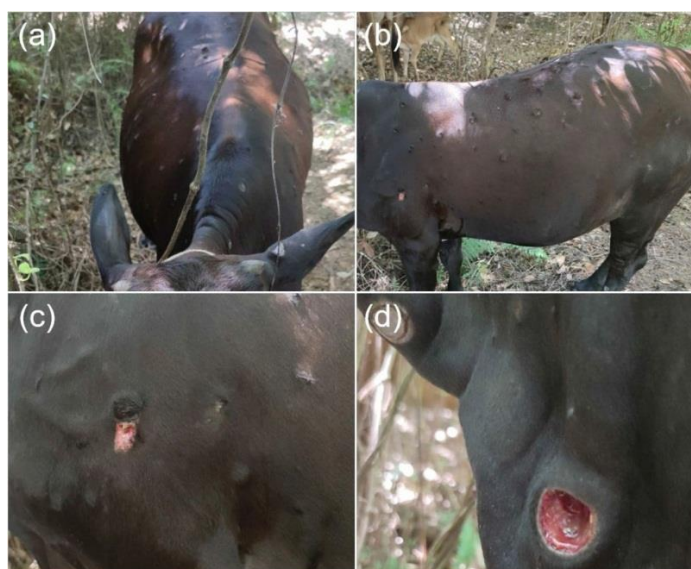
Phản ứng miễn dịch của vật chủ đối với bệnh VDNC chưa được hiểu rõ, nhưng giống như hầu hết các loại CaPV, khả năng miễn dịch suốt đời chống lại sự tái nhiễm vi rút LSD đã được chứng minh. Sau khi lây nhiễm, sự phát triển và nhân lên của vi rút LSD diễn ra bên trong tế bào, do đó miễn dịch dịch thể không thể chống lại sự tăng sinh của vi rút nhưng miễn dịch bẩm sinh có khả năng tạo ra phản ứng miễn dịch bằng cách kích thích hệ thống miễn dịch thích ứng và một số tế bào miễn dịch trung gian như tế bào lympho, đại thực bào và bạch cầu trung tính, chịu trách nhiệm vô hiệu hóa tác nhân gây bệnh và kiểm soát bệnh (Milovanović và cs, 2019). Động vật đã phục hồi sau khi lây nhiễm tự nhiên sản xuất ra các kháng thể đặc hiệu, có khả năng trung hòa tới 3 log của vi rút và cũng có khả năng chống lại sự tái nhiễm.

2.2.4. Sinh bệnh học và ảnh hưởng của vi rút LSD lên cơ thể vật chủ

Kiến thức về sinh bệnh học của VDNC còn hạn chế so với các bệnh do vi rút khác gây ra. VDNC cho thấy mô hình sinh bệnh tiến triển từ khi nhiễm vi rút, sau đó là xâm nhập và nhân lên tại chỗ, rồi phát triển thành vi rút trong máu, dẫn đến sự vận chuyển vi rút đến các mô và cơ quan cụ thể (Kayesh và cs, 2020). Thời gian ủ bệnh của VDNC là khoảng 5 tuần trong trường hợp mắc tự nhiên, trong khi thời gian ủ bệnh thực nghiệm dao động từ 4 đến 7 ngày (Moudgil và cs, 2023). Cũng như các thành viên khác của CaPV, vi rút LSD có đặc tính dinh dưỡng mô đối với tế bào sừng. Ngay sau khi nhiễm tự nhiên hay thực nghiệm, vi rút bắt đầu nhân lên trong hầu hết các tế bào phổ biến như tế bào sừng, biểu mô nang lông, nguyên bào sợi, đại thực bào kẽ và tế bào quanh mạch ở vị trí ưa thích như da đầu, cổ, cơ quan sinh dục, chân tay và vú. Ở tế bào sừng, ban đầu xảy ra tình trạng tăng sản và thoái hóa phình to, có thể lan đến lớp biểu bì và hình thành một số túi nhỏ, sau đó các túi lớn hơn hình thành do sự hợp nhất của các túi nhỏ và thu hút các tế bào viêm tích tụ ở lớp biểu bì, lớp hạ bì và lớp dưới da. Cuối cùng, có loét với dịch tiết dẫn đến hình thành vảy và đóng vảy với các mức độ xuất huyết, sung huyết và phù nề khác nhau ở xung quanh (Mulatu và Feyisa, 2018). Các hạt vi rút có thể được vận chuyển đến các vị trí nhiễm trùng thứ cấp bao gồm phổi, gan, thận và các hạch bạch huyết khác (El-Kenawy và El-Tholoth, 2011) thông qua tuần hoàn toàn thân; đặc biệt các tế bào đơn nhân được coi là vật mang vi rút LSD và sốt không liên tục là dấu hiệu của tình trạng nhiễm vi rút huyết cực độ. Trong quá trình vi rút huyết, có thể có khả năng phát triển viêm mạch và viêm mạch bạch huyết do tổn thương nội mô với sự nhân lên của vi rút (Akther và cs, 2023).

Vi rút LSD thể hiện chu trình sao chép tế bào chất, trong đó DNA chuỗi kép (dsDNA) phần lớn được trung gian enzyme để sản xuất RNA thông tin (mRNA) và sao chép bộ gen cho virion thế hệ con cháu (Mulatu và Feyisa, 2018). Vi rút LSD nhân lên ở tế bào biểu mô sau đó xâm nhập vào máu gây ra triệu chứng sốt ở vật chủ và di chuyển đến da và niêm mạc làm nổi u cục khắp bề mặt da và niêm mạc. Một số nghiên cứu cho thấy thời gian ủ bệnh 4 - 14 ngày. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu thực địa đã chứng minh thời gian ủ bệnh có thể từ 2 - 5 tuần (Sanz-

Bernardo và cs, 2020). Vi rút LSD sao chép nội bào trong đại thực bào, nguyên bào sợi, tế bào nội mô và tế bào ngoại vi. Sự nhân lên của vi rút tại các tế bào này gây ra triệu chứng viêm mạch và viêm hạch bạch huyết (Coetzer và cs, 2018). Kiểm tra mô học các tổn thương ở động vật bị nhiễm vi rút gây bệnh VDNC cho thấy sự khác biệt về các triệu chứng bệnh tích tùy theo giai đoạn nhiễm trùng. Trong quá trình nhiễm trùng, kiểm tra mô học cho thấy tổn thương các phần da của động vật bị nhiễm vi rút LSD có sự thoái hóa phình to ở lớp biểu bì, sự hiện diện của thể vùi trong tế bào chất, viêm mạch và tăng sinh của nguyên bào sợi (Neamat-Allah, 2015).



Hình 2.4. Tổn thương trên da ở bò bị nhiễm vi rút gây bệnh VDNC

(a, b) Các nốt sần trên da bao phủ toàn bộ cơ thể gia súc mắc bệnh; (c, d) Các vết thương hoại tử ở vùng da

(Nguồn: Mathijs và cs, 2021)

Nhiễm trùng cấp tính ở gia súc có liên quan đến viêm mạch và viêm bạch huyết, gây huyết khối và nhồi máu với hậu quả hoại tử kết hợp với thâm nhiễm miễn dịch. Do đó, giai đoạn muộn của nhiễm trùng đặc trưng bởi tình trạng xơ hóa, trong đó các tế bào chết (do hoại tử) ở giai đoạn nhiễm trùng ban đầu được thay thế bằng tế bào viêm và nguyên bào sợi. Giai đoạn cuối của bệnh có biểu hiện tăng sừng ở lớp biểu bì. Các tế bào hoại tử bị phù nề, hình thành mụn nước bên trong. Sự xuất hiện của thể vùi cũng là đặc điểm của nhiễm trùng giai đoạn muộn. Nhìn

chung, gia súc đang cho con bú, gia súc non, gia súc có tình trạng sức khỏe kém dễ bị mắc bệnh VDNC hơn. Nguyên nhân lý giải cho vấn đề này có thể do khả năng miễn dịch của cơ thể chưa hoàn thiện hoặc bị suy giảm (Babiuk, 2018). Tuy nhiên, những con bê sinh ra từ trâu, bò mẹ đã được tiêm vắc xin có khả năng chống chịu bệnh tật ít nhất 2 tháng đầu sau khi sinh do chúng nhận được kháng thể của mẹ thông qua sữa non (Agianniotaki và cs, 2017c). Đến nay, chưa có nghiên cứu nào chứng minh trâu bò khỏi bệnh ở trạng thái mang trùng và tương tự như các poxvi rút khác, khả năng miễn dịch sau khi khỏi bệnh VDNC tự nhiên là suốt đời (Mulatu và Feyisa, 2018; Gupta và cs, 2020).

Tùy thuộc vào tải lượng vi rút, tính miễn cảm và khả năng miễn dịch của vật chủ, các yếu tố quản lý và môi trường, véc tơ gây bệnh, các biểu hiện lâm sàng của bệnh VDNC có thể được chia thành dạng nhẹ và cấp tính. Ở thể nhẹ, tổn thương dạng nốt có đường kính 1–5 cm được tìm thấy trong vòng 2–3 ngày sau khi bắt đầu sốt cùng với chứng chán ăn, lười vận động, tăng tiết nước bọt, tiết dịch ở mũi và mắt, thể trạng hốc hác. Các nốt thường tròn, nổi lên, cứng, đau và sung huyết và thường thấy ở da mõm, cổ, lưng, chân, bìu, đáy chậu, mí mắt, tai dưới, niêm mạc mũi và đuôi (Almeida và cs, 2011; Salib và Osman, 2011). Dạng cấp tính nặng hơn, sốt cao liên tục, chán ăn và thường là nằm một chỗ, có thể quan sát thấy nhiều nốt sần đồng nhất trên cơ thể động vật trong vòng 2-3 tuần kể từ khi phát bệnh. Các tổn thương dạng nốt nổi lên thường có kích thước khoảng 1–7 cm và thường thấy nhất ở đầu, cổ, bầu vú, cơ quan sinh dục, đáy chậu và chân và có thể dễ dàng tách ra khỏi vùng da khỏe mạnh xung quanh bằng một viên xuất huyết (Gupta và cs, 2020). Các nốt nhỏ hơn thường kết hợp lại để tạo thành các tổn thương lớn hơn và bong ra tạo ra thành vết thương hở. Do vậy, thu hút các vectơ gây bệnh như ruồi, muỗi, ve mòng và thường gây ra nhiễm khuẩn thứ cấp (Coetzer và cs, 2018; Gupta và cs, 2020). Do toàn bộ da và cơ bị ảnh hưởng, cơn đau dữ dội khiến con vật không muốn di chuyển; có trường hợp quan sát thấy hiện tượng phù mắt, ức và chân (Jameel, 2016). Ở những con bò bị ảnh hưởng có thể xảy ra hiện tượng mất sữa nghiêm trọng, sảy thai và mất động dục kéo dài,

trong khi đó, Ở động vật đực, tổn thương mô tinh hoàn có thể gây sưng bìu, dẫn đến vô sinh tạm thời hoặc vĩnh viễn (Al-Salihi, 2014; Lu và cs, 2021).

2.3. Đặc điểm sinh học phân tử của vi rút Viêm da nổi cục

2.3.1. Các gen đặc trưng của vi rút Viêm da nổi cục

Các gen RPO30, GPCR và p32 đều mang tính đặc trưng riêng cho các vi rút thuộc họ CaPV bao gồm LSDV, SPPV và GTPV ở cả cấp độ trình tự nucleotit và axit amin; do đó, chúng được sử dụng để phân biệt LSDV, SPPV và GTPV (Lamien và cs, 2011a; Santhamani và cs, 2014; El-Tholoth và El-Kenawy, 2016; Agianniotaki và cs, 2017a; Sudhakar và cs, 2020). Độ nhạy và đặc hiệu của các phương pháp sinh học phân tử chẩn đoán phân biệt LSDV, SPPV và GTPV dựa vào các gen P32, RPO30 và GPCR đã được sử dụng để phát hiện và xác định đặc điểm của LSDV và các CaPV khác (Santhamani và cs, 2014; El-Tholoth và El-Kenawy, 2016).

Gen P32 của vi rút gây bệnh VDNC có độ dài đoạn mã hoá protein p32 là 969 bp, mã hoá cho 323 amino acid. Protein p32 (envelope protein) là một protein cấu trúc có tính kháng nguyên cao, thường được sử dụng để phát hiện chẩn đoán huyết thanh và sinh học phân tử của các vi rút thuộc họ CaPV. Tổ chức WOAHA khuyến cáo rằng gen p32 là một kháng nguyên gây bệnh quan trọng. Trong một số nghiên cứu, gen p32 đã được sử dụng để phát hiện và xác định đặc điểm phân tử của các vi rút thuộc họ CaPV. Các phân tích về cây phả hệ của các chủng vi rút LSD dựa trên gen p32 có thể coi là công cụ đáng tin cậy trong việc xác định nguồn gốc của các chủng vi rút LSD và phân biệt với các vi rút khác thuộc họ nhà CaPV (WOAHA, 2021b).

Gen RPO30 tương đồng với gen E4L của vi rút vaccinia, mã hóa tiểu đơn vị RNA polymerase phụ thuộc DNA và gen này đóng vai trò quan trọng trong việc nhân lên của vi rút (Kononov và cs, 2019a; Aleksandr và cs, 2020b; Lambert và cs, 2021). Hiện nay, các nhà nghiên cứu sử dụng phương pháp PCR và giải trình tự đoạn gen PRO30, kết hợp phân tích cây phả hệ gen PRO30 để phân biệt chính xác các vi rút thuộc gia đình nhà CaPV bao gồm LSDV, SPPV và GTPV (Lamien và cs, 2011a; Santhamani và cs, 2014; El-Tholoth và El-Kenawy, 2016;

Agianniotaki và cs, 2017a; Sudhakar và cs, 2020). Một số nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng, sử dụng cặp primer cho phản ứng PCR dương tính nhằm khuếch đại đoạn gen RPO30 dương tính là có thể phân biệt được vi rút LSD và SPPV mà không cần giải trình tự gen (Lamien và cs, 2011a). Hơn nữa, việc phân tích di truyền phả hệ gen RPO30 có thể giúp chúng ta xác định được nguồn gốc vi rút thuộc họ CaPV (Sprygin và cs, 2018b).

Gen GPCR là một trong những gen có biến đổi mạnh nhất trong họ *Capripoxvirus* (Santhamani và cs, 2014; Agianniotaki và cs, 2017a) và là mục tiêu chính để phân biệt di truyền giữa các vi rút thuộc gia đình nhà CaPV (Santhamani và cs, 2014; Abdallah và cs, 2018). Phân tích phả hệ di truyền dựa vào gen GPCR đã được sử dụng để phân biệt giữa các vi rút thuộc họ CaPV (Santhamani và cs, 2014; El-Tholoth và El-Kenawy, 2016; Agianniotaki và cs, 2017a). Hơn nữa, dựa vào trình tự nucleotide gen GPCR và phân tích phả hệ di truyền, có thể phân biệt các nhóm phụ khác nhau của vi rút LSDV, GTPV và SPPV (El-Tholoth và El-Kenawy, 2016). Những nghiên cứu gần đây về phát triển vắc xin cho thấy, vắc xin tái tổ hợp mang gen GPCR có khả năng sản sinh kháng thể trung hòa sớm. Đồng thời nó cho thấy hiệu quả bảo hộ cao với trâu, bò khi được công cường độc (Cetre-Sossah và cs, 2017).

2.3.2. Phả hệ di truyền và phân nhóm vi rút Viêm da nổi cục

Dựa vào trình tự gen GPCR, vi rút gây bệnh VDNC thuộc nhóm subtype I trong hai nhóm subtype I và II của gia đình nhà CaPV. Nhóm subtype I được chia thành ba nhóm chính bao gồm cluster 1.1, 1.2 và cluster 2. Nhóm cluster 2 bao gồm các vi rút tái tổ hợp mới và được chia nhỏ thành 05 nhóm riêng biệt từ 2.1 đến 2.5. Phần lớn các sub-cluster phụ này bao gồm các trình tự từ một hoặc hai chủng phân lập (Mazloum và cs, 2023). Sub-cluster 1.1 và 1.2 bao gồm các chủng phân lập từ các khu vực khác nhau trên thế giới cũng như phân bố trong thời gian dài. Chủng phân lập sớm nhất là từ Nam Phi vào năm 1954, trong khi chủng mới nhất từ Ấn Độ vào năm 2020 (Badhy và cs, 2021; Schalkwyk và cs, 2022). Ngược lại, năm dòng phụ của các chủng tái tổ hợp mới tạo thành sub-cluster 2 đã được phát hiện từ năm 2017 và chỉ có ở Nga, Kazakhstan và các nước châu Á (Krotova

và cs, 2022b; Krotova và cs, 2022c; Sprygin và cs, 2019a; Sprygin và cs, 2018d; Sprygin và cs, 2019c). Dựa trên trình tự hệ gen hoàn chỉnh, người ta đã tính toán rằng sub-cluster 1.1 và 1.2 có chung một tổ tiên khoảng 550 năm trước (Schalkwyk và cs, 2022). Các chủng phân lập được đầu tiên đại diện cho cả hai sub-cluster này đã được lưu hành, tương ứng ở Nam Phi (sub-cluster 1.1) và Kenya (sub-cluster 1.2) vào những năm 1950 (Schalkwyk và cs, 2022). Sub-cluster 1.1 được đại diện bởi chủng Neethling, được phân lập vào năm 1957 và được giảm độc lực thành vắc xin thương mại vào năm 1959 (Aleksandr và cs, 2020a). Bảy điểm khác biệt về nucleotide đã được phát hiện giữa các chủng Neethling/1957 độc lực và vắc xin/1959 (van Schalkwyk và cs, 2020). Các loại vắc xin thương mại hiện có đều dựa trên chủng này. Chúng thuộc cùng một sub-cluster với sự khác biệt tối thiểu về nucleotide giữa chúng, cho thấy sự duy trì ổn định của vắc xin (Mathijs và cs, 2016; Douglass và cs, 2019; Douglass và cs, 2020; Mathijs và cs, 2021). Ngoài ra, sub-cluster 1.1 chứa các chủng phân lập thực địa có độc lực cao từ Nam Phi được phân lập vào những năm 1970 và 1990, với 69 điểm khác biệt về nucleotide trong sub-cluster này có thể do đột biến di truyền (Schalkwyk và cs, 2022).

Nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, khoảng 2.200 điểm khác biệt về nucleotide đã được mô tả giữa các chủng phân lập thuộc sub-cluster 1.1 và 1.2. Trái ngược với sự phân bố địa lý hạn chế của sub-cluster 1.1, hiện chỉ bao gồm các chủng phân lập từ Nam Phi, sub-cluster 1.2 có các chủng từ Châu Phi, Trung Đông, Châu Âu và Châu Á. Các trình tự có trong sub-cluster này có thể được chia nhỏ thành ba dòng phụ, dựa trên khoảng 260 điểm khác biệt về nucleotide giữa chúng. Chủng vi rút LSDV NI-2490 (Bovine/Kenya/Neethling 2490/1958) và KSGPO-240 (LSDV/KSGPO-240/Kenya) ban đầu từ Kenya vào năm 1958, cũng như các chủng vắc xin KSGPO-240 từ Ấn Độ, Nepal và Bangladesh vào năm 2019–2020. Sub-cluster thứ hai chứa các chủng phân lập từ châu Phi cận Sahara, bao gồm các trình tự từ Namibia và Nam Phi, và các chủng vi rút được phân lập kể từ năm 2000 (Di Felice và cs, 2020; Schalkwyk và cs, 2022). Ngược lại, sub-cluster phụ thứ ba có thời gian lưu hành ngắn nhưng phân bố địa lý rộng. Các chủng phân lập từ Trung Đông, Châu Âu và Châu Á đại diện cho các đợt bùng phát từ năm 2010 đến

2016 (Agianniotaki và cs, 2017b; Agianniotaki và cs, 2017c; Sprygin và cs, 2020b; Sprygin và cs, 2019c).

Ngược lại, các chủng phân lập thuộc sub-cluster 2 đã được phân bố thành 5 sub-cluster khác nhau do mức độ tái tổ hợp giữa các gen cao và xảy ra trên bộ gen của những vi rút này, mặc dù mô tả đầu tiên chỉ vào năm 2017 (Sprygin và cs, 2018c; Sprygin và cs, 2018d; Sprygin và cs, 2020b; Schalkwyk và cs, 2022). Chủng phân lập từ Saratov ở Nga vào năm 2017 là chủng vi rút tái tổ hợp mới đầu tiên được công bố và là chủng phân lập thứ hai từ cùng khu vực vào năm 2019 nằm trong nhóm sub-cluster 2.1. Những vi rút này có 60% SNP giống hệt với chủng vắc xin Neethling-LW1959 và 40% còn lại giống hệt với KSGPO-240, do đó có chung một tổ tiên gần với sub-cluster 1.1 (Sprygin và cs, 2018c; Krotova và cs, 2022a; Krotova và cs, 2022b). Sub-cluster 2.2 bao gồm chủng tái tổ hợp thứ hai được xác định ở Udmurtiya ở Nga, vào năm 2019 (Sprygin và cs, 2020b). Chủng phân lập LSDV/Russia/Udmurtiya/2019 khác biệt về mặt di truyền với chủng Saratov/2017, ngoại trừ các chủng bố mẹ chung là vắc xin Neethling-LW1959 và KSGPO-240. Chủng phân lập này có chung 55% SNP với KSGPO-240 và chỉ 45% với vắc xin Neethling-LW1959 dẫn đến mối liên quan phát sinh loài gần hơn với sub-cluster 1.2 (Krotova và cs, 2022b). Trình tự hệ gen hoàn chỉnh của chủng tái tổ hợp độc đáo thứ ba Kostanay/Kazakhstan/2018 đã được gửi lên GenBank, nhưng không có thông tin bổ sung nào liên quan đến chủng phân lập này được công bố. Mặc dù cũng có chung 55% SNP với KSGPO-240 và 45% với vắc xin Neethling-LW1959, nhưng bộ gen hoàn chỉnh của Kostanay/Kazakhstan/2018 và LSDV/Russia/Udmurtiya/2019 không giống hệt nhau, dẫn đến Kostanay/Kazakhstan/2018 hình thành sub-cluster 2.3 (Krotova và cs, 2022b). Sub-cluster 2.4 chứa một tái tổ hợp mới khác từ Nga vào năm 2019, LSDV/Russia/Tyumen/2019. Nó có chung 38% SNP với KSGPO-240 và 62% với vắc xin Neethling-LW-1959 (Neethling/vaccine/LW-1959), dẫn đến mối quan hệ phát sinh loài gần hơn với sub-cluster 1.1 (Krotova và cs, 2022b; Krotova và cs, 2022c). Dòng cuối cùng được xác định vào năm 2019, Sub-cluster 2.5, lần đầu tiên được mô tả trong một đợt bùng phát ở khu vực Tân Cương của Trung Quốc vào

năm 2019 (Lu và cs, 2020). Các vi rút thuộc dòng này đã lan rộng khắp Trung Quốc về phía nam đến Việt Nam, Đài Loan, Thái Lan, Campuchia, Malaysia và Indonesia cũng như phía bắc đến Mông Cổ và Nga vào năm 2020. Dòng chiếm ưu thế có 48% SNP giống hệt với KSGPO-240 và 52% giống hệt với vắc xin Neethling-LW-1959 (Krotova và cs, 2022b). Đáng chú ý, trong cùng thời gian, sub-cluster tái tổ hợp mới 2.5 đang lan rộng khắp Đông Nam Á, một trong những chủng bố mẹ của nó, chủng vắc xin KSGPO-240, đã lan rộng khắp Bangladesh, Ấn Độ, Myanmar, Nepal, Bhutan, Pakistan và Sri-Lanka. Hiện chưa có báo cáo nào ghi nhận sự tái tổ hợp tiếp theo giữa sub-cluster tái tổ hợp 2.5 và các chủng vắc xin bố mẹ KSGPO-240 (Mazloum và cs, 2023). Như vậy, hiện tại trên thế giới tồn tại hai sub-type và ít nhất bảy topotype vi rút gây bệnh VDNC trên trâu bò đang lưu hành.

Những nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam đã phân tích đặc điểm sinh học phân tử của vi rút LSD dựa trên trình tự các gen chỉ thị p32 và RP030. Kết quả cho thấy các chủng phân lập từ những ổ dịch ban đầu có mức tương đồng 100% với chủng vi rút được ghi nhận tại Trung Quốc năm 2019. Ngoài ra, nó rất gần với vi rút gây VDNC được phân lập ở Nga năm 2017 dựa trên các gen chỉ báo p32, Gen RPO30, thymidine kinase và ORF103 (Open reading frame 103) (Mathijs và cs, 2021). Kết quả giải trình tự toàn bộ gen của vi rút LSD được thực hiện từ 4 ổ dịch ở vùng Đông Bắc Việt Nam đã cho thấy vi rút LSD phân lập tại các ổ dịch này có sự tương đồng cao về trình tự nucleotide với nhau. Ngoài ra, khi so sánh trình tự nucleotide này với các chủng tham chiếu dựa trên công cụ phân tích NCBI BLAST cho thấy các chủng vi rút thực địa của Việt Nam có sự tương đồng cao 99,99% và 99,41% khi so sánh với chủng vi rút LSD của Trung Quốc/GD01/2020 (MW355944) và Nga/Saratov/2017 (MH646674). Đồng thời, những chủng vi rút LSD đang lưu hành tại vùng Đông bắc Việt Nam là chủng vi rút tái tổ hợp giữa ít nhất một chủng vi rút thực địa và một chủng vi rút LSD trong vắc xin. Phát hiện này nhấn mạnh vai trò của việc phân tích bộ gen hoàn chỉnh trong việc truy tìm ổ dịch VDNC (Mathijs và cs, 2021).

Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu tại Trung tâm Chẩn đoán và xét nghiệm Thú y Trung ương 1 thuộc Cục Chăn nuôi và Thú y cho thấy rằng gen GPCR của

tất cả các chủng vi rút phân lập được từ các ổ dịch đầu tiên tại Việt Nam đều có trình tự gen GPCR giống hệt nhau và có đoạn xóa 12 nucleotide tương tự các chủng vi rút vắc xin VDNC chủng Neethling và KSGP-0240. Về phân tích phá hệ, các chủng vi rút LSD của Việt Nam có quan hệ gần với các chủng vi rút LSD của Xinjiang/2019 (MN598006), China/XJ/2019 (MN508357) Trung Quốc năm 2019 và các chủng vi rút vắc xin Neethling và KSGP-0240. Khoảng cách di truyền giữa các chủng vi rút này nằm trong khoảng 1%. Tương tự như vậy, đối với gen RPO30, tất cả các vi rút đều có trình tự gen RPO30 giống 100% với các chủng vi rút LSDV Xinjiang/2019 (MN598006), China/XJ/2019 (MN508357) của Trung Quốc. Về phân tích phá hệ dựa trên gen RPO30 và GPCR các chủng vi rút gây bệnh VDNC ở Việt Nam, chủng vi rút LSDV Xinjiang/2019 (MN598006), China/XJ/2019 (MN508357) của Trung Quốc và các chủng vắc xin Neethling, KSGP-0240 đều nằm trong một nhóm (Cục Thú y, 2021).

2.4. Đáp ứng miễn dịch trong bệnh Viêm da nổi cục

Vai trò của miễn dịch qua trung gian tế bào (Cell mediated immunity -CMI) trong bệnh VDNC vẫn chưa được hiểu rõ (Tuppurainen và cs, 2017b). Quá trình chủ yếu được thúc đẩy bởi tế bào lympho T, phản ứng miễn dịch này dẫn đến việc sản xuất các cytokine quan trọng bao gồm IFN (Interferon) loại II (IFN- γ). Đây là IFN được sản xuất bởi các tế bào CD4+ helper T, CD8+ cytotoxic T, $\gamma\delta$ T, natural killer T, and NK (Natural Killer Cell). IFN- γ và các cytokine khác được tạo ra bởi phản ứng CMI có một loạt các chức năng bao gồm kích hoạt tế bào NK và đại thực bào, đồng thời gây ra sự chuyển đổi lớp của các globulin miễn dịch từ tế bào B huyết tương hoạt hóa (Smith và cs, 2018). Phản ứng miễn dịch qua trung gian tế bào đặc hiệu với vi rút LSD luôn được quan sát ở động vật được gây nhiễm thực nghiệm có biểu hiện lâm sàng và không lâm sàng từ các thời điểm sớm nhất được kiểm tra ngày thứ 3 hoặc 5 sau gây nhiễm. Một quần thể nhỏ các tế bào PBMC sản xuất một lượng lớn IFN- γ vào thời điểm 5 và 7 sau gây nhiễm, và một quần thể lớn hơn các tế bào sản xuất IFN- γ sau đó trong quá trình bệnh. Cả tế bào lympho T CD4+ và CD8+ đều sản xuất IFN- γ để đáp ứng với kích thích VDNC, đặc biệt

là ở các thời điểm 15 và 21 ngày sau gây nhiễm, nhưng quần thể tế bào lympho T CD4-CD8- thì không (Fay và cs, 2022).

Giai đoạn đầu của sự nhiễm vi rút LSD cho thấy tình trạng tăng sừng hóa chính hình, viêm mạch, các vi nang biểu bì và các tế bào cleve với mức độ nghiêm trọng của các tổn thương tương quan và bệnh lâm sàng. Trong khi đó, giai đoạn muộn có tình trạng tăng sừng hóa biểu bì cũng như thâm nhiễm lympho bào và mô bào ở da. Thâm nhiễm tế bào chủ yếu trong các tổn thương da là tế bào interferon (IFN)- γ + và tế bào lympho T CD4+ với một số ít tế bào dòng đại thực bào. Điều này cho thấy IFN- γ +, tế bào lympho T CD4+ và đại thực bào đóng vai trò quan trọng trong miễn dịch chống lại nhiễm vi rút LSD tự nhiên (Badr và cs, 2022). Phân tích biểu hiện cytokine Th1 (T helper cell 1) và Th2 cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa động vật nhiễm bệnh và khỏe mạnh, ngoại trừ IL (Interleukin) 10. Biểu hiện của IL2, GMCSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) và IL6 được tăng cường ở động vật khỏe mạnh trong khi biểu hiện của INFG (Interferon-gamma), IL4 và IL10 tăng lên ở động vật mắc VDNC. Phản ứng miễn dịch ở động vật khỏe mạnh (sau khi tiếp xúc với vi rút LSD) chủ yếu là biểu hiện của sự tăng sinh tế bào Th1 và có sự gia tăng sản xuất các cytokine tiền viêm (Ahmad và cs, 2023).

Vi rút LSD làm thay đổi các thông số huyết học, sinh hóa và các chỉ số cytokine ở động vật mắc bệnh. Hồng cầu, hemoglobin, tiểu cầu, bạch cầu, bạch cầu trung tính và lympho bào ở bò bị nhiễm bệnh cao hơn so với bò không bị nhiễm bệnh. *Gamma glutamyl transferase* ở bò mắc bệnh cao hơn so với bò không mắc. IFN- γ ở bò mắc cao hơn so với bò không mắc, trong khi TNF- α ở bò mắc bệnh thấp hơn so với bò không mắc bệnh (Nongbua và cs, 2024).

Vai trò của các cytokine tiền viêm và kháng viêm trong quá trình sinh bệnh ở động vật mắc VDNC tự nhiên cho thấy nồng độ IFN- γ tăng lên đáng kể trong PBMC và các nốt sần trên da ở giai đoạn đầu của mắc VDNC. IFN- γ kích hoạt các tế bào miễn dịch, đặc biệt là đại thực bào, dẫn đến sản xuất IL-6, IL-1 β và các chất trung gian gây độc tế bào, chịu trách nhiệm cho hoạt động tiền viêm dẫn đến sinh bệnh của VDNC, bao gồm viêm mạch hạt. Có nghiên cứu cho rằng IFN- γ là con

dao hai lưỡi do nồng độ IFN- γ tăng cao đã gây ra các dấu hiệu lâm sàng và tổn thương bệnh lý quá mức trong giai đoạn đầu của VDNC. Tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) là một cytokine đa chức năng đa hình, tác động lên nhiều loại tế bào và tham gia vào quá trình sinh bệnh tăng lên trong giai đoạn giữa và cuối của nhiễm vi rút LSD. IL-2 là một cytokine tiền viêm, điều hòa sự phát triển và biệt hóa của tế bào lympho T, đồng thời tăng cường hoạt động của tế bào NK và sản xuất kháng thể mức độ biểu hiện gen mRNA IL-2 và IL-1 β tăng cao trong giai đoạn cuối của nhiễm vi rút cho thấy sự tham gia của các phản ứng viêm mạnh mẽ trong cơ chế sinh bệnh của VDNC. IL-8 hay CXCL8, một cytokine tiền viêm khác chịu trách nhiệm tuyển dụng, hoạt hóa và tích tụ bạch cầu trung tính, được phát hiện có biểu hiện tăng lên, tương quan với nhiễm trùng thứ phát do vi khuẩn và sự xâm nhập của bạch cầu trung tính (Manjunathareddy và cs, 2024).

Các cytokine loại Th2 (IL-4, IL-10 và IL-6) kích hoạt và duy trì các phản ứng miễn dịch dịch thể hoặc qua trung gian kháng thể. IL-4 là cytokine đa chức năng chính của loại Th2, một chất điều hòa chính của các phản ứng miễn dịch dịch thể và thích nghi, kích thích sự tăng sinh và biệt hóa của tế bào B thành các tế bào plasma sản xuất kháng thể, các con đường hoạt hóa đại thực bào thay thế và tình trạng viêm tăng lên đáng kể trong giai đoạn giữa và cuối của nhiễm vi rút LSD, điều này cho thấy sự tham gia của nó vào quá trình sinh bệnh ở giai đoạn giữa và quá trình sửa chữa mô ở giai đoạn cuối (Ahmad và cs, 2023).

IL-6 là một cytokine tiền viêm đa chức năng, một chất trung gian chính của các cơn bão cytokine, và kích thích cả đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và thích nghi trong quá trình nhiễm vi rút tăng lên nhiều trong giai đoạn giữa và cuối của quá trình nhiễm vi rút LSD ở bò, cho thấy sự tham gia của cơn bão cytokine và sự gia tăng các phản ứng miễn dịch hiệu quả chống lại vi rút (Kamr và cs, 2022).

IL-10 là một cytokine kháng viêm mạnh với đặc tính điều hòa miễn dịch, làm giảm biểu hiện của cytokine Th1 và đáp ứng miễn dịch của vật chủ trong quá trình nhiễm vi rút, do đó hạn chế khả năng thanh thải mầm bệnh và làm trầm trọng thêm bệnh lý, thay đổi không đáng kể trong giai đoạn đầu, giữa và cuối của nhiễm vi rút LSD, tương quan với sự gia tăng biểu hiện của các cytokine tiền viêm và tổn

thương mô, thể hiện rõ qua các dấu hiệu lâm sàng nghiêm trọng và tổn thương bệnh lý (Ahmad và cs, 2023).

2.5. Đặc điểm dịch tễ học

2.5.1. Vật chủ

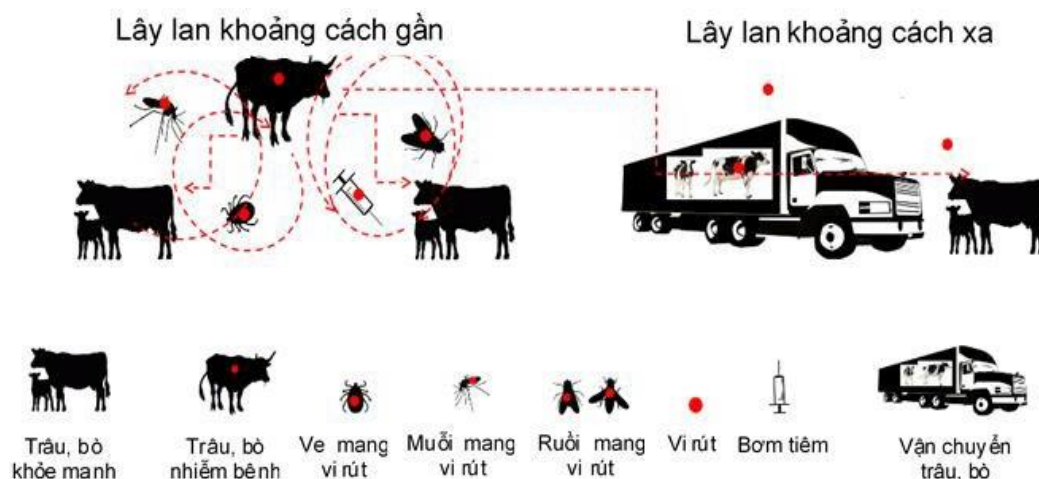
Vi rút gây bệnh da sần có tính đặc hiệu cao đối với vật chủ và chỉ gây bệnh ở các loài bò và trâu nước, trong khi các loài được thuần hóa khác như cừu, dê, lợn và ngựa không bị ảnh hưởng do tính đặc hiệu của vật chủ (Al Salihi, 2014; Kumar và cs, 2018). Mức độ nghiêm trọng của bệnh VDNC phụ thuộc vào yếu tố vật chủ và môi trường, mặc dù sự khác biệt về giống, tuổi và giới tính dường như không đóng vai trò trong việc xác định mức độ nghiêm trọng của bệnh (Al Salihi, 2014; Moudgil và cs, 2023). Một số nghiên cứu cho thấy bò dễ mắc bệnh và có các dấu hiệu lâm sàng nghiêm trọng hơn trâu nước. Trong đó bò có nguồn gốc từ Châu Âu (*Bos Taurus*), bò lai (*Crossbreed*) dễ mắc bệnh nặng hơn bò bản địa (*Bos indicus*) do đặc điểm da mỏng và sản lượng sữa cao. Bò zebu đực và các loại bò kéo thường dễ mắc bệnh hơn so với bò bản địa do làm việc như vật kéo, dẫn đến các vết trầy xước trên da và trở thành nơi thu hút vector. Bê con có xu hướng biểu hiện các dấu hiệu lâm sàng nghiêm trọng hơn so với bê trưởng thành (Gumbe, 2018; Sudhakar và cs, 2020).

2.5.2. Tính kháng của vi rút LSD

Các nghiên cứu gần đây về tính miễn cảm và khả năng kháng thuốc của vi rút LSD cho thấy vi rút rất dễ bị ảnh hưởng bởi biến động về nhiệt độ (55–65°C) và pH (6,6–8,6) và kháng với nhiều thành phần vật lý và hóa học. Vi rút có khả năng chống lại quá trình bất hoạt và có thể tồn tại tới 35 ngày trong lớp vảy da khô, > 33 ngày trong các nốt hoại tử da và ít nhất 18 ngày ở da khô trong không khí (Moudgil và cs, 2023). Vi rút có thể tồn tại trong môi trường trong thời gian dài hơn, đặc biệt là trong điều kiện tối tăm ở chuồng trại chăn nuôi bị ô nhiễm, nơi nó có thể tồn tại trong vài tháng. Bản chất tồn tại dai dẳng này khiến vi rút LSD trở thành mối đe dọa an ninh sinh học quan trọng đối với ngành chăn nuôi toàn cầu (Akther và cs, 2023).

2.5.3. Lây truyền

Bệnh VDNC chủ yếu lây truyền theo con đường gián tiếp, với vật truyền bệnh là động vật chân đốt hút máu bao gồm ruồi, muỗi, ve, mòng (Sprygin và cs, 2018a). Một số loài ruồi như ruồi chuồng trại (*Stomoxys calcitrans*) và ruồi đốt (*Biomyia fasciata*); các loại muỗi như *Culex mirificens*, *Aedes aegypti* và *Culicoides nubeculosus*, thường liên quan đến việc lây truyền bệnh VDNC (Fagbo và cs, 2014). Ngoài ra, ruồi nhà (*Musca domestica*) và ruồi tsetse (*Glossina sp.*) cũng có thể đóng vai trò lây truyền vi rút LSD. Một số loài ve, mòng bao gồm *Amblyomma hebraeum*, *Rhipicephalus appendiculatus* và *Rhipicephalus decoloratus* cũng có thể đóng vai trò là vật trung gian cơ học truyền vi rút LSD (Sprygin và cs, 2019c).



Hình 2.5. Sơ đồ minh họa con đường lây truyền của bệnh VDNC

(Nguồn: Tuppurainen và cs, 2017b)

Ngoài ra tiếp xúc trực tiếp với động vật bị nhiễm bệnh cũng đã được chứng minh là con đường lây truyền vi rút LSD (Magori-Cohen và cs, 2012). Một số nghiên cứu tại thực địa đã chỉ ra rằng việc lây truyền trực tiếp có thể xảy ra nhưng ở tốc độ và hiệu quả thấp (Sprygin và cs, 2019b). Động vật mắc bệnh thải vi rút qua các tổn thương da, dịch tiết mũi, miệng và mắt và lây truyền trực tiếp cho động vật khỏe mạnh qua việc sử dụng chung chậu đựng thức ăn, nước uống bị nhiễm các chất tiết của cơ thể vật bệnh. Nó cũng có thể lây truyền qua đường điều trị như

sử dụng chung các loại kim tiêm (Magori-Cohen và cs, 2012). Bò đang cho con bú cũng có thể truyền vi rút sang bê con do sữa bị nhiễm tổn thương da ở bầu vú.

Vi rút VDNC có thể lây truyền dọc qua tinh dịch trong giao phối hoặc thụ tinh nhân tạo, cũng như từ mẹ sang bê con qua tử cung và dịch tiết sinh dục (Annandale và cs, 2014; Salib và Osman, 2011; Rouby và Aboulsoud, 2016). Việc lây nhiễm từ vùng này sang vùng khác, từ quốc gia này sang quốc gia khác thường được xác định là do sự di chuyển xuyên vùng, xuyên biên giới không được kiểm soát (Lubinga và cs, 2015).

2.6. Chẩn đoán bệnh VDNC

2.6.1. Chẩn đoán lâm sàng

Trước hết, tiền sử lâm sàng, các dấu hiệu lâm sàng, tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ chết có thể cung cấp một số cơ sở để chẩn đoán nhiễm LSD (Moudgil và cs, 2023). Các dấu hiệu lâm sàng đôi khi có thể bị nhầm lẫn với các bệnh lý gây tổn thương da khác, cần được xác nhận bằng xét nghiệm. Chẩn đoán sau khi chết cũng rất quan trọng. Các tổn thương dạng mụn nước được tìm thấy trên niêm mạc miệng và các phần khác nhau của đường tiêu hóa, khoang mũi, khí quản và phổi (Tuppurainen và cs, 2017). Các tổn thương cũng có thể xuất hiện ở tinh hoàn và bàng quang (Annandale và cs, 2014). Phù nề nghiêm trọng và các hạch bạch huyết trung thất sưng to. Viêm màng hoạt dịch và viêm bao gân kèm theo sự hình thành fibrin được phát hiện trong dịch hoạt dịch (Sanz-Bernardo và cs, 2020). Mẫu da từ động vật mắc bệnh có thể hữu ích cho chẩn đoán về mô bệnh học (Şevik và Doğan, 2017). Do liên quan đến cơ, hoại tử đông máu nghiêm trọng (hoại tử Zenker) ở cơ dưới da có thể được quan sát thấy. Sự phù đại hạch bạch huyết có liên quan đến sự tăng sinh mô lympho, phù nề, sung huyết và xuất huyết (Mulatu và Feyisa, 2018).

2.6.2. Chẩn đoán phòng thí nghiệm

Theo khuyến cáo của Tổ chức Thú y Thế giới các xét nghiệm chẩn đoán trong phòng thí nghiệm được khuyến nghị để chẩn đoán khẳng định vi rút gây bệnh VDNC bao gồm: phân lập vi rút, phản ứng PCR truyền thống, real-time PCR và kính hiển vi điện tử. Một số xét nghiệm huyết thanh học như trung hòa vi rút (VNT), khuếch tán miễn dịch trên thạch (Agar gel immunodiffusion-AGID), xét

nghiệm kháng thể huỳnh quang gián tiếp (IFAT), phân tích Western blot và phản ứng ELISA (Moudgil và cs, 2023).

Phương pháp PCR truyền thống và real-time PCR đều là những xét nghiệm nhanh, đơn giản và có độ nhạy cao và là xét nghiệm phổ biến nhất để phát hiện bộ gen vi rút từ các tổn thương da (vảy hoặc nốt sần), máu chống đông, nước bọt, dịch mũi, tinh dịch, sữa và mẫu nuôi cấy mô theo quy trình chuẩn dành riêng cho CaPV (Lamien và cs, 2011b).

Các tế bào có nguồn gốc từ bò, cừu hoặc dê, đặc biệt là nuôi cấy sơ cấp hoặc thứ cấp các tế bào hạ bì bò, tế bào MDBK, tế bào tinh hoàn cừu (Lamb testis-LT) được coi là phù hợp cho sự phát triển của vi rút LSD. Bên cạnh đó, tế bào màng đệm của trứng gà có phôi và tế bào thận khỉ xanh châu Phi (Vero) cũng đã được sử dụng để cho sự nhân lên vi rút LSD (WOAH, 2021a).

Quan sát hình ảnh được chụp từ kính hiển vi điện tử cho thấy vi rút có hình viên gạch, được bao phủ bởi các phần tử hình ống ngắn và virion capripox có kích thước khoảng 290×270 nm được quan sát rõ ràng với chất nền pioloform-carbon. Tuy nhiên, phương pháp này bị hạn chế ở khả năng phân biệt VDNC với các loài hoặc giống orthopox khác (WOAH, 2021a; Moudgil và cs, 2023).

Phát hiện kháng thể ở gia súc bị nhiễm bệnh hoặc phục hồi bằng xét nghiệm VNT thành công trong khoảng thời gian từ 2 ngày sau khi nhiễm bệnh và khoảng 7 tháng sau khi nhiễm bệnh. Xét nghiệm IFAT được sử dụng để phát hiện hiệu giá kháng thể lên tới 1/5.000 trong huyết thanh của động vật đang hồi phục. Tuy nhiên, hạn chế của phương pháp về phản ứng chéo với vi rút đậu bò chứ không phải với vi rút parapox (Tuppurainen và Oura, 2012). Xét nghiệm AGID không được khuyến khích do phản ứng chéo của vi rút LSD với vi rút gây bệnh viêm miệng sần ở bò và vi rút đậu bò giả dẫn đến kết quả dương tính giả (Sprygin và cs, 2019c). Các bộ kit ELISA thương mại được WOAH khuyến cáo sử dụng phát hiện kháng thể trong máu của gia súc nghi mắc bệnh VDNC (WOAH, 2021a). Tuy nhiên ELISA không thể phân biệt giữa các kháng thể chống lại các loại vi rút như vi rút LSD, vi rút gây bệnh đậu dê và đậu cừu trong huyết thanh và huyết tương (Selim và cs, 2021). Nghiên cứu hóa mô miễn dịch cho thấy sự hiện diện

của kháng nguyên vi rút LSD trong tế bào chất của lớp tế bào đáy biểu bì, đặc biệt là ở các tế bào gai (Amin và cs, 2021).

2.6.3. Chẩn đoán phân biệt

Do có một số bệnh khác có tổn thương da tương tự VDNC, nên chẩn đoán phân biệt là rất quan trọng. Bệnh da sần giả do vi rút herpes 2 ở bò (BHV2) gây ra, gây tổn thương da nông và đặc trưng bởi diễn biến bệnh ngắn. Bệnh đậu bò giả (*Para poxvirus*) được phân biệt với tổn thương VDNC bởi vị trí nhiễm trùng, chủ yếu ở núm vú và bầu vú. Vi rút đậu bò và vi rút đậu bò (*Ortho poxvirus*) cũng gây ra các tổn thương tại vị trí cụ thể trên núm vú, bầu vú và mõm và có bản chất lây truyền từ động vật sang người. Bệnh do *Dermatophilus congolensis* và *Hypoderma bovis* gây ra có thể gây nhầm lẫn do có điểm tương đồng với VDNC. Tuy nhiên, các tổn thương bị sưng tấy và xói mòn nghiêm trọng, ấu trùng tiếp xúc với da ở lưng động vật. Có thể gây liệt phần thân dưới và chân khi tủy sống bị ảnh hưởng. Bệnh giun chỉ *Onchocercosis* và *Demidocosis* là các vấn đề về da được đặc trưng bởi sự hiện diện của ký sinh trùng và chúng thường có vị trí cụ thể. Có các phản ứng quá mẫn khác (nhạy cảm với ánh sáng, côn trùng và nhện cắn), có thể gây nhầm lẫn với các tổn thương VDNC. Việc phân biệt các bệnh này có thể được thực hiện thông qua PCR và các xét nghiệm đặc hiệu kháng nguyên hoặc kháng thể khác (Al-Salihi, 2014; Akther và cs, 2023).

2.7. Kiểm soát dịch bệnh

2.7.1. Vắc xin phòng bệnh

Theo tổ chức Thú y Thế giới, việc tiêm phòng thích hợp có thể kiểm soát bệnh VDNC bằng cách mang lại khả năng miễn dịch tốt cho gia súc chống lại vi rút gây bệnh. Hiện nay, có hai loại vắc xin nhược độc phòng bệnh VDNC bao gồm vắc xin đồng chủng (vắc xin có thành phần kháng nguyên là vi rút LSD chủng nhược độc) và vắc xin dị chủng (vắc xin có thành phần kháng nguyên dựa trên vi rút đậu cừu và đậu dê) đã được sử dụng để kiểm soát có hiệu quả các đợt dịch VDNC bùng phát ở nhiều quốc gia trên thế giới trong đó có Việt Nam (Tran và cs, 2021a; Tuppurainen và cs, 2021a). Các loại vắc xin dị chủng thường chỉ được sử dụng làm lựa chọn thay thế vắc xin đồng chủng ở những khu vực nơi xảy ra đồng

thời cả bệnh VDNC và các bệnh đậu ở cừu và dê. Tuy nhiên, đối với loại vắc xin này cần phải thử nghiệm trước khi đưa vào sử dụng đối với trâu bò (Khan và cs, 2021; Tuppurainen và cs, 2021a).

Các chủng vi rút nhược độc trong các loại vắc xin hiện nay phổ biến là chủng Neethling của Nam Phi và chủng đậu cừu và dê Kenya (KSGP) O-240 và O-180. Vắc xin chủng Neethling Nam Phi có phản ứng miễn dịch mạnh mẽ, lâu dài và có hiệu quả cao trong việc phòng bệnh, tuy nhiên vắc xin có thể gây ra một số tác dụng phụ (Gumbe, 2018). Vắc xin Neethling có thể gây ra phản ứng da cục bộ tại nơi tiêm hoặc giảm sản lượng sữa ở bò đang cho con bú, thường được gọi là “Phản ứng của Neethling” (Tuppurainen và cs, 2017a). Một số nghiên cứu đã báo cáo rằng vi rút vắc xin được phát hiện từ các nốt sần trên da, máu và sữa của gia súc được tiêm vắc xin Neethling (Tuppurainen và cs, 2021a). Vắc xin KSGP O-240 và O-180 đã được sử dụng để phòng bệnh VDNC ở Somali Peninsula, Israel và Ai Cập (Ayelet và cs, 2014). Tuy nhiên, tỷ lệ bảo hộ đối với vắc xin dị chủng này thấp hơn so với vắc xin nhược độc chủng Neethling (Tuppurainen và cs, 2021a). Ngoài ra, chủng vi rút đậu mùa Gorgan, chủng SPPV của Romania và chủng SPPV RM65 của Nam Tư (vắc xin dựa trên vi rút bệnh đậu dê, đậu cừu) được sử dụng làm vắc xin dị chủng chống lại vi rút gây bệnh VDNC. Các loại vắc xin dị chủng này thường có giá thành thấp hơn so với vắc xin đồng chủng do yêu cầu số lượng đòi chuyển tiếp để giảm độc lực ít hơn (Lamien và cs, 2011b). Các loại vắc xin khác đồng chủng vẫn được khuyến cáo sử dụng cho phòng bệnh VDNC hơn là các loại vắc xin dị chủng.

Vắc xin bất hoạt tạo ra thời gian miễn dịch ngắn hơn và có thể được ưu tiên sử dụng như một loại vắc xin dự phòng thay thế ở các quốc gia có nguy cơ cao nhưng chưa từng xuất hiện bệnh VDNC (Boumart và cs, 2016; Tuppurainen và cs, 2021a). Vắc xin bất hoạt có thể được trộn với các kháng nguyên khác để tạo ra miễn dịch đa giá có thể được tiêm ở những vùng có sự lưu hành của nhiều mầm bệnh khác nhau. Ngoài ra, vắc xin bất hoạt có thể được sử dụng vào giai đoạn cuối trong kế hoạch ban đầu sử dụng vắc xin sống để loại trừ bệnh (Hamdi và cs, 2020b). Việc tiêm chủng lâu dài với độ bao phủ tối thiểu là 80% là bắt buộc để kiểm soát

và phòng ngừa dịch bệnh (Tuppurainen và cs, 2021a). Tiêm phòng vắc xin bất hoạt, lần tiêm chủng đầu tiên bao gồm hai mũi tiêm cách nhau một tháng và sau đó cần tiêm lại sáu tháng một lần để duy trì khả năng miễn dịch (Sprygin và cs, 2020a).

Tại Việt Nam, ngay sau khi dịch bệnh VDNC xuất hiện, việc áp dụng chương trình tiêm phòng vắc xin, đặc biệt các loại vắc xin sống nhược độc chủng Neethling, đã được lựa chọn để khống chế sự lây lan của dịch bệnh. Bằng việc áp dụng chương trình vắc xin này, dịch bệnh đã được kiểm soát một cách kịp thời. Hiện nay, có 4 loại vắc xin phòng bệnh VDNC đã được Bộ Nông nghiệp và Môi trường cấp phép lưu hành tại Việt Nam, trong đó có 2 loại vắc xin nhập khẩu và 2 loại vắc xin sản xuất trong nước.

2.7.2. Chất khử trùng

Việc sử dụng chất khử trùng đóng vai trò quan trọng trong kiểm soát và ngăn ngừa sự lây lan của vi rút. Hiệu quả khử trùng phụ thuộc vào nhiều yếu tố liên quan đến điều kiện sử dụng cũng như đặc điểm sinh học của vi rút.

Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả khử trùng đã được ghi nhận gồm: thời gian tiếp xúc, nồng độ hoạt chất, đặc điểm vi rút và điều kiện môi trường. Một số phản ứng khử trùng diễn ra nhanh hơn ở nhiệt độ cao, trong khi ở nhiệt độ thấp hiệu quả bất hoạt có thể suy giảm đáng kể. Ngoài ra, độ ẩm và pH môi trường cũng tác động đến khả năng thấm và phản ứng của chất khử trùng (Lin và cs, 2020). Bên cạnh đó, tính miễn cảm của vi rút đối với chất khử trùng có sự khác biệt rõ rệt theo đặc điểm cấu trúc. Nhìn chung, vi rút có màng bao dễ bị bất hoạt nhất do lớp lipid vỏ ngoài nhạy cảm với các dung môi và tác nhân ưa mỡ. Vi rút không có màng bao thường bền vững hơn, trong đó nhóm vi rút nhỏ không có màng bao được xem là khó bất hoạt nhất, đòi hỏi tác nhân hóa học gây biến tính protein capsid hoặc các protein sao chép thiết yếu (Lin và cs, 2020).

Các nhóm chất khử trùng được sử dụng phổ biến trong thực tiễn bao gồm:

- Cồn (*ethanol, isopropanol*): có phổ khử khuẩn rộng, hiệu quả cao với vi rút có màng bao và một số vi rút không có màng bao, đặc biệt khi sử dụng ở nồng

độ 60–90% (Kariwa và cs, 2006). Ưu điểm là bay hơi nhanh, ít độc tính và dễ sử dụng (Lin và cs, 2020).

- Chất hoạt động bề mặt: bao gồm các hợp chất cation, anion, không ion và lưỡng tính. Cơ chế chính là phá vỡ lớp lipid của màng bao hoặc tương tác với protein capsid, qua đó làm giảm khả năng lây nhiễm (Tsujimura và cs, 2015; Romanowski và cs, 2019).

- Chất oxy hóa: *natri hypochlorit* và *hydrogen peroxide* là những đại diện tiêu biểu. Natri hypochlorit có khả năng oxy hóa mạnh nhưng giảm hiệu quả khi có nhiều chất hữu cơ. Hydrogen peroxide ở nồng độ đủ cao (13%, 5 phút) có thể bất hoạt đồng đều cả vi rút có và không có màng bao (Conley và cs, 2017).

- Hợp chất halogen: *povidone-iodine* là chất diệt vi rút phổ rộng, giải phóng iốt dần dần, được ứng dụng rộng rãi trong y tế như sát trùng da, dung dịch súc miệng hoặc dung dịch rửa tay (Eggers và cs, 2019).

- Phenol và dẫn xuất halogen hóa: có khả năng phá hủy màng tế bào và cấu trúc sinh học của vi rút. Tuy nhiên, ở nồng độ cao phenol có tính ăn mòn mạnh, chủ yếu thích hợp để khử trùng thiết bị hoặc vật liệu khó xử lý (Olanrewaju và cs, 2024; Aranke và cs, 2021).

- Aldehyde (*formaldehyde*): là chất khử trùng mức độ cao, có khả năng bất hoạt nhanh nhiều loại vi rút thông qua alkyl hóa nhóm amino và sulfhydryl của protein cũng như các base nucleic. *Formaldehyde* đã được sử dụng trong sản xuất vắc xin và nghiên cứu khoa học (Möller và cs, 2015). Tuy nhiên, do độc tính cao, nguy cơ gây đột biến và ung thư, việc sử dụng cần được kiểm soát nghiêm ngặt (Rovira và cs, 2016).

PHẦN 3. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Nghiên cứu xác định sự có mặt của vi rút LSD từ mẫu bệnh phẩm thực địa thuộc vùng Bắc Trung Bộ

Nội dung 2: Nghiên cứu đặc tính sinh học phân tử của một số chủng vi rút gây bệnh viêm da nổi cục đang lưu hành tại vùng Bắc Trung Bộ.

Nội dung 3: Nghiên cứu đặc tính sinh học của chủng vi rút LSD gây bệnh viêm da nổi cục đang lưu hành tại vùng Bắc Trung Bộ

Nội dung 4: Đánh giá sự miễn cảm của một số chất sát trùng thông dụng đối với chủng vi rút LSD gây bệnh viêm da nổi cục phân lập tại vùng Bắc Trung Bộ

3.2. Vật liệu dùng trong nghiên cứu

- Mẫu bệnh phẩm: U cục ở da, dịch mũi, miệng, máu và các cơ quan phủ tạng trâu, bò mắc hoặc nghi mắc

- Các loại chất sát trùng (9 loại): Sodium dodecyl sulfate 0.8%, Iodine 3%, Formandehyde 1%, Chloroform 5%, Ether 20%, Phenol 2%, NaOH 3%, Amonium 0.5%, Virkon S 2%

Hóa chất và dụng cụ: QIAamp Viral DNA Mini Kit 250 (Qiagene), Perfecta Multiplex qPCR SuperMix (Quantabio), Kit PCR, Môi trường nuôi cấy tế bào MEM, tế bào MDBK, chai nuôi cấy tế bào các loại, ống Eppendorf 1,5ml, 0,2ml các loại, ống facol 15 ml và 50 ml, pipet tip 10, 100,200,1000 µl

Máy móc trang trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu: Buồng cấy vô trùng, Máy PCR, real time PCR, kính hiển vi soi ngược, máy Nanodrop, máy ủ nhiệt khô, Bộ điện di DNA (Advance Tech), Máy soi chụp ảnh gel...

3.3. Đối tượng nghiên cứu

-Vi rút LSD

- Trâu, bò nghi mắc bệnh VDNC tại vùng Bắc Trung Bộ

3.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

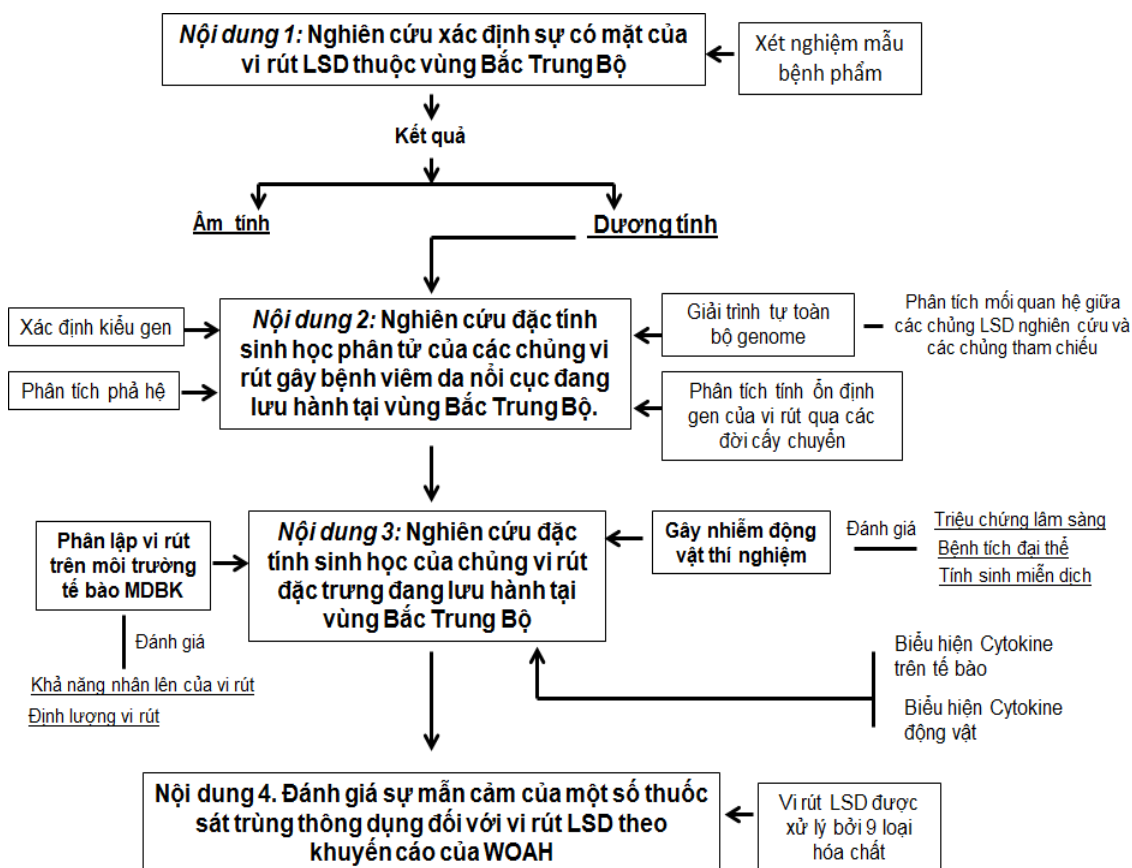
- Bộ môn Hóa sinh - Miễn dịch, VIỆN CHĂN NUÔI VÀ THÚ Y VIỆT NAM;

- Chi cục Chăn nuôi và Thú y vùng III – Cục Chăn nuôi và Thú y

- Các tỉnh thuộc vùng Bắc Trung Bộ bao gồm: Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Trị (bao gồm Quảng Trị và Quảng Bình cũ) và Thừa Thiên Huế.

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 12/2021 đến tháng 06/2025

3.5. Phương pháp nghiên cứu



Hình 3.1. Sơ đồ thực hiện nghiên cứu

3.5.1. Bố trí thí nghiệm

Các thí nghiệm được bố trí theo từng nội dung nghiên cứu và các phương pháp tương ứng để thực hiện. Tóm tắt bố trí thí nghiệm được trình bày ở 3.1.

Bảng 3.1. Bố trí thí nghiệm theo nội dung nghiên cứu

TT	Bố trí thí nghiệm và phương pháp nghiên cứu
Nội dung 1: Nghiên cứu xác định sự có mặt của vi rút LSD thuộc vùng Bắc Trung Bộ	
1	Phương pháp mổ khám, lấy mẫu, xử lý bệnh phẩm
2	Phương pháp chiết tách DNA
3	Phương pháp real-time PCR

Nội dung 2: Nghiên cứu đặc tính sinh học phân tử của các chủng vi rút gây bệnh viêm da nổi cục đang lưu hành tại vùng Bắc Trung Bộ.				
1	Phương pháp tách chiết DNA			
2	Phương pháp real-time PCR			
3	Phương pháp PCR khuếch đại toàn bộ các gen			
4	Giải trình tự Sanger			
5	Next Generation Sequencing (NGS)			
6	Phần mềm BioEdit, FinchTV, DNASTar (Lasergen), MEGA7			
Nội dung 3: Nghiên cứu đặc tính sinh học của chủng vi rút đặc trưng đang lưu hành tại vùng Bắc Trung Bộ				
1	Phương pháp nuôi cấy tế bào			
2	Phương pháp phân lập vi rút			
3	Phương pháp xác định hiệu giá vi rút TCID ₅₀ (50% Tissue Culture Infective Dose)			
4	Phản ứng trung hòa vi rút (Vi rút Neutralization Test - VNT)			
5	Gây nhiễm trên động vật			
	Lô đối chứng	Lô tiêm 10⁶ TCID₅₀/mL	Lô tiêm 10^{6.5} TCID₅₀/mL	Lô tiêm 10⁷ TCID₅₀/mL
	3 bê (4-6 tháng tuổi)	3 bê (4-6 tháng tuổi)	3 bê (4-6 tháng tuổi)	3 bê (4-6 tháng tuổi)
	Lấy máu và dịch tiết (1, 3, 5, 7, 10, 14 và 21 ngày sau gây nhiễm)			
	Mổ khám (11, 15, 21 ngày sau gây nhiễm)			
6	Phương pháp lấy mẫu			
7	Phương pháp mổ khám			
8	Phương pháp real-time PCR			
9	Đánh giá biểu hiện Cytokine trên tế bào MDBK			
	Đối chứng	Chủng LS16	Chủng NA06	
	Không gây nhiễm	Liều gây nhiễm 0.01 MOI	Liều gây nhiễm 0.01 MOI	
	Kiểm tra 1h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h			
	Đánh giá IFN γ , TNF α , IL-10, IL-1 α , TGF β 1 và IL-6 mRNA			
10	Đánh giá biểu hiện Cytokine trên động vật thí nghiệm			

	Đối chứng	Chủng LS16	Chủng NA06
	4-6 tháng tuổi	4-6 tháng tuổi	4-6 tháng tuổi
	Không gây nhiễm	Liều gây nhiễm $1 \times 10^{6.5}$ TCID50/mL	Liều gây nhiễm $1 \times 10^{6.5}$ TCID50/mL
	Lấy máu (0, 7, 14, 21 và 28 sau thí nghiệm)		
	Đánh giá IFN γ , TNF α , IL-10, IL-1 α , TGF β 1 và IL-6 mRNA		
11	Phân tích dữ liệu và xử lý thống kê (phần mềm IBM SPSS)		
	Nội dung 4: Đánh giá sự miễn cảm của một số chất sát trùng thông dụng đối với chủng vi rút LSD phân lập tại vùng Bắc Trung Bộ		
	Tên chất sát trùng	Đối chứng âm	Thí nghiệm
		Nước	Chủng NA06 liều 1×10^6 TCID50/mL
	Sodium dodecyl sulfate 0,8%	Không sử dụng hóa chất	Sử dụng hóa chất. Thời gian thực hiện (30 phút, 60 phút, 180 phút)
	Iodine 3%		
	Formalin 1%		
	Chloroform 5%		
	Ether 20%		
	Phenol 2%		
	NaOH 3%		
	Ammonium 0,5%		
	Virkon 2%		
	Đối chứng dương		
			Chủng NA06 liều 1×10^6 TCID50/mL
1	Phương pháp chuẩn độ vi rút (TCID50)		
2	Phản ứng trung hòa vi rút (Virus Neutralization Test - VNT)		
3	Phân tích dữ liệu và xử lý thống kê (phần mềm IBM SPSS)		

3.5.2. Phương pháp thu thập và xử lý mẫu bệnh phẩm

Quy trình thu thập và xử lý mẫu bệnh phẩm được tiến hành theo các hướng dẫn và quy chuẩn hiện hành (TCVN 8402:2010; QCVN 01-83:2011/BNNPTNT; QCVN 01-41:2011). Động vật nghi mắc bệnh được mổ khám bằng cách rạch cơ hoành và cơ thành bụng phía phải giáp cột sống đến xoang chậu để quan sát xoang

bụng, dịch thể và bề mặt các cơ quan nội tạng. Các loại bệnh phẩm bao gồm nốt sần, u cục trên da và niêm mạc, hạch lympho, lách, phổi, u cục đường hô hấp, dịch khớp, dịch tiết mũi – miệng và máu tĩnh mạch cổ hoặc động mạch đùi. Mẫu được thu bằng dụng cụ vô trùng, bảo quản riêng biệt từng con, từng loại mẫu trong lọ chứa vô trùng, đặt trong thùng bảo ôn và vận chuyển ở nhiệt độ 2-8°C đến phòng thí nghiệm trong vòng 24 giờ; trường hợp bảo quản lâu hơn, mẫu được lưu giữ ở nhiệt độ đông băng (-20°C đến -80°C). Huyết thanh được giữ ở 4–8°C tối đa 7 ngày trước khi bảo quản dài hạn ở -20°C đến -80°C.

Động vật sau mổ khám được tiêu hủy bằng phương pháp chôn hoặc đốt, đồng thời toàn bộ dụng cụ, quần áo bảo hộ, phương tiện vận chuyển và môi trường xung quanh được tiêu độc khử trùng theo QCVN 01-41:2011. Đối với bệnh phẩm mô (hạch lympho, u cục, lách, phổi), mẫu được cắt nhỏ, nghiền trong dung dịch PBS vô trùng để tạo huyền dịch 10%, sau đó ly tâm 1.500 g trong 10 phút và thu dịch nổi. Các mẫu dịch tiết, máu và dịch khớp cũng được xử lý theo quy trình tương tự. Dịch nổi được sử dụng cho các xét nghiệm chẩn đoán vi rút LSD bằng real-time PCR và phân lập vi rút theo hướng dẫn của WOAHA (2021a).

3.5.3. Chẩn đoán sinh học phân tử

Phương pháp tách chiết DNA:

Quá trình tách chiết DNA được thực hiện bằng bộ kit QIAgen DNA Extraction theo hướng dẫn của nhà sản xuất với các bước như sau: Đầu tiên, 20 µL protease (proteinase K) được bổ sung vào ống eppendorf 1,5 mL. Tiếp theo, 200 µL mẫu bệnh phẩm (huyền dịch 10% phủ tạng, huyết thanh hoặc máu toàn phần) được thêm vào ống, sau đó thêm 200 µL Buffer AL và vortex trong 15 giây để đồng nhất hỗn hợp. Mẫu được ủ ở 56°C trong 10 phút để ly giải tế bào và giải phóng DNA và được ly tâm ngắn để thu dịch nổi. Ethanol 100% (200 µL) được thêm vào để kết tủa DNA, hỗn hợp được đảo nhẹ và ly tâm lại. Dịch nổi được chuyển sang cột tách chiết và ly tâm ở 8.000 rpm trong 1 phút để gắn DNA vào màng silica. Cột được rửa hai lần bằng Buffer AW1 và AW2 với các bước ly tâm tương ứng (8.000 rpm/1 phút và 14.000 rpm/3 phút) để loại bỏ tạp chất. Cuối cùng, DNA được rửa bằng 100–200 µL Buffer AE, được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút

và ly tâm để thu dịch chứa DNA tinh khiết. Mẫu DNA được bảo quản ở 4°C nếu sử dụng ngay hoặc ở -20°C để lưu trữ lâu dài.

Phương pháp real-time PCR phát hiện vi rút LSD:

Mỗi xuôi LSDV-F1 (5'-CAA AAA CAA TCG TAA CTA ATC CA-3'), mỗi ngược LSDV-R1 (5'-TGG AGT TTT TAT GTC ATC GTC-3') và Probe gắn huỳnh quang FAM (5'-FAM-TCG TCG TCG TTT AAA ACT GA-BHQ1-3') được sử dụng để khuếch đại đoạn gen đích (WOAH, 2021a). Phản ứng được thiết lập với 20 µl Master mix và 5 µl DNA mẫu, cùng với các đối chứng dương (DNA chuẩn vi rút LSD có giá trị Ct đã biết) và đối chứng âm (nước không chứa nuclease). Quy trình nhiệt gồm biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ gồm 95°C trong 15 giây và 60°C trong 60 giây. Kết quả được xác định dựa trên giá trị Ct, trong đó mẫu có Ct < 40 được coi là dương tính, trong khi mẫu không có tín hiệu là âm tính. Phản ứng chỉ được công nhận khi đối chứng dương cho giá trị Ct nằm trong khoảng mong đợi (± 2 Ct) và đối chứng âm không có tín hiệu. Các mẫu nghi ngờ cần được kiểm tra lại hoặc xác minh bằng phương pháp khác để đảm bảo độ chính xác.

Phương pháp PCR khuếch đại các gen p32, RPO30 và GPCR:

Trình tự mỗi khuếch đại 192pb của gen p32 (Ireland và Binopal, 1988)

5'-TTTCCTGATTTTTCTTACTAT-3'

5'-AAATTATATACG TAAATAAC3'

Trình tự các cặp mỗi khuếch đại toàn bộ gen p32, RPO30 và GPCR (Tran và cs, 2021; El-Bagoury và cs, 2023):

LSDV-P32-F 5'- CTA AAA TTA GAG AGC TAT ACT TCT T -3'

LSDV-P32-R 5'- CGA TTT CCA TAA ACT AAA GTA -3'

LSDV-RPO30-F 5'-CTC TGT TCC AAA CTA AAT CAT -3'

LSDV-RPO30-R 5'-TTT TTG TAT TAC CAA TTT CTG -3'

LSDV-GPCR-F 5'-TTA AgT AAA gCA TAA CTC CAA CAA AAA Tg -3'

LSDV-GPCR-R 5'-TTT TTT TAT TTT TTA TCC AAT gCT AAT ACT -3'

Hỗn hợp Master mix (22.5 µl) được cho vào ống PCR 0.2 ml, sau đó bổ sung 2.5 µl DNA mẫu (đối với mẫu thử), DNA dương chuẩn của vi rút LSD (đối chứng

duong) hoặc nước tinh khiết (đối chứng âm). Các ống PCR được đặt trong khay đá để duy trì nhiệt độ thấp trong suốt quá trình chuẩn bị, nhằm tránh phân hủy các thành phần phản ứng. Phản ứng PCR được chạy trên máy theo chu trình nhiệt phù hợp, bao gồm các bước biến tính, gắn mồi và kéo dài.

Sau khi hoàn thành PCR, sản phẩm được điện di trên gel agarose 2% trong đệm TAE (Tris-acetate-EDTA) ở điện thế 100V trong 30 phút. Gel sau đó được nhuộm bằng Ethidium Bromide trong 10 phút và quan sát dưới đèn UV (Ultraviolet). Kết quả được xác định dựa trên sự xuất hiện của băng DNA: mẫu dương tính sẽ cho một băng sáng duy nhất ở vị trí 192 bp, tương ứng với kích thước đoạn DNA đích của vi rút LSD. Phản ứng được công nhận khi đối chứng dương hiển thị băng rõ ràng tại vị trí 192 bp, và đối chứng âm không có băng. Trường hợp mẫu nghi ngờ (băng mờ), cần lặp lại phản ứng hoặc sử dụng phương pháp xác minh khác.

Phản ứng PCR nhân gen sử dụng bộ kit GoTaq Green 2X Master Mix (Promega, Hoa Kỳ) với cặp mồi nhân các gen chỉ báo (genetics marker) là p32, RPO30 và GPCR gens cho vi rút gây bệnh VDNC với sản phẩm PCR lần lượt là 390 bp, 1.3kb và 1.1kb. Chu trình nhiệt được thực hiện theo các công bố trước đây (Agianniotaki và cs, 2017; Agianniotaki EI và cs, 2017; Sprygin và cs 2018; Sprygin và cs, 2019; WOA, 2021a; Sudhakar và cs, 2023). Sản phẩm PCR được điện di trên Agarose 2% và hiển thị trên đèn UV.

3.5.4. Giải trình tự và phân tích di truyền

Sản phẩm PCR (40 µl) được điện di trên gel agarose 1.5% trong đệm TAE 1x, cùng với mẫu đối chứng dương và DNA ladder (7 µl). Quá trình điện di được thực hiện ở 100 V trong 30 phút. Sau đó, gel được nhuộm với Ethidium Bromide (10 phút) và quan sát dưới đèn UV để xác định vị trí băng DNA mong muốn.

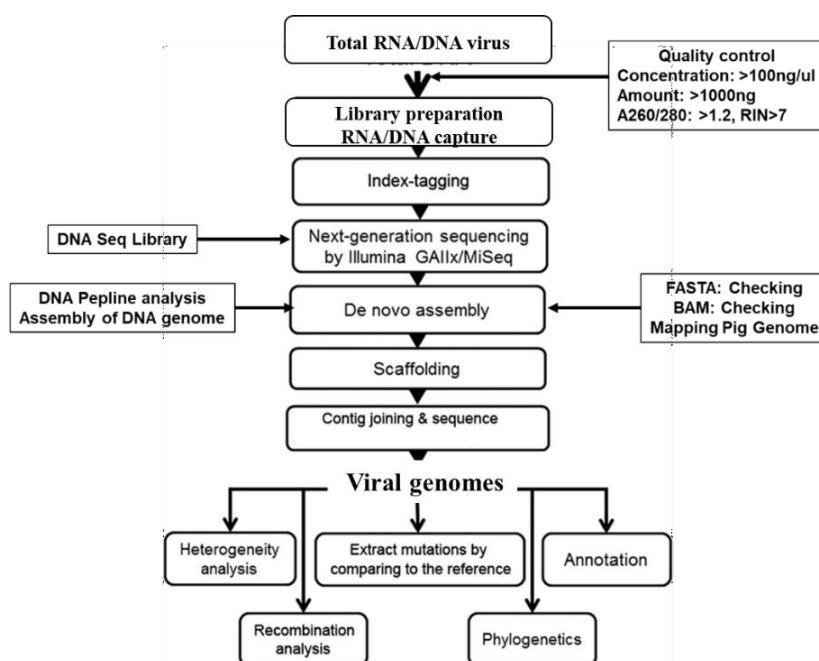
Băng DNA dương tính được cắt khỏi gel và cân để xác định khối lượng. Gel được hòa tan trong QG buffer (tỉ lệ 1:3 so với khối lượng gel) và ủ ở 55°C trong 10 phút, đồng thời trộn đều mỗi 3 phút. Sau khi gel tan hoàn toàn, 1 thể tích còn 99% được thêm vào, hỗn hợp vortex trong 10 giây rồi chuyển sang cột lọc. DNA được gắn vào màng silica bằng cách ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 1 phút. Cột

được rửa hai lần: đầu tiên với 500 µl QG buffer, sau đó với 750 µl PE buffer, mỗi lần ly tâm 1 phút ở 13.000 vòng/phút. Để loại bỏ hoàn toàn dung dịch rửa, cột được ly tâm thêm 1 phút. Cuối cùng, DNA được rửa bằng 30 µl nước không chứa DNase, ủ ở nhiệt độ phòng 1 phút trước khi ly tâm thu dịch chứa DNA

Nồng độ DNA được xác định bằng máy NanoDrop, đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm và 280 nm. Chỉ số A260/A280 trong khoảng 1.8–2.0 cho thấy DNA sạch, không nhiễm protein hoặc tạp chất. Sau khi tinh sạch, DNA của vi rút LSD được giải trình tự bằng phương pháp Sanger tại công ty 1st Base (Malaysia).

Việc tách chiết DNA phục vụ cho giải trình tự toàn bộ đoạn gen sử dụng kit QIAGEN DNA Extraction Kit (QIAGEN) theo hướng dẫn của nhà sản xuất được mô tả tại mục (2.5.3). Yêu cầu DNA vi rút LSD cần phải đạt nồng độ tối thiểu là 50 ng/µL, thể tích tối thiểu là 30 µL, và độ tinh khiết với OD 260/280 = 1.8 – 2.0. DNA vi rút chạy trên agarose gel không đứt đoạn, không tạp và chỉ cho 1 băng duy nhất.

Để giải trình tự toàn bộ genome của vi rút, sử dụng phương pháp Next Generation Sequencing (NGS) theo sơ đồ dưới đây:



Hình 3.2. Các bước thực hiện giải trình tự toàn bộ genome vi rút

Dữ liệu trình tự thu được sẽ được phân tích dựa trên cơ sở dữ liệu công bố trên Ngân hàng gen NCBI (GenBank), sử dụng công cụ BLAST (Basic Local

Alignment Search Tool) để xác định mức độ tương đồng với các chủng vi rút LSD đã được báo cáo trước đó. Quá trình phân tích chi tiết được thực hiện bằng các phần mềm chuyên dụng sau:

- BioEdit và FinchTV được sử dụng để kiểm tra chất lượng trình tự, hiệu chỉnh lỗi, và xác định các vị trí đột biến.

- DNASTar (Lasergen) hỗ trợ so sánh sự tương đồng và khác biệt giữa các chủng VDNC phân lập tại Việt Nam với các chủng tham chiếu trên thế giới.

- Phần mềm MEGA7 dùng để phân tích cây phát sinh, phá hệ các chủng vi rút LSD đang lưu hành tại Việt Nam bằng phương pháp Neighbor-Joining với giá trị bootstrap 1000 lần lặp.

3.5.5. Phương pháp nuôi cấy tế bào và phân lập vi rút

Tế bào MDBK được bảo quản trong nitơ lỏng (-196°C) được giải đông nhanh trong nước ấm 37°C trong 2 phút nhằm hạn chế tổn thương tế bào do hình thành tinh thể đá. Sau khi giải đông, hỗn dịch tế bào được chuyển vào ống ly tâm 15 mL chứa sẵn 5 mL môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) để pha loãng chất bảo quản. Hỗn hợp sau đó được ly tâm ở 1000 vòng/phút trong 10 phút để thu cặn tế bào, đồng thời loại bỏ dịch nổi chứa glycerol hoặc DMSO (Dimethyl sulfoxide). Cặn tế bào được hồi sinh trong 1 mL môi trường DMEM có bổ sung kháng sinh, kháng nấm và 10% huyết thanh bào thai bê (Fetal Bovine Serum - FBS) nhằm tăng cường khả năng bám dính và phục hồi. Hỗn dịch tế bào sau đó được chuyển vào chai nuôi T25 với tổng thể tích môi trường 6 mL và ủ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ để duy trì pH ổn định. Quá trình nuôi cấy được theo dõi hàng ngày bằng kính hiển vi để đánh giá khả năng bám dính, hình thái tế bào và mật độ tăng trưởng, từ đó xác định thời điểm thay môi trường hoặc cấy chuyển thích hợp (Fay và cs, 2020).

Quá trình cấy chuyển tế bào MDBK được thực hiện khi tế bào đạt độ phủ khoảng 90% bề mặt đáy chai nuôi, theo các bước sau: Đầu tiên, môi trường nuôi cấy cũ được loại bỏ hoàn toàn và bề mặt tế bào được rửa sạch bằng PBS 1X để loại bỏ các thành phần còn sót lại. Tiếp theo, bổ sung 1ml dung dịch trypsin vào chai nuôi T25, trải đều trên bề mặt và ủ ở 37°C trong 4 phút để tách tế bào khỏi bề mặt.

Khi tế bào co tròn và bong ra, tiến hành vỗ nhẹ chai để thu nhận tế bào. Dung dịch tế bào sau đó được trung hòa bằng 5ml môi trường DMEM có bổ sung huyết thanh, sau đó chuyển toàn bộ hỗn dịch vào ống ly tâm. Ly tâm ở tốc độ phù hợp để thu chặn tế bào, phần dịch nổi được loại bỏ. Chặn tế bào được hòa tan trong môi trường nuôi cấy mới và phân bổ đều vào các chai nuôi T25 mới với tỷ lệ pha loãng thích hợp. Cuối cùng, các chai nuôi được đưa vào tủ ấm duy trì ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ và theo dõi hàng ngày bằng kính hiển vi để đánh giá sự phát triển và hình thái tế bào (Fay và cs, 2020).

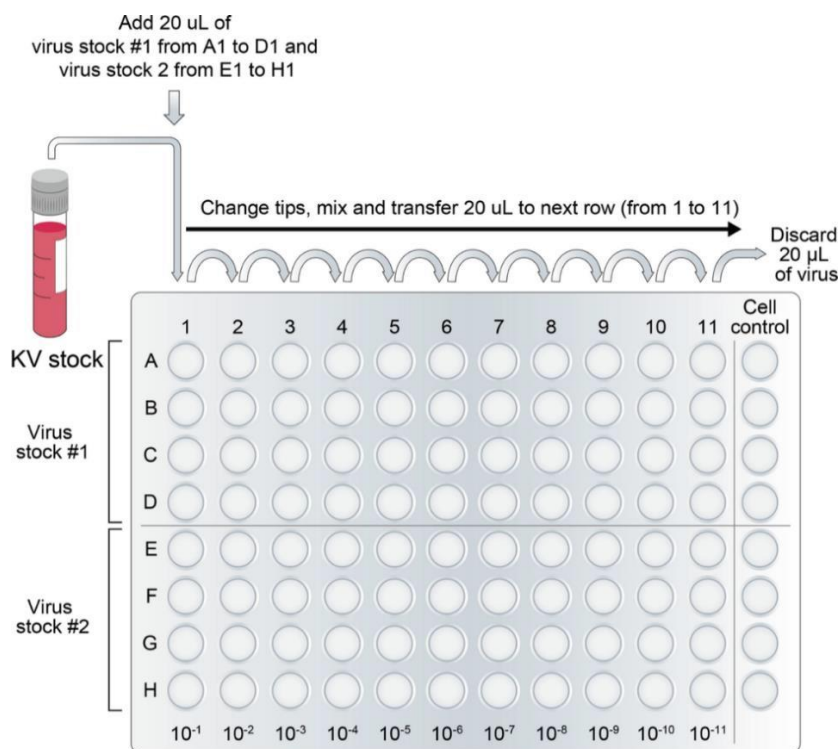
Ban đầu, vi rút LSD được pha loãng 1/10 trong môi trường DMEM không bổ sung huyết thanh. Hỗn dịch vi rút sau đó được bổ sung vào lớp tế bào MDBK đã phát triển ổn định và ủ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ trong 18-24 giờ để vi rút xâm nhập tế bào. Sau thời gian ủ, môi trường chứa vi rút được loại bỏ hoàn toàn và bề mặt tế bào được rửa 2-3 lần bằng PBS 1X để loại bỏ vi rút không bám dính. Tiếp theo, bổ sung môi trường DMEM mới chứa 5% FBS và tiếp tục nuôi ủ trong 5 ngày ở điều kiện tương tự. Quá trình gây nhiễm được theo dõi hàng ngày bằng kính hiển vi để quan sát hiệu ứng tế bào (CPE) đặc trưng. Dịch nổi chứa vi rút được thu hoạch khi xuất hiện CPE rõ rệt và bảo quản ở -80°C hoặc trong nitơ lỏng để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo (Fay và cs, 2020).

Tế bào MDBK được chuẩn bị ở dạng huyền dịch trong môi trường DMEM bổ sung 5% huyết thanh bào thai bê (FBS), với mật độ 5×10^6 tế bào/ml, sau đó nuôi ủ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ trong 1–2 ngày cho đến khi hình thành lớp tế bào đơn (monolayer). Tiếp theo, tế bào được gây nhiễm với 200 µl dịch vi rút LSD và ủ trong 18–20 giờ ở cùng điều kiện. Sau thời gian này, thêm 5–6 ml môi trường DMEM chứa 5% FBS và tiếp tục nuôi trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂. Quá trình theo dõi hiệu ứng tế bào (CPE) được thực hiện hàng ngày trong 5–7 ngày. Mẫu được coi là dương tính khi xuất hiện CPE đặc trưng với các tế bào co cụm, chòong đứng lên nhau, trong khi mẫu đối chứng âm tính duy trì lớp tế bào phẳng mịn, không có dấu hiệu bệnh lý. Khi bệnh tích tế bào chiếm 80–90% diện tích đáy giếng hoặc bình nuôi, vi rút được thu bằng phương pháp đông–tan ba lần trong tủ lạnh âm sâu

-86°C. Sau khi đông tan, thu dịch nuôi cấy vào ống và bảo quản ở -80°C để phục vụ các nghiên cứu tiếp theo.

3.5.6. Định lượng và xác định đặc tính sinh học của vi rút (*In-vitro*)

Quy trình xác định hiệu giá vi rút LSD được thực hiện thông qua phương pháp TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infective Dose) trên dòng tế bào MDBK (Kumar và cs, 2021) nuôi cấy trong đĩa 96 giếng. Vi rút sau khi phân lập từ mẫu bệnh phẩm dương tính và cấy chuyển qua nhiều đời được pha loãng nối tiếp cơ số 10 trong môi trường DMEM. Dịch vi rút sau pha loãng được gậy nhiễm lên lớp tế bào MDBK đã được chuẩn bị trước đó. Sau 2 giờ hấp phụ, môi trường nhiễm vi rút được loại bỏ và thay bằng môi trường nuôi cấy mới, sau đó ủ ở điều kiện 37°C với 5% CO₂. Hiện tượng bệnh tích tế bào (CPE) được theo dõi hàng ngày trong vòng 4–5 ngày.



Hình 3.3. Sơ đồ phương pháp TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infective Dose)

Giá trị TCID₅₀ được tính toán dựa trên phương pháp Spearman-Kärber, trong đó xác định độ pha loãng cao nhất mà tại đó 100% giếng nhiễm thể hiện CPE (x_0), hệ số pha loãng (d), và tỷ lệ giếng dương tính ở từng nồng độ pha loãng (r_i/n_i). Kết quả thu được biểu thị dưới dạng $\log_{10}TCID_{50}/ml$, phản ánh hiệu giá vi rút cần

thiết để gây nhiễm thành công 50% tế bào. Giá trị này được tính theo phương pháp Spearman-Kärber.

Công thức tính TCID₅₀ bằng phương pháp Spearman-Kärber:

$$\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50} = - \left(x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r_i}{n_i} \right)$$

Trong đó:

x_0 = log₁₀ nghịch đảo của độ pha loãng cao nhất (nồng độ thấp nhất) mà tại đó tất cả các giếng có bệnh tính tế bào đều dương tính;

d = log₁₀ của hệ số pha loãng;

n_i = số lượng bệnh tích tế bào được sử dụng trong mỗi giếng pha loãng;

r_i = số lượng giếng dương tính (trong số n_i).

Xác định đường cong sinh trưởng của vi rút:

Tế bào dòng MDBK được nuôi cấy trong môi trường Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM- Invitrogen, Hoa Kỳ) chứa 100 IU/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 1 µg/mL fungizone (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) và bổ sung 5% huyết thanh bào thai bê (Invitrogen, Hoa Kỳ) đã được xử lý nhiệt trong môi trường 5% CO₂ ở 37°C. Đường cong sinh trưởng của vi rút LSD phân lập được xây dựng trên dòng tế bào MDBK. Tế bào MDBK được chuẩn bị dưới dạng đơn lớp trong chai nuôi cấy tế bào T25 cm² và được kiểm tra bằng kính hiển vi đảo ngược để đạt mật độ 80-90% tế bào chuẩn bám đáy. Chai nuôi cấy tế bào được cấy chuyển 3 lần với chủng vi rút LSDV/Vietnam/Langson/LS16 và LSDV/Vietnam/Nghean/NA06. Ba chai nuôi cấy tế bào này được lấy ra vào các khoảng thời gian 12, 24, 48, 72, 96 và 120 giờ sau khi gây nhiễm (hpi) và được giữ ở -80°C cho đến khi chuẩn độ. Các chai nuôi cấy tế bào tại các thời điểm lấy ra được đông lạnh và rã đông 3 lần và lượng vi rút thu được chuẩn độ bằng phương pháp TCID₅₀/mL theo hướng dẫn của WOA. Hiệu giá vi rút được tính trung bình lượng vi rút tại các thời điểm khác nhau.

Sau 72 giờ gây nhiễm vi rút gây bệnh VDNC, các tế bào MDBK được lấy ra khỏi bình nuôi cấy bằng dụng cụ cạo tế bào và sau đó ly tâm ở 3,000 vòng/phút trong 5 phút. Tế bào được huyền phù lại và cố định bằng glutaraldehyde 2,5%

trong dung dịch đệm cacodylate 0,1 M (pH 7,2) và được giữ qua đêm ở 4°C. Sau đó, các căn tế bào được rửa bằng dung dịch đệm cacodylate 0,1 M (pH 7,2) từ 4 đến 5 lần. Các tế bào cuối cùng được cố định bằng dung dịch OsO₄ (Osmi tetroxide) 1% trong cùng dung dịch đệm trong vòng 60 phút, sau đó được rửa lại bằng dung dịch đệm cacodylate (pH 7,2) từ 4 đến 5 lần. Các tế bào này sau đó lần lượt được khử nước bằng ethanol (50-100%), rửa bằng propylene oxide và được ngâm trong hỗn hợp dung dịch propylene oxide và epoxy với tỷ lệ 1:1. Tế bào sau đó được nhúng trong hóa học tổng hợp có độ nhớt cao (resin), trước khi được đưa ra cắt bằng máy cắt siêu vi ultramicrotome (UltracutUC6; Leica Microsystems GmbH, Germany) thành các phần siêu mỏng. Các phần này được nhuộm bằng uranyl acetate và chì citrate. Các lát siêu mỏng được quan sát dưới kính hiển vi điện tử ở điện áp 80 kV. Thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm Siêu Cấu Trúc, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

3.5.7. Xét nghiệm miễn dịch học và huyết thanh học

Phản ứng trung hòa vi rút:

Phản ứng VNT được thực hiện trên dòng tế bào MDBK để phát hiện kháng thể trung hòa đặc hiệu với vi rút LSD (Krešić và cs, 2020). Tế bào dòng MDBK được nuôi cấy trong môi trường DMEM bổ sung 5% FBS cho đến khi đạt 90–100% độ phủ đáy để sử dụng cho thí nghiệm. Huyết thanh được bất hoạt ở 56°C trong 30 phút và pha loãng theo cơ số 10, sau đó trộn với lượng vi rút chuẩn tương ứng 100 TCID₅₀ và ủ ở 37°C trong 1 giờ. Hỗn hợp huyết thanh – vi rút được nhỏ lên lớp tế bào MDBK và nuôi ủ ở 37°C, 5% CO₂, theo dõi sự xuất hiện bệnh tích tế bào (CPE) trong 5–7 ngày. Hiệu giá kháng thể trung hòa được xác định là độ pha loãng cao nhất của huyết thanh ngăn cản hoàn toàn sự xuất hiện CPE.

Phương pháp ELISA:

Kháng thể kháng vi rút LSD trong huyết thanh trâu bò được phát hiện bằng phương pháp ELISA sử dụng bộ kit thương mại ID Screen® Capripox Double Antigen Multi-species (ID-VET, Montpellier, Pháp). Thí nghiệm được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kết quả được đọc ở bước sóng 450 nm bằng máy

đọc ELISA, và được xác định là dương tính với kháng thể kháng vi rút LSD khi chỉ số S/P% $\geq 30\%$; nếu chỉ số S/P% $< 30\%$ thì mẫu được coi là âm tính.

3.5.8. Phương pháp gây nhiễm vi rút LSD trên động vật (*In-vivo*)

Động vật thí nghiệm: Tổng số 12 con bê khỏe mạnh, từ 4–6 tháng tuổi, có cùng nguồn gốc (bò vàng), thể trạng và độ tuổi được lựa chọn và chia ngẫu nhiên thành 4 lô, mỗi lô gồm 3 con. Trước khi thí nghiệm, tất cả bê đều được kiểm tra và xác nhận không có kháng thể kháng vi rút LSD và âm tính với vi rút LSD và không có triệu chứng của các bệnh phổ biến ở bò như Lở mồm long móng (FMDV), tiêu chảy ở bò (BVD), Tụ huyết trùng (*Pasteurella multocida*) và Lao bò (*Mycobacterium spp.*). Bê ở các lô thí nghiệm được gây nhiễm vi rút LSD bằng phương pháp tiêm bắp tại vùng cổ (Wolff và cs, 2020) với các liều gây nhiễm lần lượt là 10^6 TCID₅₀/mL (lô 1), $10^{6.5}$ TCID₅₀/mL (lô 2), và 10^7 TCID₅₀/mL (lô 3). Lô đối chứng gồm 3 con bê không được gây nhiễm, chỉ tiêm dung môi tương ứng. Theo dõi triệu chứng lâm sàng được thực hiện hàng ngày trên toàn bộ bê thí nghiệm, bao gồm đo thân nhiệt, quan sát triệu chứng đặc trưng và ghi nhận sự xuất hiện các nốt sần trên da. Tiêu chí đánh giá các triệu chứng lâm sàng được thể hiện ở bảng 3.2

Các mẫu bệnh phẩm gồm nước bọt, dịch mũi họng được thu thập định kỳ hàng ngày, mẫu máu toàn phần và huyết thanh được thu thập vào các ngày 1, 3, 5, 7, 10, 14 và 21 sau gây nhiễm. Quy trình mổ khám theo tiêu chuẩn quốc gia (TCVN 8402:2010). Các bệnh tích đại thể được ghi nhận chi tiết, đồng thời thu thập mẫu mô từ các cơ quan tổn thương. Công tác vệ sinh và tiêu hủy tuân theo quy định (QCVN 01-41:2011). Mẫu bệnh phẩm được bảo quản trong điều kiện tối ưu: vận chuyển ở 2-8°C, bảo quản ngắn hạn ở 4-8°C và lưu trữ dài hạn ở -20°C đến -80°C. Sự có mặt của vi rút LSD trong cơ thể động vật thí nghiệm được xác định bằng kỹ thuật real-time PCR như mô tả ở trên.

Bảng 3.2. Bảng các chỉ tiêu đánh giá triệu chứng lâm sàng

Nhóm đánh giá	Triệu chứng	Điểm
Tình trạng chung	Không đáng chú ý	0
	Giảm hoạt động	1
	Giảm hoạt động, trầm cảm	2
	Tăng nghỉ ngơi, giảm hoạt động rõ rệt	3
	Lơ đễnh và/hoặc nằm nghiêng, không phản ứng với các kích thích	Hủy
Tiêu thụ thức ăn và nước uống	Không đáng chú ý	0
	Giảm lượng thức ăn hoặc nước uống, tăng tiết nước bọt	1
	Giảm lượng thức ăn hoặc nước uống rõ rệt	2
	Không ăn hoặc uống (1 ngày)	3
	Không ăn hoặc uống (2 ngày)	Hủy
Tình trạng hô hấp	Không đáng chú ý	0
	Ho nhẹ hoặc chảy nước mũi	1
	Ho mạnh hoặc chảy nước mũi kết hợp với các vấn đề về hô hấp nhẹ	2
	Ho mạnh hoặc chảy nước mũi kết hợp với vấn đề về hô hấp vừa phải	3
	Ho mạnh hoặc chảy nước mũi kết hợp với các vấn đề về hô hấp mạnh	Hủy
Biểu hiện trên da	Không đáng chú ý	0
	Các nốt/tổn thương/sẩn da rải rác	1
	Nhiều nốt/tổn thương/sẩn da	2
	Các tổn thương/nốt/sẩn da lan tỏa	3
	Nhiều ổ áp xe hoặc đờm	Hủy
Các triệu chứng khác	Chảy nước mắt	1
	Sung hạch bạch huyết rải rác	1
	Sung nhiều hạch bạch huyết	2

Ghi chú: điểm 0 (-); 1-5 điểm (+); 6-9 điểm (++); 10-13 điểm (+++); >13 điểm (Hủy).

3.5.9. Phương pháp đánh giá đáp ứng miễn dịch của vật chủ

Tổng số RNA được phân lập từ tế bào hoặc máu sử dụng TRIzol® (Invitrogen, CA, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tổng hợp cDNA được thực hiện bằng cách xử lý 2 µg RNA với 1.0 đơn vị DNase I và 1.0 µL dung dịch đệm phản ứng 10× (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Hoa Kỳ), sau đó được ủ ở 37°C trong vòng 30 phút. Tiếp theo, thêm 1.0 µL EDTA 50 mM để vô hoạt DNase I, trộn vào và làm nóng ở nhiệt độ 65°C trong vòng 10 phút. Việc sao chép ngược RNA được thực hiện bằng cách sử dụng kit tổng hợp cDNA (Maxima First Strand Synthesis-Thermo Fisher Scientific) theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Bảng 3.3. Trình tự cặp môi oligonucleotide phản ứng real-time RT-PCR

Gen		Primer sequence (5'–3')	Annealing (°C)	References
IL-6	Forward	TCC AGA ACG AGT ATG AGG	52	(Konnai và cs, 2003; Zaros và cs, 2007)
	Reverse	CAT CCG AAT AGC TCT CAG		
IL-10	Forward	TGC TGG ATG ACT TTA AGG G	56	
	Reverse	AGG GCA GAA AGC GAT GAC A		
IFN- γ	Forward	GCCAAATTGTCTCCTTCTACTTC	60	
	Reverse	GGGTCAAGTGAAATAGTCACAGG		
TNF- α	Forward	TAACAAGCCGGTAGCCCACG	57	
	Reverse	TCTTGATGGCAGACAGGATG		
RPL-19	Forward	GAAATCGCCAATGCCAAC	50-60	
	Reverse	GAGCCTTGTCTGCCTTCA		
IL-1 α	Forward	TTGGTG CACATG GCAAGT G	60	(Coussens và cs, 2004)
	Reverse	GCACAG TCAAGG CTATTT TTCCA		
TGF β 1	Forward	CTGAGC CAGAGG CGGACT AC	60	
	Reverse	TGCCGT ATTCCA CCATTA GCA		

Để xác định mức độ đáp ứng miễn dịch của của các gen mục tiêu, các cặp môi liệt kê trong Bảng 3.3 đã được sử dụng (Konnai và cs, 2003; Zaros. và cs, 2007) trong phản ứng qRT-PCR bằng cách sử dụng 2×Ampigen SYBR® Green Master Mix (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của

nhà sản xuất trên hệ thống real-Time PCR QuantStudio 5 (Thermo Scientific, Waltham, MA, Hoa Kỳ). Thêm vào đó, protein ribosome của bò (RP) L-19 (RP-L19) cũng được sử dụng làm gen kiểm soát nội bộ để bình thường hóa số lượng RNA. Mức độ đáp ứng miễn dịch của các gen nói trên được tính toán bằng phương pháp $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sau khi chuẩn hóa thành mức đáp ứng RP-L19 (Ribosomal protein L19) (Livak và Schmittgen, 2001).

3.5.10. Phương pháp đánh giá hiệu quả chất sát trùng

Nghiên cứu này đánh giá khả năng tiêu diệt và ức chế sự nhân lên của vi rút LSD. Các chất sát trùng được sử dụng theo khuyến cáo của Tổ chức Thú y Thế giới (WOAH). Chủng vi rút được sử dụng là LSDV/Vietnam/Nghean/NA06 được phân lập tại thực địa ở tỉnh Nghệ An, với liều gây nhiễm 1×10^6 TCID₅₀/mL. Các chất sát trùng bao gồm: Sodium dodecyl sulfate 0,8%, Iodine 3%, Formalin 1%, Chloroform 5%, Ether 20%, Phenol 2%, NaOH 3%, hợp chất Amoni bậc bốn (Ammonium) 0,5% và Virkon 2%. Thí nghiệm được chia thành ba nhóm chính: (1) nhóm đối chứng dương chỉ chứa vi rút LSD; (2) nhóm đối chứng âm sử dụng nước tinh khiết đã được xác nhận âm tính với vi rút LSD và (3) nhóm xử lý gồm các mẫu vi rút được xử lý với từng chất sát trùng tại ba mốc thời gian là 30 phút, 60 phút và 180 phút. Sau thời gian xử lý, tiến hành chuẩn độ lại để xác định sự tồn tại của vi rút sau xử lý. Mỗi thí nghiệm được thực hiện ba lần để đảm bảo độ tin cậy và tính lặp lại của kết quả.

3.5.11. Phân tích dữ liệu và thống kê

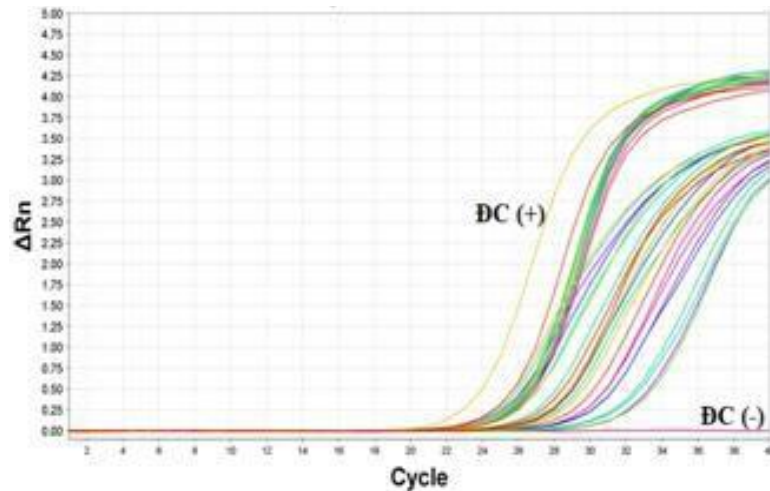
Tất cả các dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm SEM của ít nhất năm lần lặp lại. Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm IBM SPSS (SPSS 25.0 Windows; IBM, Chicago, IL, Hoa Kỳ). Giá trị $P < 0.05$ là giá trị có ý nghĩa của thống kê. Sự khác biệt giữa các nhóm được phân tích bằng phương pháp so sánh nhiều lần của Duncan (Duncan's multiple comparison method).

PHẦN 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Nghiên cứu xác định sự có mặt của vi rút LSD lưu hành tại vùng Bắc Trung Bộ

4.1.1. Kết quả thu thập và xác định mẫu dương tính với vi rút LSD

Trong nghiên cứu này, mẫu bệnh phẩm được thu thập và hồi cứu trong thời gian từ năm 2021 đến năm 2024. Các mẫu bệnh phẩm là máu kháng đông, dịch mũi, dịch miệng, các nốt sần, u cục trên da, miệng hoặc phủ tạng (hạch, lách, u cục trong đường hô hấp, phổi, dịch khớp...) được lấy từ trâu, bò nghi mắc VDNC và được xét nghiệm bằng phương pháp real-time PCR theo khuyến cáo của WOAH để xác định sự có mặt của DNA vi rút LSD trên trâu, bò. Tổng hợp số lượng mẫu thu thập được và mẫu dương tính được trình bày tại Hình 4.1 và bảng 4.1.



Hình 4.1. Kết quả xác định sự có mặt của DNA vi rút gây bệnh VDNC bằng phương pháp real-time PCR

Ghi chú: DC+: Đối chứng dương; DC- Đối chứng âm

Kết quả xét nghiệm bằng real-time PCR cho thấy có 100% (200/200) mẫu bệnh phẩm dương tính với vi rút gây bệnh VDNC thu thập tại các tỉnh Bắc Trung Bộ của Việt Nam. Kết quả này khẳng định sự hiện của vi rút LSD trong quần thể gia súc nghi nhiễm ở các tỉnh vùng Bắc Trung Bộ giai đoạn 2021-2024. Từ năm 2021, việc triển khai tiêm phòng vắc xin trên diện rộng đã góp phần kiểm soát hiệu quả dịch bệnh. Tuy nhiên, năm 2024 xuất hiện một số ổ dịch tại Quảng Bình, cho thấy vi rút LSD vẫn còn lưu hành trong đàn vật nuôi của vùng Bắc Trung Bộ, cần phải tiếp tục giám sát bệnh hàng năm nhằm ngăn chặn sự bùng phát dịch trở lại.

Bảng 4.1. Kết quả thu thập, hồi cứu và chẩn đoán các mẫu bệnh phẩm nghi mắc bệnh VDNC do vi rút LSD gây ra tại khu vực Bắc Trung Bộ

Tỉnh	Năm lấy mẫu	Số lượng mẫu thu thập	Real time-PCR (+)
Thanh Hóa	2021	41	41
Nghệ An	2021	88	88
	2022	4	4
Hà Tĩnh	2021	17	17
	2023	2	2
	2024	10	10
Quảng Bình	2021	12	12
	2023	11	11
	2024	2	2
Quảng Trị	2021	4	4
	2023	2	2
Thừa Thiên Huế	2021	4	4
	2023	3	3
Tổng		200	200

4.1.2. Kết quả xác định giá trị Ct (Cycle threshold) đối với các loại mẫu bằng phương pháp real-time PCR

Mẫu bệnh phẩm (200 mẫu) được phân loại thành 4 nhóm: mẫu vảy, u cục; mẫu dịch mũi, miệng; mẫu máu và mẫu khác (phủ tạng, dịch khớp...). Kết quả giá trị Ct đối với từng loại mẫu được thể hiện ở bảng 4.2.

Bảng 4.2. Giá trị Ct của các loại mẫu bằng phương pháp real-time PCR

Loại mẫu	Số lượng mẫu	Chỉ số Ct trung bình	Khoảng tin cậy (95.0% CI)
Vảy, u cục	76	17,4	(15,6 – 19,2)
Dịch mũi, xoang miệng	50	25,4	(22,3 – 28,5)
Máu	63	32,7	(30,6 – 34,8)
Khác	11	26,7	(22,5 – 30,9)

Kết quả ở Bảng 4.2 cho thấy sự khác biệt rõ rệt về giá trị Ct trung bình giữa các loại mẫu xét nghiệm bằng phương pháp real-time PCR. Trong đó, mẫu vảy, u cục có giá Ct trung bình thấp nhất (17,4) với khoảng tin cậy hẹp (15,6–19,2), phản ánh lượng vi rút cao và độ ổn định trong kết quả nhờ cỡ mẫu lớn (76 mẫu). Ngược lại, mẫu máu có giá trị Ct trung bình cao nhất (32,7) dù khoảng tin cậy hẹp (30,6–34,8), cho thấy lượng vi rút rất thấp hoặc có thể do vi rút không tồn tại lâu trong máu hoặc khó tách chiết. Dịch mũi, xoang miệng có giá trị Ct trung bình 25,4, nằm trong khoảng tin cậy rộng (22,3–28,5), thể hiện sự dao động tương đối lớn về lượng vi rút. Mặc dù nhóm "Khác" bao gồm các mẫu từ phủ tạng, dịch ổ khớp có giá trị Ct là 26,7 với khoảng tin cậy rất rộng (22,5–30,9). Điều này có thể do cỡ mẫu quá nhỏ và từ các loại mẫu có hàm lượng vi rút khác nhau. Từ kết quả trên, có thể kết luận rằng mẫu vảy, u cục là lựa chọn ưu tiên để xét nghiệm phát hiện sự có mặt của vi rút gây bệnh VDNC trên thực địa.

Kết quả này tương đồng với khuyến cáo của WOAHA, trong đó mẫu dùng để phát hiện sự có mặt của vi rút và để nuôi cấy phân lập nên được thu thập từ các nốt sần trên da. Các mẫu để phân lập vi rút nên được thu thập tốt nhất trong tuần đầu tiên sau khi xuất hiện các dấu hiệu lâm sàng. Tuy nhiên, vi rút có thể được phân lập từ các nốt sần trên da trong ít nhất 3–4 tuần sau đó (WOAHA, 2021a). So sánh với một số nghiên cứu khác, cho thấy kết quả về tỷ lệ phát hiện vi rút LSD trong các mẫu bệnh phẩm tương tự như trong nghiên cứu này. Van Schalkwyk và cs (2022a) khi xét nghiệm 1166 mẫu có 1038 mẫu dương tính với vi rút LSD trong đó mẫu da dương tính 96,86%, mẫu dịch mũi 86,69%, mẫu máu là 83,79%.. Tuy nhiên, ở một số nghiên cứu khác tỷ lệ dương tính ở mẫu máu và mẫu dịch mũi tương đối thấp. Trong nghiên cứu của Sameea Yousefi và cs (2018) mẫu máu dương tính chỉ chiếm 34,1% (80/243) và 40% (42/106) trong nghiên cứu Zeynalova và cs (2016). Đặc biệt tỷ lệ dương tính ở mẫu dịch mũi và mẫu máu trong nghiên cứu của Li và cs (2022) thấp hơn hẳn so với các nghiên cứu khác khi mẫu máu chỉ có 4,23% (51/1206), mẫu dịch mũi có 48,09% (580/1206) mẫu dương tính. Ngược lại, mẫu vảy da có tỷ lệ dương tính cao nhất chiếm 98,59% (350/355). Lý do mẫu máu có tỷ lệ dương tính thấp hơn mẫu dịch mũi và mẫu u cục da là do vi rút LSD chỉ tồn

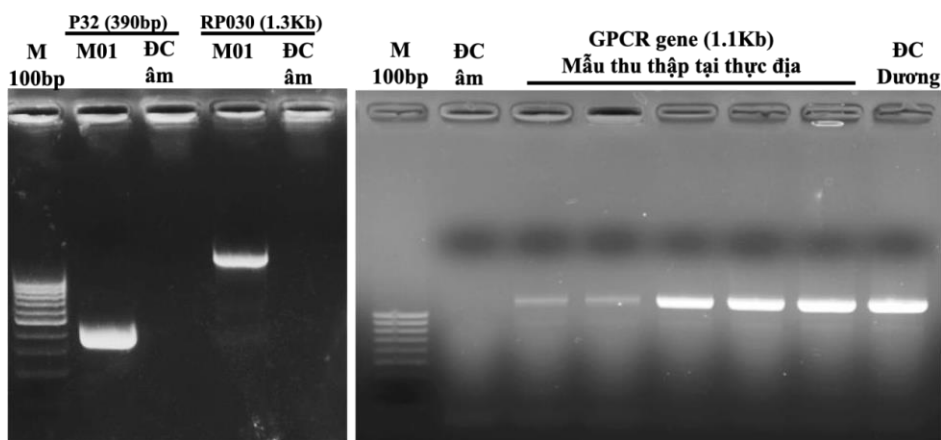
tại trong máu trong thời gian ngắn 4–11 ngày, trong khi vi rút có thể được phát hiện trong các tổn thương da lên đến 92 ngày sau khi nhiễm bệnh (Tuppurainen và cs, 2005). Tỷ lệ phát hiện dương tính trung bình ở vảy có thể đạt 100% điều đó cho thấy rằng mẫu vảy đóng vai trò chủ đạo trong việc chẩn đoán phát hiện vi rút LSD. Tuy nhiên, một thực tế không thể chối cãi là một khi các triệu chứng vảy được tìm thấy trong đàn thường chỉ ra rằng đàn đã bị nhiễm vi rút LSD trong một khoảng thời gian, do đó các triệu chứng vảy là một cơ sở quan trọng để người chăn nuôi đánh giá tình trạng sức khỏe của gia súc ở giai đoạn đầu. Mẫu dịch miệng và mũi có thể được lấy dễ dàng bằng một thao tác đơn giản, toàn bộ quá trình thu thập không xâm lấn đến gia súc, do đó, tác hại đối với động vật gần như có thể được bỏ qua. Trường hợp bò trông khỏe mạnh, ở giai đoạn đầu của nhiễm bệnh chưa biểu hiện triệu chứng lâm sàng nhưng vi rút đã được thải ra tại các vị trí niêm mạc trong cơ thể sống. Mặc dù tỷ lệ phát hiện ở dịch mũi thấp không cản trở việc lấy mẫu dịch mũi cần thiết trong việc xác định vi rút vì chúng có thể được thu thập ở giai đoạn rất sớm để theo dõi dịch bệnh VDNC.

4.2. Kết quả nghiên cứu đặc tính sinh học phân tử của các chủng vi rút gây bệnh viêm da nổi cục đang lưu hành tại khu vực Bắc Trung Bộ

4.2.1. Kết quả xác định kiểu gen của vi rút LSD từ mẫu thực địa

Trong nghiên cứu này, phản ứng PCR được triển khai để khuếch đại ba gen chỉ thị (p32, RPO30 và GPCR) của vi rút LSD từ các mẫu bệnh phẩm thu thập tại thực địa. Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 4.2) xác nhận sự hiện diện của các băng DNA đặc hiệu với kích thước 390 bp (p32), 1.3 kb (RPO30) và 1.1 kb (GPCR), phù hợp với trình tự mục tiêu dựa trên hệ gen tham chiếu. Trong đó gen p32 mã hóa một protein vỏ, nằm trên bề mặt màng của một hạt vi rút nội bào trưởng thành, gen có tính bảo tồn cao trong các loài CaPV và đã được sử dụng làm công cụ chẩn đoán LSDV, SPPV và GTPV, tham gia vào quá trình xâm nhập tế bào vật chủ (Mafirakureva và cs, 2017); gen RPO30 mã hóa tiểu đơn vị RNA polymerase 30 kDa, đóng vai trò quan trọng trong quá trình nhân lên của vi rút ; và gen GPCR tham gia vào quá trình điều hòa miễn dịch của vật chủ (điều hòa tín hiệu tế bào

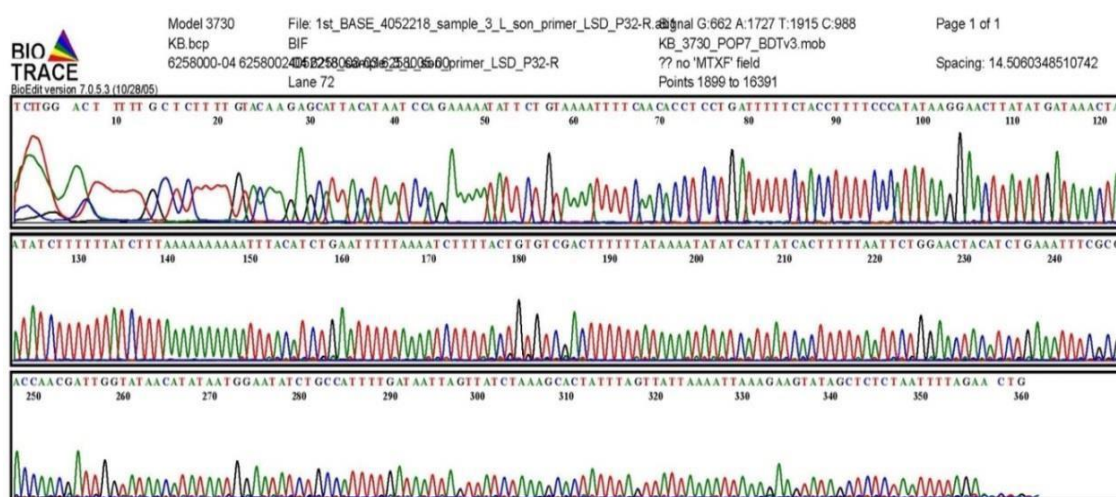
liên quan đến né tránh miễn dịch) được chứng minh đa hình nucleotide cao hơn so với trình tự của gen RPO30, LSDV126 và LSDV127 (Saltykov và cs, 2021).



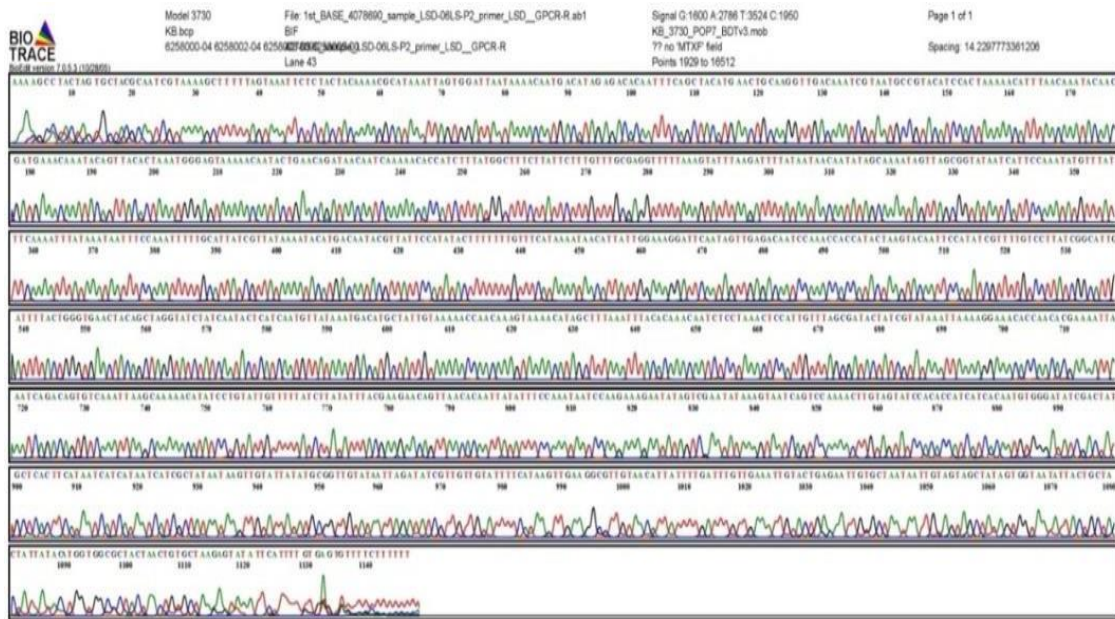
Hình 4.2. Minh họa kết quả PCR minh họa 03 gen chỉ báo là P32, RPO30, và GPCR

Ghi chú: ĐC âm: Đối chứng âm; ĐC dương: Đối chứng dương; M01: mẫu VDNC thí nghiệm; M: maker: thang chuẩn có độ dài 100bp

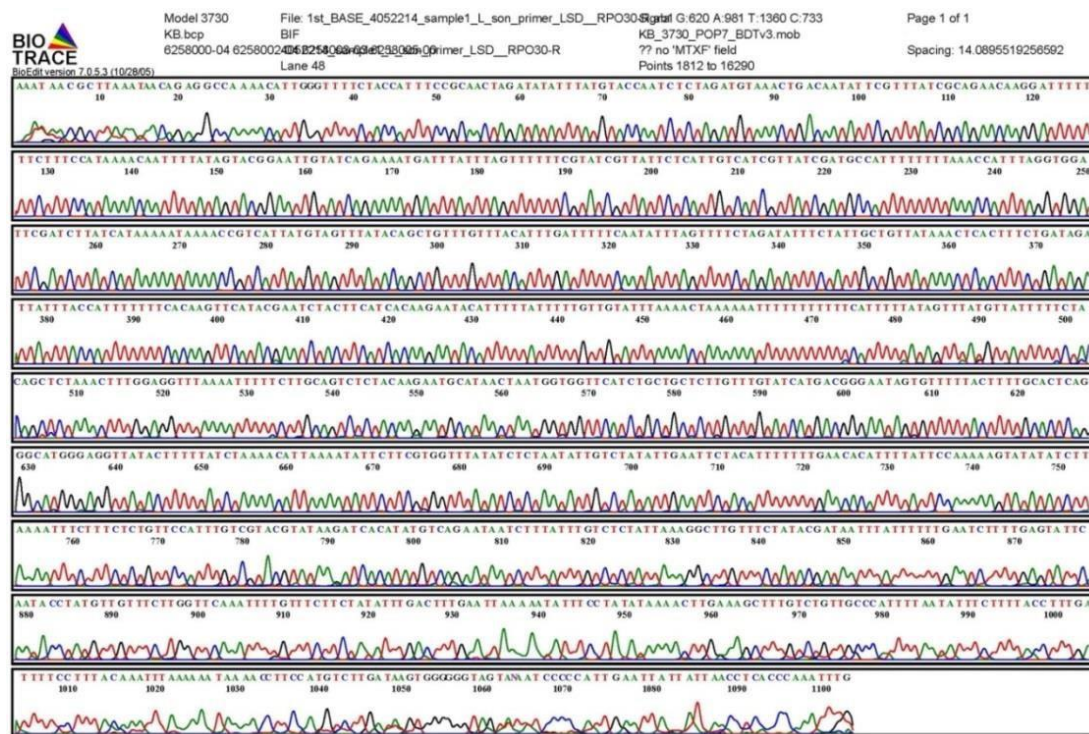
Các gen chỉ báo chính bao gồm một phần gen p32, RPO30, GPCR và được giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự các gen lần lượt được minh họa tại các hình 4.3, 4.4 và 4.5 cho thấy, tín hiệu trình tự rõ nét, các chỉ số đạt chất lượng tốt để tiếp tục tiến hành phân tích hệ di truyền và xác định genotype vi rút gây bệnh VDNC tại vùng Bắc Trung Bộ.



Hình 4.3. Minh họa kết quả giải trình tự đoạn gen p32 chủng vi rút gây bệnh VDNC tại vùng Bắc Trung Bộ



Hình 4.4. Kết quả giải trình tự đoạn gen GPCR chủng vi rút gây bệnh VDNC tại vùng Bắc Trung Bộ



Hình 4.5. Kết quả giải trình tự đoạn gen RPO30 chủng vi rút gây bệnh VDNC tại vùng Bắc Trung Bộ

Tổng cộng đã có 63 trình tự được xác định và gửi đến cơ sở dữ liệu GenBank theo thứ tự từ mã số OQ948267 đến OQ948329 được thể hiện chi tiết tại bảng 4.3.

Bảng 4.3. Danh sách mẫu bệnh phẩm dương tính vi rút VDNC được đăng tải trên ngân hàng dữ liệu genbank thế giới

TT	Chủng vi rút	Địa chỉ lấy mẫu	P32	RPO30	GPCR
1	LSDV/Vietnam/HaTinh/3854-21	Cương Gián, Nghi Xuân, Hà Tĩnh	OQ948267	OQ948288	OQ948309
2	LSDV/Vietnam/HaTinh/3768-21	Phổ Châu, Hương Sơn, Hà Tĩnh	OQ948268	OQ948289	OQ948310
3	LSDV/Vietnam/HaTinh/2822-21	Đức Lạng, Đức Thọ, Hà Tĩnh	OQ948269	OQ948290	OQ948311
4	LSDV/Vietnam/Hue/4510-21	Hồng Bắc, A Lưới, Thừa Thiên Huế	OQ948270	OQ948291	OQ948312
5	LSDV/Vietnam/Hue/4268-21	Quảng Phú, Quảng Điền, Thừa Thiên Huế	OQ948271	OQ948292	OQ948313
6	LSDV/Vietnam/Hue/4269-21	Quảng Phú, Quảng Điền, Thừa Thiên Huế	OQ948272	OQ948293	OQ948314
7	LSDV/Vietnam/NgheAn/4671-21	Thịnh Sơn, Đô Lương, Nghệ An	OQ948273	OQ948294	OQ948315
8	LSDV/Vietnam/NgheAn/4669-21	Tào Sơn, Anh Sơn, Nghệ An	OQ948274	OQ948295	OQ948316
9	LSDV/Vietnam/NgheAn/4600-21	Diễn Lộc, huyện Diễn Châu, Nghệ An	OQ948275	OQ948296	OQ948317
10	LSDV/Vietnam/QuangBinh/3984-21	Yên Hóa, Minh Hóa, Quảng Bình	OQ948276	OQ948297	OQ948318
11	LSDV/Vietnam/QuangBinh/3983-21	Bào Ninh, Đồng Hới, Quảng Bình	OQ948277	OQ948298	OQ948319
12	LSDV/Vietnam/QuangBinh/3930-21	Thượng Trạch, Bố Trạch, Quảng Bình	OQ948278	OQ948299	OQ948320
13	LSDV/Vietnam/QuangTri/4013-21	Vĩnh Thái, Vĩnh Linh, Quảng Trị	OQ948279	OQ948300	OQ948321
14	LSDV/Vietnam/QuangTri/4011-21	Gio Châu, Gio Linh, Quảng Trị	OQ948280	OQ948301	OQ948322
15	LSDV/Vietnam/QuangTri/3963-21	Triệu Lăng, Triệu Phong, Quảng Trị	OQ948281	OQ948302	OQ948323
16	LSDV/Vietnam/ThanhHoa/4606-21	Thiệu Thịnh, Thiệu Hóa, Thanh Hóa	OQ948282	OQ948303	OQ948324
17	LSDV/Vietnam/ThanhHoa/4385-21	Kiên Thọ, Ngọc Lặc, Thanh Hóa	OQ948283	OQ948304	OQ948325
18	LSDV/Vietnam/ThanhHoa/4200-21	Hóa Quý, Như Xuân, Thanh Hóa	OQ948284	OQ948305	OQ948326
19	LSDV/Vietnam/NgheAn/259-22	Lĩnh Sơn, Anh Sơn, Nghệ An	OQ948285	OQ948306	OQ948327
20	LSDV/Vietnam/NgheAn/1059-22	Lý Thành, Yên Thành, Nghệ An	OQ948286	OQ948307	OQ948328
21	LSDV/Vietnam/NgheAn/1059-22	Nam Thành, Yên Thành, Nghệ An	OQ948287	OQ948308	OQ948329

Có 21 chủng vi rút LSD được giải trình tự ba gen p32, RPO30, GPCR trong đó Hà Tĩnh 3 chủng (năm 2021), Huế 3 chủng (năm 2021), Nghệ An 3 chủng (năm 2021), Quảng Bình (Quảng Trị mới) 3 chủng (năm 2021), Quảng Trị 3 chủng (năm 2021), Thanh Hóa 3 chủng (năm 2021) và Nghệ An 3 chủng (năm 2022). Các chủng vi rút được phát hiện năm 2023 và 2024 cũng được giải trình tự tuy nhiên không có sự khác biệt về trình tự các đoạn gen này so với các chủng được giải trình tự trước đó. Tất cả các chủng vi rút LSD được sử dụng đưa vào phân tích di truyền và phả hệ.

4.2.2. Xây dựng cây phả hệ các chủng vi rút LSD dựa vào trình tự các đoạn gen chỉ báo

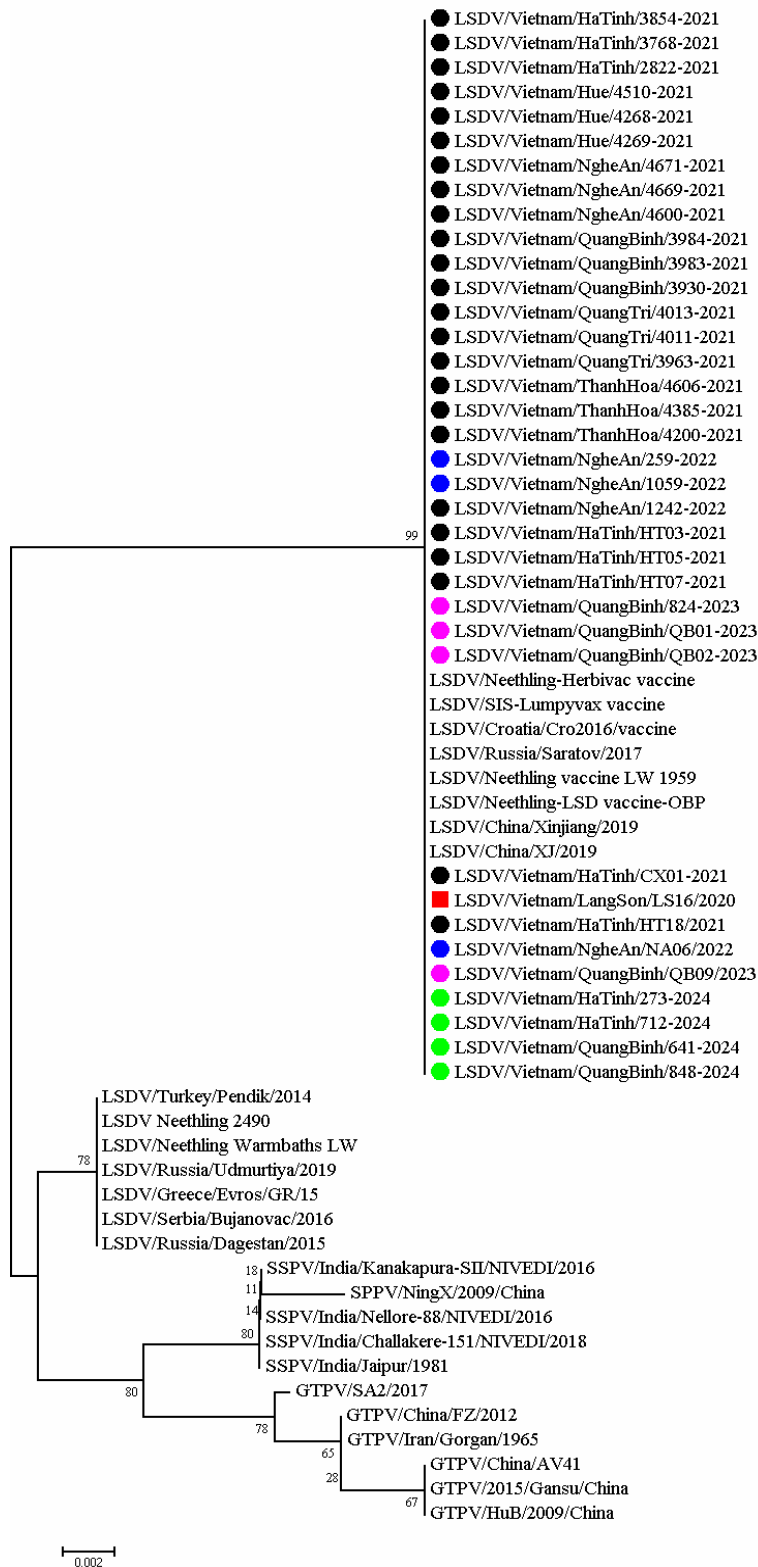
Kết quả so sánh trình tự gen p32 của các chủng vi rút LSD lưu hành ở vùng Bắc Trung Bộ cho thấy có sự tương đồng từ 98,1 - 100% so với các chủng vi rút được báo cáo trước đó và các chủng được công bố ở Trung Quốc. Tương đồng khoảng 96,83% - 97,15% so với các chủng vi rút đậu dê (GPPV). Phân tích phả hệ cho thấy các chủng vi rút LSD tại Việt Nam cùng nhóm với các chủng vi rút LSD ở Trung Quốc. Trình tự nucleotide gen p32 của các chủng trong nghiên cứu này tương đồng 100% với các chủng vắc xin đồng chủng bao gồm SIS-Lympyvac, Neethling, chủng tái tổ hợp của LSDV/Russia/Saratov/2017 (MH646674) và chủng tham chiếu Việt Nam (chủng LSDV/Vietnam/LangSon/LS16 (PQ859561)) (Hình 4.6 và Bảng 4.4).

Phân tích gen GPCR cho thấy, các chủng vi rút LSD tại vùng Bắc Trung Bộ nói riêng và Việt Nam nói chung thuộc phân nhóm tái tổ hợp (Cluster) 2.5 và cùng nhóm với các chủng vi rút LSD gây bệnh ở Trung Quốc, Hồng Kông (Hình 4.7). Phân tích trình tự và phả hệ gen RPO30 cho thấy, các chủng vi rút LSD của vùng Bắc Trung Bộ thuộc phân nhóm Subgroup III và cùng nhóm với các chủng vi rút LSD gây bệnh ở Trung Quốc (Hình 4.8).

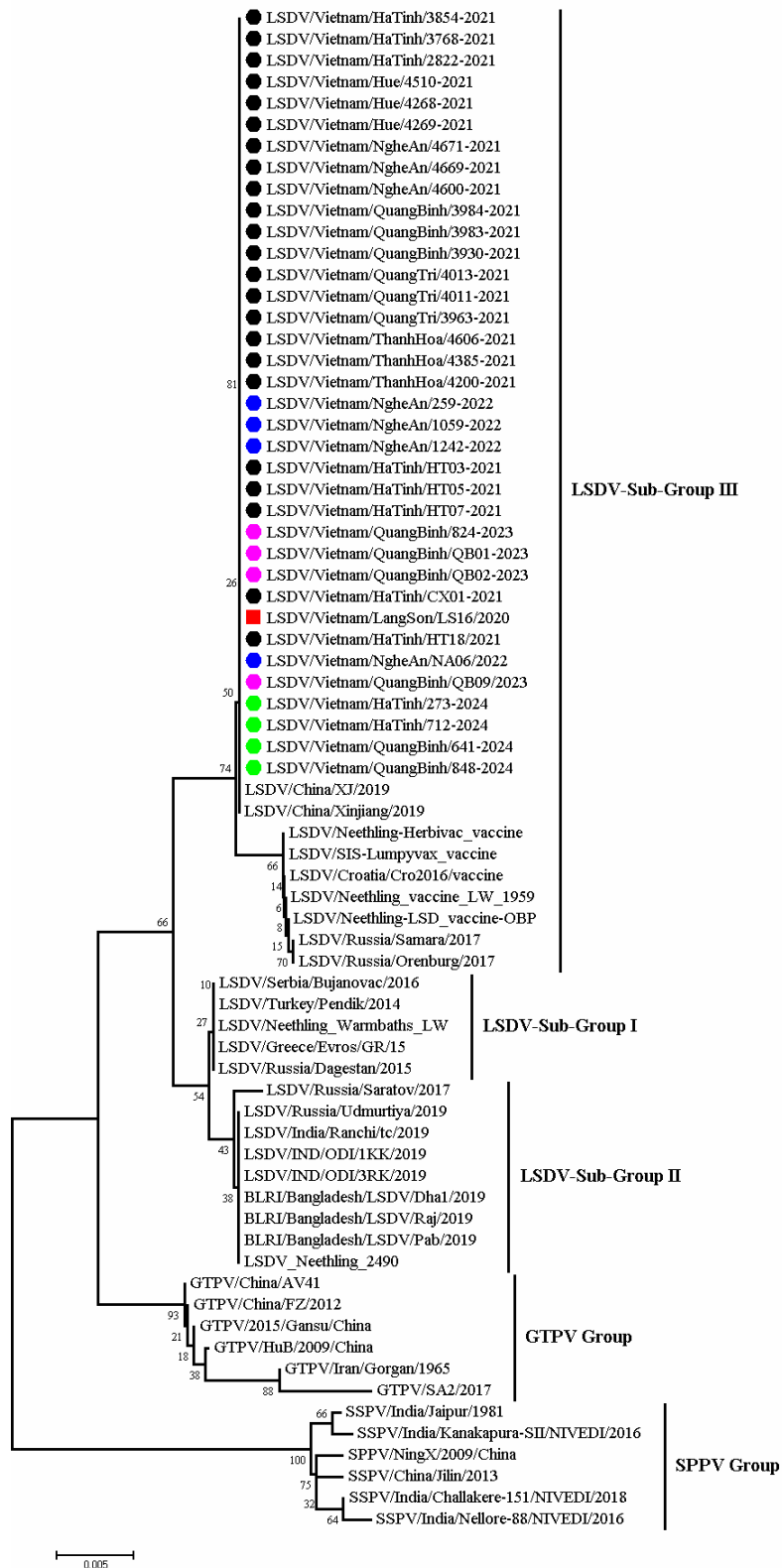
Việc xây dựng cây phả hệ, so sánh các trình tự gen các chủng vi rút LSD đã xác định giữa các ổ dịch VDNC đầu tiên ở Việt Nam với chủng tham chiếu, các chủng vắc xin thương mại và các chủng hiện đang lưu hành tại vùng Bắc Trung bộ để xác định sự tiến hóa của vi rút, từ đó có những chiến lược trong sử dụng vắc xin phù hợp hơn.

**Bảng 4.4. Sự tương đồng nucleotide giữa vi rút LSD phân lập tại Việt Nam
và các trình tự tham chiếu khác**

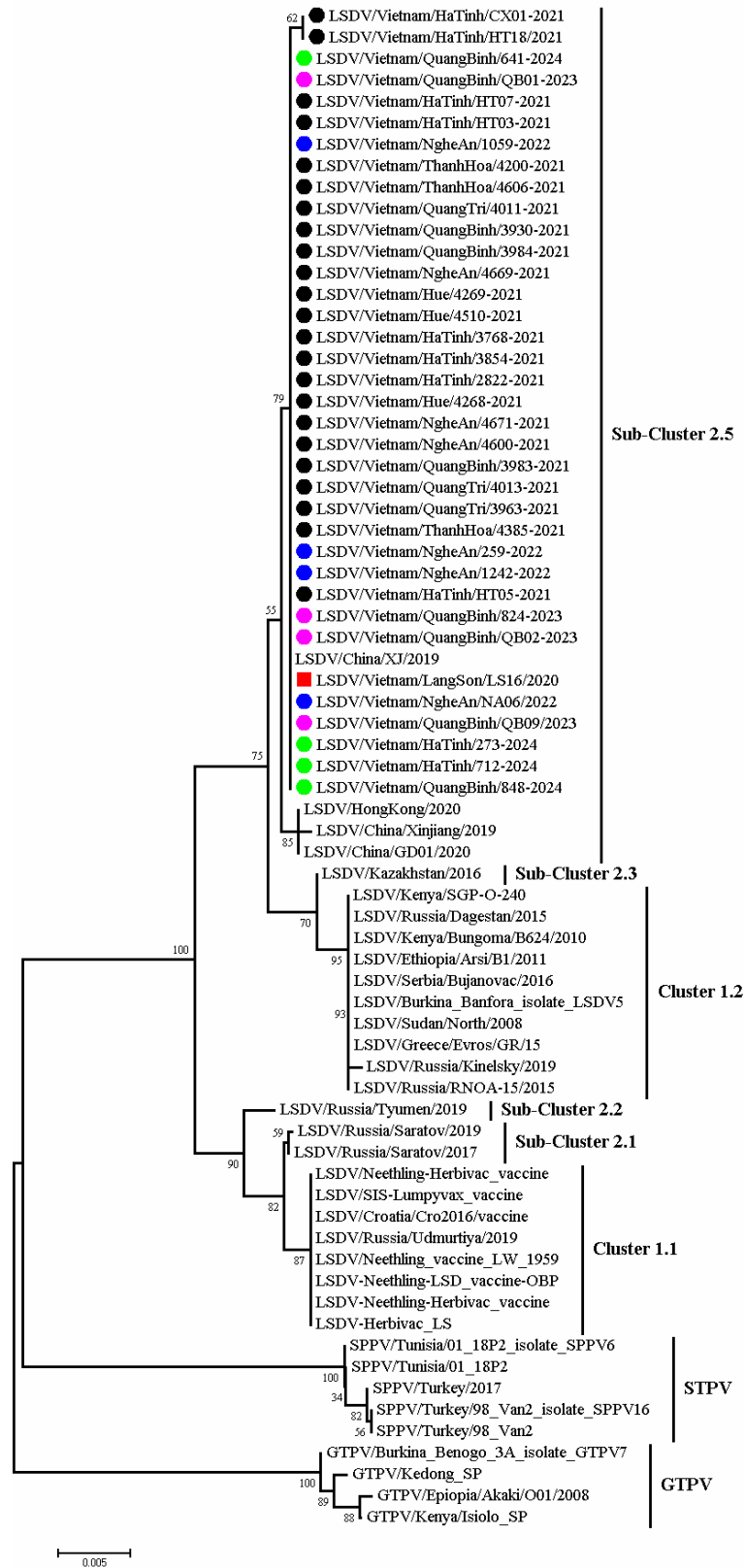
TT	Mã số Genbank	Tên viết tắt	Chủng	Độ tương đồng (%)		
				GPCR	RPO30	P32
1	MH893760.2	VDNCV/Russia/Dagestan/2015	Wildtype	99,3	98,78	98,01
2	MK302072.1	VDNCV/Kenya/Bungoma/B624/2010	Wildtype	99,29	99,17	NI
3	MK302073.1	VDNCV/Ethiopia/Arsi/B1/2011	Wildtype	99,29	99,34	NI
4	KY702007.1	VDNCV/Serbia/Bujanovac/2016	Wildtype	99,29	98,78	98,10
5	FJ869352.1	VDNCV/Burkina-Banfora-isolate-VDNCV5	Wildtype	99,29	99,34	NI
6	KJ818281.1	VDNCV/Kenya/SGP-O-240	Wildtype	99,30	99,17	NI
7	MK302082.1	VDNCV/Sudan/North/2008	Wildtype	99,29	99,34	NI
8	KY829023.3	VDNCV/Greece/Evros/GR/15	Wildtype	99,29	98,70	98,10
9	MK452255.1	VDNCV/Russia/Kinelsky/2019	Wildtype	99,20	99,34	NI
10	MK765544.1	VDNCV/Kazakhstan/2016	Wildtype	99,74	99,39	NI
11	KY595106.1	VDNCV/Russia/RNOA-15/2015	Wildtype	99,29	NI	NI
12	OM530217.1	VDNCV/Russia/Saratov/2019	2.1	98,73	99,01	100
13	MH646674.1	VDNCV/Russia/Saratov/2017	2.1	98,86	98,97	100
14	OL542833.1	VDNCV/Russia/Tyumen/2019	2.2	98,86	99,01	100
15	MT134042.1	VDNCV/Russia/Udmurtiya/2019	2.3	98,69	99,17	98
16	MN508357.1	VDNCV/China/XJ/2019	2.5	100	100	100
17	MN598005.1	VDNCV/China/Xinjiang/2019	2.5	99,73	100	100
18	MW355944.1	VDNCV/China/GD01/2020	2.5	99,82	100	100
19	PQ859561.1	VDNCV/Vietnam/LangSon/LS16	2.5	100	100	100
20	MW732649.1	VDNCV/HongKong/2020	2.5	99,82	100	100
21	KX764644.1	VDNCV/Neethling-Herbivac Vaccine	Vaccine	98,69	99,39	100
22	KX764643.1	VDNCV/SIS-Lumpyvax-Vaccine	Vaccine	98,69	99,39	100
23	MG972412.1	VDNCV/Croatia/Cro2016/vaccine	Vaccine	98,69	99,39	100
24	KX764645.1	VDNCV-Neethling-VDNC-Vaccine-OBP	Vaccine	98,69	99,39	100
25	KX764644.1	VDNCV-Neethling-Herbivac-Vaccine	Vaccine	98,69	99,39	100
26	MK441838.1	VDNCV-Herbivac-LS	Vaccine	98,50	99,31	100
27	AF409138.1	VDNCV/Neethling-Vaccine-LW-1959	Vaccine	98,69	99,31	100



Hình 4.6. Cây phả hệ của các chủng vi rút LSD dựa trên trình tự đoạn gen p32 với các chủng tham chiếu



Hình 4.7. Cây phả hệ của các chủng vi rút LSD dựa trên trình tự đoạn gen RPO30 với các chủng vi rút tham chiếu



Hình 4.8. Cây phả hệ của các chủng vi rút LSD thu thập tại dựa trên trình tự đoạn gen GPCR với các chủng vi rút tham chiếu

Tại Việt Nam đã có 4 loại vắc xin được đưa vào sử dụng bao gồm vắc xin dị chủng và 3 vắc xin đồng chủng. Vắc xin dị chủng (vắc xin đậu dê) và 1 vắc xin đồng chủng được sản xuất trong nước và 2 loại nhập khẩu (Mevac và Lumpyvac) đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đánh giá lựa chọn. Đến nay, các loại vắc xin này đều cho thấy hiệu quả tốt và đóng vai trò quan trọng trong chương trình vắc xin quốc gia nhằm kiểm soát, phòng ngừa dịch bệnh này tại Việt Nam.

Theo các nghiên cứu trước đây, gen RPO30 có sự tương đồng với gen E4L của vi rút vaccinia, mã hóa tiểu đơn vị RNA polymerase phụ thuộc DNA và gen này đóng vai trò quan trọng trong việc nhân lên của vi rút (Lamien và cs, 2011a; Santhamani và cs, 2014). Dựa trên phân tích cây phả hệ của gen RPO30, có thể thấy rõ các chủng vi rút LSD được chia thành 3 nhóm nhỏ. Phân nhóm I bao gồm các chủng được phân lập từ Nga vào năm 2015 và Thổ Nhĩ Kỳ vào năm 2014. Phân nhóm II gồm các chủng vi rút thực địa lưu hành phổ biến ở Châu Phi, Trung Đông, Châu Âu, Bangladesh hoặc Ấn Độ. Đây là các chủng tái tổ hợp từ các chủng phân lập thực địa ở Nga LSDV/Nga/Udmurtiya/ 2019 (MT134042) và LSDV/Nga/Saratov/2017 (MH646674). Phân nhóm III bao gồm một số chủng vắc xin có nguồn gốc từ chủng Neethling và các chủng phân lập từ Trung Quốc (Lamien và cs, 2011a; Ma và cs, 2022; Santhamani và cs, 2014; Suwankitwat và cs, 2022; Zan và cs, 2022). Những kết quả phân tích gen RPO30 của các chủng vi rút LSD trong nghiên cứu này chỉ ra rằng các chủng vi rút gây bệnh VDNC đang lưu hành tại Bắc trung bộ giống 100% về trình tự so với các chủng vi rút LSD được báo cáo trước đây ở miền Bắc Việt Nam, chủng Tân Cương năm 2019 của Trung Quốc (MN598007) và Trung Quốc/XJ/2019 (MN518933). Ngoài ra, theo phân tích định danh bằng phần mềm BLAST từ NCBI cho thấy, gen RPO30 của vi rút LSD lưu hành tại Việt Nam có sự tương đồng rất cao (98,97%) với chủng vi rút gây bệnh tại Nga (LSDV/Nga/Saratov/2017) (Hình 4.7 và Bảng 4.4). Bên cạnh đó, phân tích trình tự gen RPO30 của các chủng vi rút LSD lưu hành tại Việt Nam cho thấy giống tới 99,66% với các chủng vi rút vắc xin lưu hành ở Nam Phi. Dựa trên kết quả giải trình tự gen RPO30, vi rút gây bệnh VDNC trong nghiên cứu này được phân loại thuộc phân nhóm III và có mức độ tương đồng rất cao so với chủng tham chiếu Việt Nam

(LSDV/Việt Nam/LangSon/LS16) và các chủng gây bệnh VDNC đang lưu hành ở Trung Quốc.

GPCR là gen mã hóa thụ thể chemokine kết hợp G-protein trong bộ gen của họ CaPV. Gen này có ý nghĩa quan trọng trong phân biệt các vi rút cùng họ, do ở các chủng vi rút thực địa gây bệnh VDNC bị xóa 12 nucleotide so với chủng vi rút vắc xin (Santhamani và cs., 2014). Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh ba nhóm vi rút LSD chính bao gồm: Chủng vi rút liên quan đến vắc xin, chủng vi rút tự nhiên và chủng vi rút tái tổ hợp (Flannery và cs, 2022; Krotova và cs, 2022c). Ngoài ra, các chủng vi rút tái tổ hợp cũng có thể được chia thành 5 nhóm được định danh là cluster 2.1-2.5 với những khác nhau không lớn (Krotova và cs, 2022b; Krotova và cs, 2022c; Van Schalkwyk và cs, 2022a; van Schalkwyk và cs, 2022b). Nhóm cluster 2.1 bao gồm chủng vi rút LSDV/Russia/ Saratov/17 và LSDV/Russia/Saratov/19, trong khi đó chủng LSDV/Russia/Tyumen/2019 và LSDV/Udmurtiya/19 lần lượt được xác định thuộc nhóm cluster 2.2 và cluster 2.3 (Flannery và cs, 2022). Nhóm Cluster 2.5 bao gồm một vài chủng vi rút có nguồn gốc từ Trung Quốc, Hồng Kong và Thái Lan (Flannery và cs, 2022; Paungpin và cs, 2022). Hầu hết các chủng vi rút LSD từ Nga và phần lớn châu Á là các chủng tái tổ hợp giống vắc xin với đặc điểm dựa trên chủng Neethling và KSGP (Flannery và cs, 2022; Shumilova và cs, 2022). Dữ liệu từ nghiên cứu hiện tại cũng cho thấy rằng tất cả các chủng vi rút LSD lưu hành tại Việt Nam đều có đoạn chèn 12 bp và có mức độ tương đồng 100% so với các chủng được báo cáo trước đó ở Việt Nam và chủng China/XJ/2019 ở Trung Quốc (MN518933). Các chủng này có chung mức độ tương đồng là 99,73%, 99,82% và 99,82% tương ứng với chủng Trung Quốc Xinjiang/2019 (MN598007), HongKong/2020 (MW732649.1) và China/GD01/2020 (MW355944.1) (Bảng 4.4 và Hình 4.8).

Các phân tích dựa trên gen GPCR cho thấy mức độ tương đồng nucleotide của các chủng vi rút LSD lưu hành tại Việt Nam lần lượt là 99,29% - 99,74%, 98,50% - 98,69% và 98,69% - 99,29% khi so với các chủng vi rút tự nhiên, chủng vi rút vắc xin và chủng vi rút tái tổ hợp. Đối với các chủng tham chiếu GTPV và

SPPV thì mức độ tương đồng về nucleotide tương ứng là 94,06% - 96,07% (Bảng 4.4). Do tính tương đồng cao và có các phản ứng chéo huyết thanh trong nhóm CaPV nên vắc xin GTPV cũng đã được sử dụng trên trâu bò với khả năng bảo hộ tương đương chống lại vi rút LSD (Gari và cs, 2015; Tuppurainen và cs, 2021). Các chủng vi rút LSD phân lập tại khu vực Bắc Trung Bộ cùng phân nhóm với chủng vi rút LSDV/VietNam/LangSon/LS16, China/XJ/2019(MN518933), China/GD01/2020 (MW732649.1) và LSDV/Hong-Kong/2020 (MW732649.1) như đã trình bày trong nhóm vi rút LSD tái tổ hợp cluster 2.5 (Hình 4.8). Các nghiên cứu gần đây cũng đã chứng minh rằng các chủng vi rút LSD tái tổ hợp làm tăng độc lực khi so sánh với các chủng vi rút LSD thực địa và nó có thể lây truyền mà không phụ thuộc vào vectơ gây bệnh (Aleksandr và cs, 2020a; Kononova và cs, 2020). Ngoài ra, các chủng vi rút LSD tại Việt Nam được nhóm lại thành một cụm mới, hơi khác so với các chủng vi rút vắc xin và các chủng vi rút tự nhiên hiện nay. Điều này cho thấy cơ chế tái tổ hợp đa dạng có sự tham gia của ít nhất một chủng vi rút tự nhiên và một chủng vi rút vắc xin. Các chủng vi rút gây bệnh VDNC tái tổ hợp này lưu hành ở Trung Quốc, Nga và Việt Nam (Aleksandr và cs, 2020a; Kononova và cs, 2020).

Những kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng vi rút gây bệnh VDNC lưu hành tại các tỉnh thuộc Bắc Trung Bộ và tất cả các chủng khác được phân lập trước đây ở Việt Nam cùng với các chủng Trung Quốc đều thuộc một kiểu gen dựa trên phân tích gen P32, RPO30 và GPCR (Hình 4.6-4.8).

4.3. Kết quả nghiên cứu đặc tính sinh học của các chủng vi rút thực địa gây bệnh VDNC tại vùng Bắc Trung Bộ

4.3.1. Kết quả phân lập vi rút LSD trên môi trường tế bào MDBK

Từ các mẫu bệnh phẩm dương tính với vi rút LSD thu thập tại thực địa thuộc vùng Bắc Trung Bộ từ năm 2021-2024, các mẫu được phân lập trên đĩa 6 giếng. Kết quả cho thấy 10 mẫu bệnh phẩm xuất hiện bệnh tích tế bào đặc trưng sau khi phân lập. Kết quả phân lập mẫu bệnh phẩm nghi mắc bệnh do vi rút LSD được thể hiện qua hình 4.18-4.19, bảng 4.7.

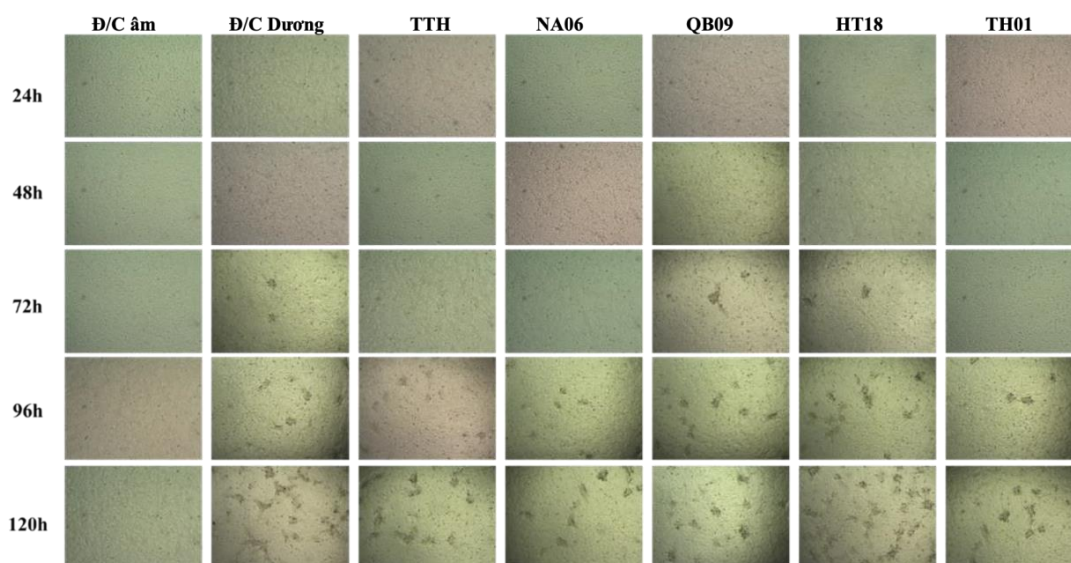
Bảng 4.5. Kết quả đánh giá bệnh tích tế bào của các chủng vi rút LSD trên tế bào dòng MDBK sau 120h gây nhiễm qua 03 lần cấy chuyển

Tỉnh	Mẫu	Bệnh tích tế bào qua các lần cấy chuyển														
		Lần 1					Lần 2					Lần 3				
		24h	48h	72h	96h	120h	24h	48h	72h	96h	120h	24h	48h	72h	96h	120h
Nghệ An	NA01	-	-	-	2+	3+	-	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	4+
	NA06	-	-	1+	1+	2+	-	1+	1+	2+	3+	1+	2+	2+	3+	4+
Thanh Hóa	TH01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	1+	2+	3+	4+
	TH02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	2+	3+	4+	4+
Thừa Thiên Huế	TTH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	1+	2+	3+	4+
Quảng Trị	QT	-	-	-	1+	2+	-	-	1+	2+	3+	1+	2+	3+	4+	4+
Quảng Bình	QB01	-	-	-	1+	2+	-	-	1+	2+	3+	1+	2+	2+	3+	4+
	QB09	-	-	1+	1+	3+	-	1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	3+	4+
Hà Tĩnh	HT02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	2+	2+	3+	4+
	HT18	-	-	1+	2+	3+	-	1+	2+	2+	3+	1+	2+	3+	4+	4+

Ghi chú: (-): âm tính; (1+): có rất ít bệnh tích tế bào; (2+): có nhiều bệnh tích tế bào; (3+) và (4+): có rất nhiều bệnh tích tế bào

Kết quả cho thấy thời gian tối thiểu để các chủng vi rút phân lập bắt đầu gây ra bệnh tích trên tế bào là sau 1 ngày gây nhiễm, các cụm tế bào co lại tạo thành u cục và tăng dần theo thời gian gây nhiễm. Ngày thứ 2 sau gây nhiễm (DPI) bệnh tích (CPE) bắt đầu rõ ràng hơn, và từ 3 DPI đến 5 DPI là khoảng thời gian vi rút LSD gây CPE trên tế bào dòng MDBK tăng theo cấp số nhân. Ở ngày thứ 5 biểu hiện nhiều và rõ ràng nhất. Đã phân lập thành công 10 chủng vi rút LSD trên môi trường tế bào dòng MDBK từ các mẫu bệnh phẩm ở 6 tỉnh trong vùng Bắc Trung Bộ lần lượt là Thanh Hóa (TH1, TH2), Thừa Thiên Huế (TTH), Quảng Trị (QT), Quảng Bình (Quảng Trị) (QB01, QB09), Nghệ An (NA01, NA06) và Hà Tĩnh (HT02 và HT18,). Từ hình 3.18 cho thấy các chủng vi rút NA06, HT18, và QB09 có mật độ CPE tương đương nhau đạt khoảng 70% - 90% diện tích đáy giếng phân

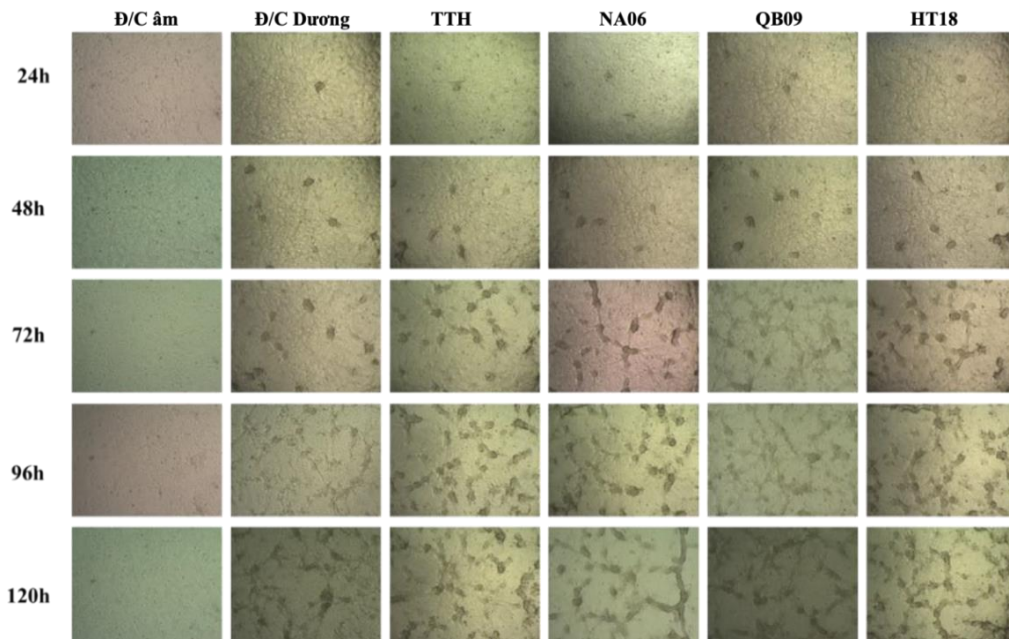
lập. Ở giếng đối chứng âm, tế bào MDBK phát triển bình thường, không xuất hiện bệnh tích.



Hình 4.9. Hình ảnh bệnh tích tế bào ở lần phân lập đầu tiên với độ phóng đại 10X (LS16: chủng đối chứng dương)

Ghi chú: Đ/C âm: Đối chứng âm; Đ/C dương: Đối chứng dương; TTH: Thừa Thiên Huế; QB09: Quảng Bình 09; NA06: Nghệ An 06; HT18: Hà Tĩnh 18; TH01: Thanh Hóa 01

Theo khuyến cáo của WOAHA, vi rút LSD phát triển tốt trên tế bào dòng (cells line) và các loại tế bào sơ cấp (primary cells) như tế bào tinh hoàn cừu (lamb testis -LT), tế bào tinh hoàn bê, hoặc một số tế bào cảm biến khác như trứng gà có phôi 11 ngày tuổi, tế bào African green monkey kidney (Vero cells), hoặc Ovine testis secondary cell line (OA3.Ts). Thời gian xuất hiện CPE phụ thuộc vào loại tế bào sử dụng, có thể dao động từ 2 đến 14 ngày. Một số tế bào dòng hoặc sơ phôi có thể biểu hiện bệnh tích tế bào sau 2-6 ngày. Thông thường nếu sau 14 ngày gây nhiễm chưa có bệnh tích tế bào, tế bào gây nhiễm sẽ được thu lại và tiếp tục tiếp đời trên tế bào lần 2 (WOAHA, 2021a). Sau khi thực hiện các thí nghiệm để lựa chọn loại tế bào phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm của Việt Nam, kết quả cho thấy tế bào dòng MDBK cho kết quả tốt nhất, và là loại tế bào phù hợp nhất cho việc phân lập và nuôi cấy vi rút LSD. Đây là loại tế bào dòng dễ nuôi cấy, cho phép quan sát rõ ràng bệnh tích khi phân lập vi rút LSD.

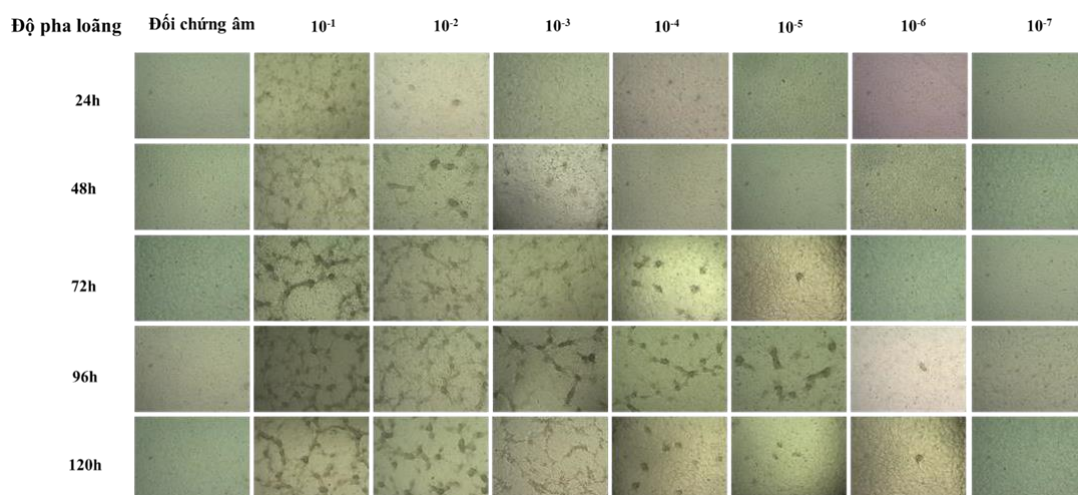


Hình 4.10: Hình ảnh minh họa kết quả bệnh tích tế bào sau 3 đời cấy chuyên, với độ phóng đại 10X (LS16: chủng đối chứng dương)

4.3.2. Kết quả chuẩn độ vi rút ($TCID_{50}$) LSD trên môi trường tế bào MDBK

Hiệu giá của 10 chủng vi rút LSD trên tế bào dòng MDBK được thể hiện qua hình 4.19 và bảng 4.8. Sau 1 ngày gây nhiễm, tại các giếng có tế bào dòng MDBK nhiễm vi rút LSD cụm tế bào co lại tạo thành các cục tế bào gồm rất nhiều tế bào chồng đồng lên nhau. Đây là bệnh tích điển hình của vi rút LSD khi phân lập trên tế bào dòng MDBK theo hướng dẫn của WOAHA (2021a), và những giếng này được coi là dương tính vi rút LSD.

Từ việc xác định các giếng dương tính với vi rút LSD trên tế bào dòng MDBK, hiệu giá vi rút LSD được tính dựa trên công thức đã được miêu tả phân phương pháp, kết quả xác định nồng độ của 10 chủng vi rút LSD đang lưu hành tại các tỉnh thuộc khu vực Bắc Trung Bộ của Việt Nam được thể hiện qua bảng 4.8.



Hình 4.11. Kết quả chuẩn độ (TCID50) của chủng NA06 trên tế bào dòng MDBK

Kết quả bảng 4.8 thể hiện nồng độ vi rút LSD của các chủng phân lập được trên địa bàn tỉnh Nghệ An, Thanh Hóa, Thừa Thiên Huế, Quảng Trị, Quảng Bình, Hà Tĩnh dao động từ 6.3-7.1 log₁₀ TCID₅₀. Các chủng vi rút ở mỗi địa phương có khả năng nhân lên và gây nhiễm trên nuôi cấy tế bào tương đối đồng nhất, phản ánh các đặc điểm sinh học tương đồng trong cùng một vùng sinh thái.

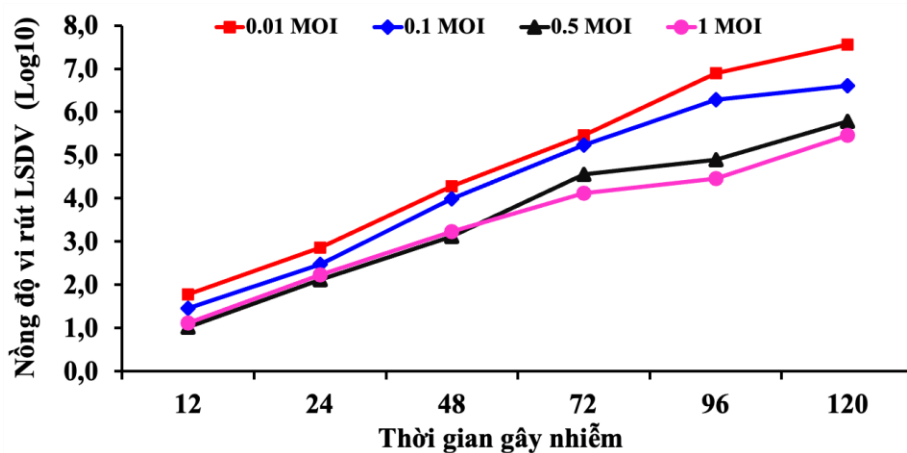
Bảng 4.6. Kết quả chuẩn độ vi rút LSD trên tế bào dòng MDBK

TT	Chủng vi rút	Số giếng có bệnh tích tế bào								Hiệu giá vi rút LogTCID ₅₀ /mL
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
1	NA01	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	0/5	0/5	6.5
2	NA06	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	0/5	7.1
3	TH1	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	0/5	7.1
4	TH2	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5	0/5	0/5	6.3
5	TTH	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	0/5	0/5	6.9
6	QT	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5	0/5	6.7
7	QB01	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	0/5	0/5	7.1
8	QB09	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	6.9
9	HT18	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	0/5	0/5	6.9
10	HT02	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5	0/5	6.7

4.3.3 Đánh giá khả năng nhân lên của các chủng vi rút LSD trên tế bào dòng MDBK

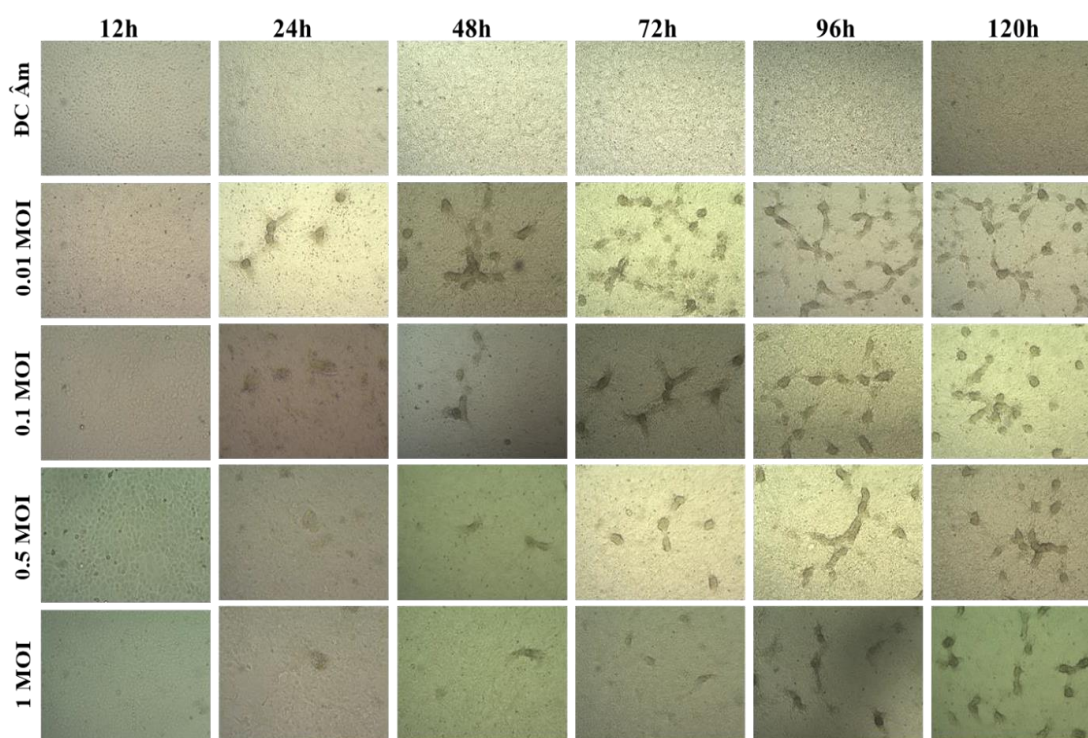
Việc lựa chọn ba chủng vi rút này dựa trên kết quả chuẩn độ và các tiêu chí như đại diện cho từng địa phương theo năm như Nghệ An (2022), Hà Tĩnh (2021), Quảng Bình (2023). Việc chuẩn độ vi rút gây bệnh VDNC trên tế bào MDBK chỉ ra rằng các chủng vi rút thực địa này có khả năng nhân lên với hiệu giá cao hơn các chủng khác. Các chủng vi rút sử dụng trong thí nghiệm cho thấy khả năng tăng trưởng mạnh, với hiệu giá tăng khoảng $4\log_{10}$ TCID₅₀/mL sau 2 ngày và hơn $6\log_{10}$ sau 4 ngày. Sự gia tăng lượng vi rút (bệnh tích) trên tế bào MDBK cho thấy tế bào này phù hợp để sử dụng trong sản xuất vắc xin sống giảm độc lực phòng bệnh VDNC. Đồng thời, phát hiện này cũng chỉ ra rằng tế bào MDBK là dòng tế bào phù hợp để nuôi cấy và phân lập vi rút gây bệnh VDNC từ chủng thực địa ở Việt Nam

Trong nghiên cứu *in vitro*, để đánh giá sự nhân lên của vi rút, các chủng vi rút thu thập tại thực địa được nuôi cấy trên tế bào MDBK với các liều gây nhiễm vi rút khác nhau: 0.01 MOI, 0.1 MOI, 0.5 MOI và 1 MOI, trong 5 ngày. Tế bào được nuôi cấy và thu lại tại các thời điểm khác nhau sau gây nhiễm bao gồm sau 12, 24, 48, 72, 96 và 120 giờ. Kết quả cho thấy chủng vi rút gây bệnh VDNC nhân lên trên tế bào MDBK và tăng nhanh đáng kể đạt tốc độ tăng trưởng $3\log_{10}$ sau 24 giờ gây nhiễm, trên $5\log_{10}$ sau 3 ngày gây nhiễm và xấp xỉ $7\log_{10}$ sau 5 ngày gây nhiễm (Hình 4.21-4.23).



Hình 4.12. Đường cong sinh trưởng của vi rút gây bệnh VDNC tại các liều gây nhiễm khác nhau chủng vi rút LSD NA06

Các thay đổi bệnh tích tế bào MDBK sau khi gây nhiễm vi rút LSD được thể hiện ở Hình 4.22. Bệnh tích tế bào đặc trưng là các tế bào co tròn và bám thành cụm nổi cộm nằm rải rác trên lớp tế bào đơn lớp bám đáy sau 24 giờ gây nhiễm và tăng dần dần đến tách lớp tế bào đơn lớp bám đáy sau 72 giờ gây nhiễm. Sau 96 giờ gây nhiễm, hầu hết lớp tế bào đều hiển thị không bào do các tế bào đều tách lớp và co cụm hoặc kéo dài về hình dáng. Các bệnh tích tế bào chỉ quan sát được đối với tế bào gây nhiễm, ở nhóm đối chứng âm (tế bào không gây nhiễm) các tế bào bám đáy một lớp phẳng mịn, không có tế bào chết hay co cụm và các bệnh tích tế bào khác.



Hình 4.13. Minh họa hình ảnh bệnh tích ở các liều gây nhiễm khác nhau của vi rút LSD chủng NA06 , với độ phóng đại 10X

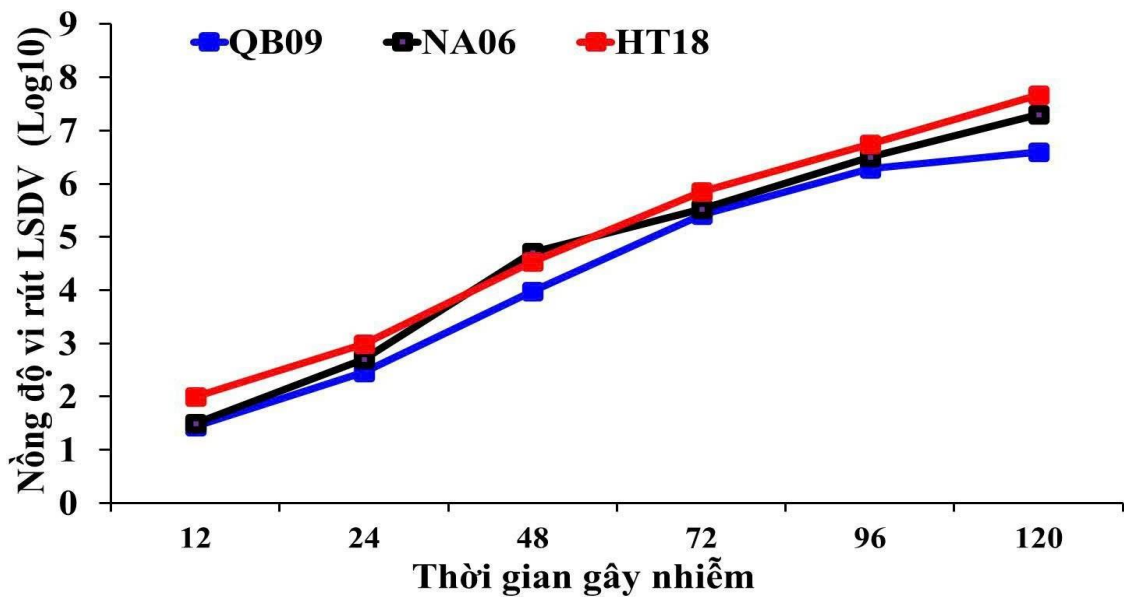
Dựa trên kết quả chuẩn độ vi rút và hình ảnh bệnh tích của tế bào MDBK cho thấy ở liều gây nhiễm 0.01 MOI vi rút có khả năng sinh trưởng, nhân lên và biểu hiện bệnh tích rõ ràng nhất. Bệnh tích bắt đầu xuất hiện sau 24h, mới đầu là một vài các cụm tế bào nhỏ, sau đó cụm to dần và bệnh tích rõ ràng hơn. Đến 96h và 120h sau gây nhiễm, tế bào vẫn chưa bị phá hủy hoàn toàn, các cụm tế bào bắt đầu tan. Trong khi đó ở liều gây nhiễm vi rút cao hơn 0.5 MOI và 1 MOI thì bệnh tích bắt đầu

lúc 24h, sau đó bệnh tích phát triển nhanh, đến 72h tế bào bắt đầu chết bong ra khỏi đáy chai. Sự khác biệt có thể do lượng vi rút ban đầu quá ít, khiến tốc độ nhân lên chậm. Ngược lại, lượng vi rút quá cao có thể gây phá hủy tế bào nhanh chóng, làm giảm hiệu quả nhân lên.

Để đánh giá sự nhân lên của vi rút LSD trên tế bào, 03 chủng vi rút đại diện từ thực địa được nuôi cấy trên tế bào MDBK (0.01 MOI) trong 5 ngày. Sau khi gây nhiễm vi rút trên tế bào, chúng tôi tiến hành thu hoạch huyền dịch vi rút - tế bào tại các thời điểm sau 12, 24, 48, 72, 96 và 120 giờ. Kết quả cho thấy chủng vi rút gây bệnh VDNC nhân lên trên tế bào MDBK và tăng nhanh đáng kể với tốc độ tăng trưởng $3\log_{10}$ sau 24 giờ gây nhiễm, trên $5\log_{10}$ sau 3 ngày gây nhiễm và xấp xỉ $7\log_{10}$ sau 5 ngày gây nhiễm (Hình 4.23).

Các thay đổi bệnh tích tế bào MDBK sau khi gây nhiễm vi rút LSD được thể hiện ở Hình 4.22-4.23. Bệnh tích tế bào đặc trưng là các tế bào co tròn và tụ lại thành cụm hình tròn nằm rải rác trên lớp tế bào đơn lớp bám đáy sau 24 giờ gây nhiễm và tăng dần dần đến tách lớp tế bào đơn lớp bám đáy đến sau 48h và 72 giờ gây nhiễm. Sau 96 giờ gây nhiễm, hầu hết lớp đều hiển thị không bào do các tế bào đều tách lớp và co cụm hoặc kéo dài về hình dáng. Bệnh tích tế bào chỉ quan sát được đối với tế bào gây nhiễm vi rút, ở nhóm đối chứng âm (không gây nhiễm vi rút) tế bào phát triển bình thường tạo thành lớp phẳng mịn. Đến 120h, ở tất cả các giếng gây nhiễm vi rút, tế bào chết bong ra lơ lửng trong môi trường nhiều hơn tạo thành các vùng trống dưới đáy giếng nuôi cấy. Ngược lại các giếng đối chứng âm tế bào vẫn phát triển bình thường.

Kết quả cho thấy các chủng vi rút tại các địa phương khác nhau thì mức độ nhân lên trên tế bào dòng MDBK cũng khác nhau. Đồng thời các mẫu vi rút thu thập tại thời điểm khác nhau khi nhân lên, hiệu quả nhân lên cũng khác nhau. Kết quả thể hiện liều gây nhiễm 0.01 MOI trung bình tại các thời điểm đều có giá trị Ct cao nhất. Sự tăng trưởng của các chủng vi rút được sử dụng trong thí nghiệm này cho thấy lượng vi rút tăng lên khoảng $4\log_{10}$ TCID₅₀/mL trong 2 ngày và tăng hơn $6\log_{10}$ TCID₅₀/mL trong 4 ngày (Hình 4.23 và Bảng 4.9).



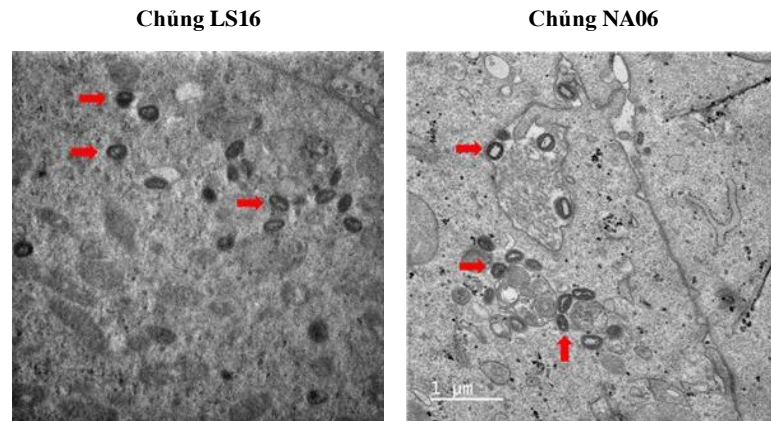
Hình 4.14. Đường cong tăng trưởng của các chủng vi rút gây bệnh VDNC trên tế bào MDBK ở liều gây nhiễm 0.01MOI

Kết quả cũng chỉ ra rằng các chủng vi rút LSD thực địa được sử dụng trong nghiên cứu này là chủng vi rút có tính độc lực cao và phù hợp để sử dụng trong nghiên cứu phát triển vắc xin tại Việt Nam.

Bảng 4.7. Bảng kết quả real-time PCR xác định sự có mặt của 03 chủng vi rút LSD gây nhiễm trên tế bào MDBK ở các liều gây nhiễm khác nhau

Chủng vi rút	Kết quả giá trị Real-time PCR (Ct)			
	0,01 MOI	0,1 MOI	0,5 MOI	1 MOI
HT18	18,50	21,02	22,00	22,70
NA 06	18,67	21,40	21,98	22,70
QB 09	18,21	20,89	22,00	22,87

Ngoài ra, hình ảnh kính hiển vi điện tử cho thấy cấu trúc vỏ bọc được bao quanh bởi một lớp màng. Các hạt vi rút trưởng thành được phát hiện trong nuôi cấy tế bào MDBK có kích thước lớn, hình trứng với các đầu tròn, hình dạng quả bóng len đặc trưng. Đây là hình ảnh đầu tiên mô tả hình dạng của vi rút LSD được phân lập trên vùng Bắc Trung Bộ và tương đồng rất cao so với hình ảnh của vi rút phân lập ở tỉnh Lạng Sơn trước đó (Hình 4.24).



Hình 4.15. Hình ảnh của vi rút LSD qua kính hiển vi điện tử (tỷ lệ:1μm)

Ghi chú: Chủng LS16: Chủng đối chứng dương

Vi rút gây bệnh VDNC được mô tả có hình bầu dục hoặc hình viên gạch, dài 294 ± 20 nm và rộng 262 ± 22 nm, gồm lõi hình quả tạ và thân hai bên và được bao phủ bởi lớp bilipid kép (Tulman và cs, 2001a; Tulman và cs, 2002).

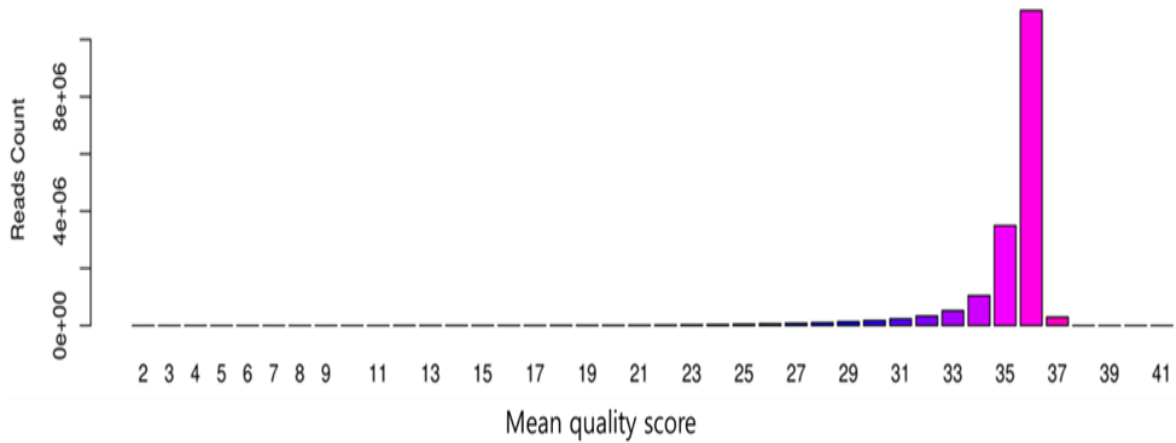
4.3.4. Kết quả giải trình tự toàn bộ genome của vi rút LSD phân lập từ thực địa

Việc giải trình tự toàn bộ genome quan trọng là thiết lập được hệ thống dữ liệu. Trong nghiên cứu này ba chủng vi rút LSD được phân lập tại Nghệ An, Hà Tĩnh và Quảng Bình (Quảng Trị) được tạo thư viện database bằng phương pháp giải trình tự thế hệ mới NGS. Kết quả số liệu thô của ba chủng vi rút LSD được trình bày tại bảng 4.5 và Hình 4.9.

Trong 03 mẫu vi rút LSD, mẫu NA06 có số lượng bản đọc tinh thấp nhất xấp xỉ 24.1 triệu đoạn DNA có độ dài khoảng 150bp/đoạn, và có khoảng 24.4 triệu bản đọc số liệu thô. Với hiệu quả trên 98% ở tất cả 3 chủng vi rút LSD. Kết quả phân tích tỷ lệ phần trăm của các nucleotide guanine (G) và cytosine (C) trong tổng số nucleotide (GC content) cũng dao động quanh mức 25.90%, phù hợp với các nghiên cứu trước đây (Lafar và cs, 2020; Paungpin và cs, 2022a).

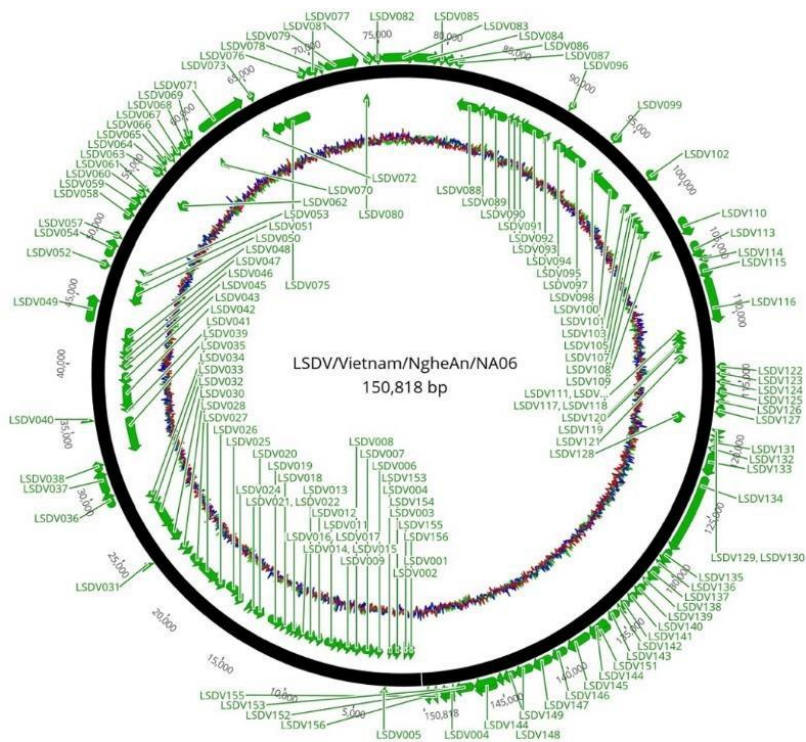
Bảng 4.5. Bảng dữ liệu giải trình tự NGS 3 chủng vi rút LSD

Mẫu vi rút	Bản đọc sau tinh sạch	Bản đọc thô	Effective (%)	Error (%)	Q20 (99%)	Q30 (99.9%)	GC (%)
LSDV-NA06	24.087.626	24.418.792	98,64	0,02	97,48	92,87	25,90
LSDV-HT18	34.347.268	34.512.930	99,52	0,03	97,54	93,22	25,90
LSDV-QB09	34.058.379	34.246.736	99,45	0,03	97,08	92,43	25,90

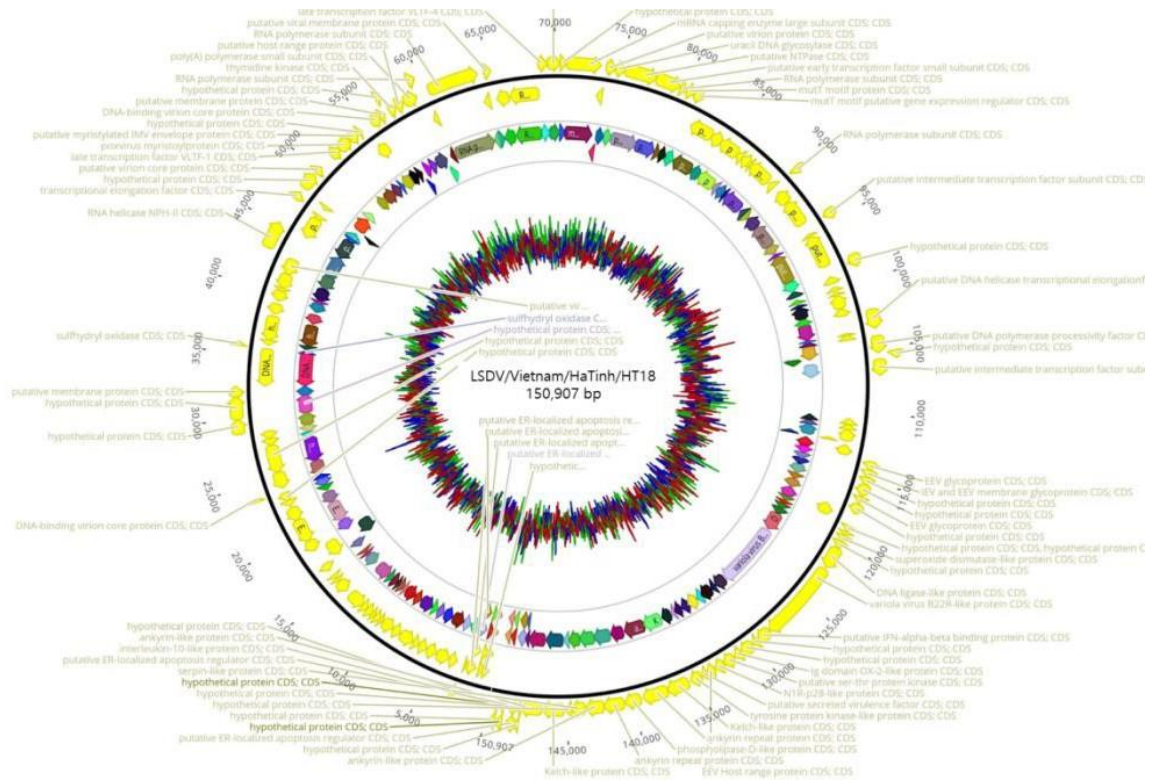


Hình 4.16. Kết quả chất lượng giải trình tự gen

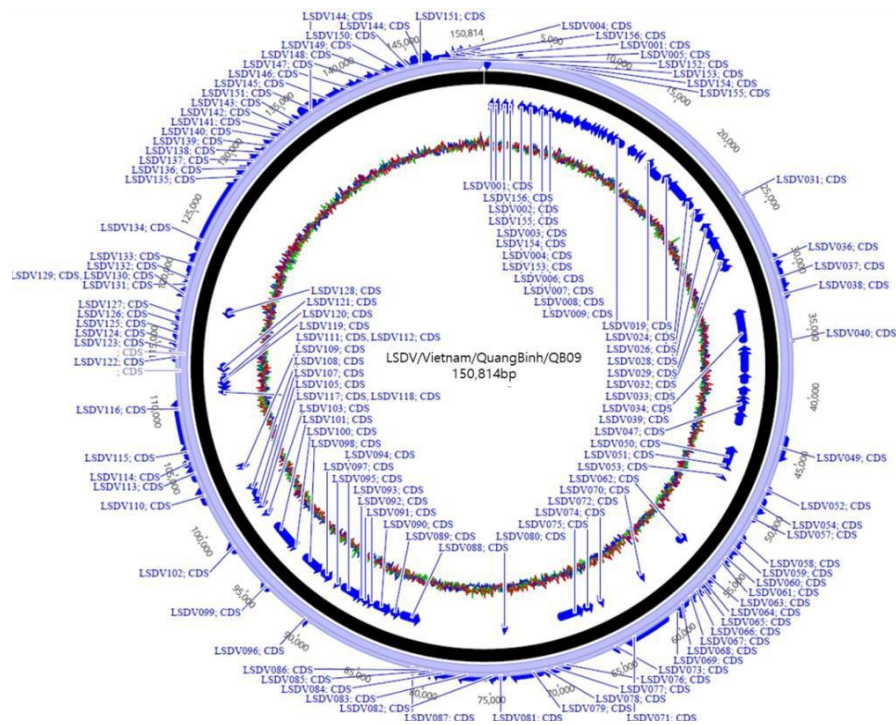
Kết quả phân tích toàn bộ genome vi rút LSD đang lưu hành tại các khu vực Bắc Trung Bộ của Việt Nam cho thấy, độ dài trung bình của vi rút dao động từ 150.8-150.9 kb và khoảng 156 ORF đối với cả ba chủng. Kết quả giải trình tự toàn bộ genome vi rút chủng NA06, HT18 và QB09 được trình bày tại Hình 4.10-4.12.



Hình 4.17. Cấu trúc và thành phần gen của toàn bộ genome vi rút LSD phân lập từ tỉnh Nghệ An (NA06)



Hình 4.18. Cấu trúc và thành phần gen của toàn bộ genome vi rút LSD phân lập từ tỉnh Hà Tĩnh (HT18)



Hình 4.19. Cấu trúc và thành phần gen của toàn bộ genome vi rút LSD phân lập từ tỉnh Quảng Bình (Quảng Trị) (QB09)

Để tiếp tục phân tích mối quan hệ và sự tương đồng của ba chủng vi rút HT18, NA06 và QB09 với các chủng tham chiếu trên thế giới và các chủng phân lập tại Việt Nam kết quả được trình bày tại Hình 4.13-4.15.

Kết quả ở hình 4.13-4.15 cho thấy, cả ba chủng HT18, NA06 và QB09 có độ tương đồng cao so với các chủng vi rút LSD phân lập tại các nước như Trung Quốc, Thái Lan, Indonesia và các chủng vi rút LSD phân lập tại Việt Nam năm 2020. Toàn bộ trình tự bộ gen của ba chủng vi rút NA06, HT18 và QB09 đã được đăng tải trên ngân hàng dữ liệu GenBank thế giới với mã số đăng ký từ PQ859562-PQ859564.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/HLU2022, complete genome	Lumpy skin dis...	2.784e+05	2.911e+05	99%	0.0	99.99%	151411	OQ555860.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/FJ2021, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.883e+05	99%	0.0	100.00%	150726	OP922506.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV, Indonesia 2022, S4, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.907e+05	99%	0.0	99.99%	151009	OR232414.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV, Indonesia 2022, S1, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.907e+05	99%	0.0	99.99%	151010	OR232413.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 65A14015, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.909e+05	99%	0.0	99.99%	150856	OR735987.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/Thailand/Trang/2022, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.907e+05	99%	0.0	99.99%	150812	OQ511520.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 138156/04, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.906e+05	99%	0.0	99.99%	150857	OR347834.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 65A09027, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.906e+05	99%	0.0	99.99%	150856	OR347836.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 65A01032, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.909e+05	99%	0.0	99.99%	150854	OR347835.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/Thailand/YST/2021, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.893e+05	99%	0.0	100.00%	150689	OM033705.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 508800/04, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.893e+05	99%	0.0	100.00%	150688	OQ253252.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/China/XJ01/2019, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.884e+05	99%	0.0	99.99%	150697	OM105589.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate A04224595, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.893e+05	99%	0.0	100.00%	150689	PQ037207.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/Thailand/PraChuaPhirinKhan/2021, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.909e+05	99%	0.0	99.99%	150812	OQ349895.1
✓	Lumpy skin disease virus strain 20L42, Quyet-Thang/VNM/20	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.892e+05	99%	0.0	100.00%	150685	MZ577073.1
✓	Lumpy skin disease virus strain 20L81, Bang-Thanh/VNM/20	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.893e+05	99%	0.0	100.00%	150684	MZ577076.1
✓	Lumpy skin disease virus strain China/GX01/2020, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.892e+05	99%	0.0	100.00%	150685	OM803092.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 85F12950, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.892e+05	99%	0.0	99.98%	150689	OQ287777.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 65A13853, complete genome	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.887e+05	99%	0.0	99.98%	150653	OQ253250.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/FJ/CHA/2021, complete genome	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.915e+05	99%	0.0	99.99%	150776	OP752701.1
✓	Lumpy skin disease virus strain 20L70, Dinh-To/VNM/20	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.881e+05	99%	0.0	100.00%	150600	MZ577075.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/KM/Taiwan/2020, complete genome	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.900e+05	99%	0.0	99.99%	150822	OL752713.2
✓	Lumpy skin disease virus strain 20L43, Ly-Quoc/VNM/20	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.881e+05	99%	0.0	100.00%	150599	MZ577074.1
✓	Lumpy skin disease virus strain China/GD02/2020, complete genome	Lumpy skin dis...	2.780e+05	2.885e+05	99%	0.0	99.99%	150610	OM803091.1
✓	Lumpy skin disease virus strain China/GD01/2020, complete genome	Lumpy skin dis...	2.780e+05	2.880e+05	99%	0.0	99.99%	150606	MW355944.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV, BH3/CHN/20, complete genome	Lumpy skin dis...	2.780e+05	2.894e+05	99%	0.0	99.97%	150873	OM373209.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV72/PrachuapKhirkhan/Thailand/2021, complete genome	Lumpy skin dis...	2.779e+05	2.894e+05	99%	0.0	99.99%	150602	ON152411.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/China/SX/2023, complete genome	Lumpy skin dis...	2.779e+05	2.875e+05	99%	0.0	99.97%	150575	PP884832.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate China/Xinjiang/Cattle/Aug-2019, complete genome	Lumpy skin dis...	2.777e+05	2.882e+05	99%	0.0	99.97%	150532	OP508345.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/MZGD/2020/China, complete genome	Lumpy skin dis...	2.777e+05	2.894e+05	99%	0.0	99.98%	150644	OP885536.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/HongKong/2020	Lumpy skin dis...	2.773e+05	2.870e+05	99%	0.0	99.94%	150513	MW732849.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/NMG/2020, partial genome	Lumpy skin dis...	2.737e+05	2.814e+05	99%	0.0	99.99%	148453	ON616408.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/Russia/Saratov/2017	Lumpy skin dis...	2.732e+05	2.830e+05	99%	0.0	99.41%	150606	MH646874.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/Kurgan/2018, complete genome	Lumpy skin dis...	2.728e+05	2.808e+05	99%	0.0	99.43%	150270	OR194148.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV-WB/IND/19, complete genome	Lumpy skin dis...	2.722e+05	2.846e+05	99%	0.0	99.24%	150989	OP297402.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 13092022, complete genome	Lumpy skin dis...	2.720e+05	2.835e+05	99%	0.0	99.24%	150797	PQ201927.1
✓	Lumpy skin disease virus strain KSGP 0240	Lumpy skin dis...	2.719e+05	2.818e+05	99%	0.0	99.25%	150683	KX683219.1
✓	Lumpy skin disease virus NI-2490, complete genome	Lumpy skin dis...	2.719e+05	2.846e+05	99%	0.0	99.25%	150773	NC_003027.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate SAUVM-78, complete genome	Lumpy skin dis...	2.718e+05	2.846e+05	99%	0.0	99.24%	151038	PP979138.1

Hình 4.20. So sánh kết quả giải trình tự toàn bộ genome vi rút LSD phân lập từ tỉnh Nghệ An (NA06) trên ngân hàng dữ liệu Genbank

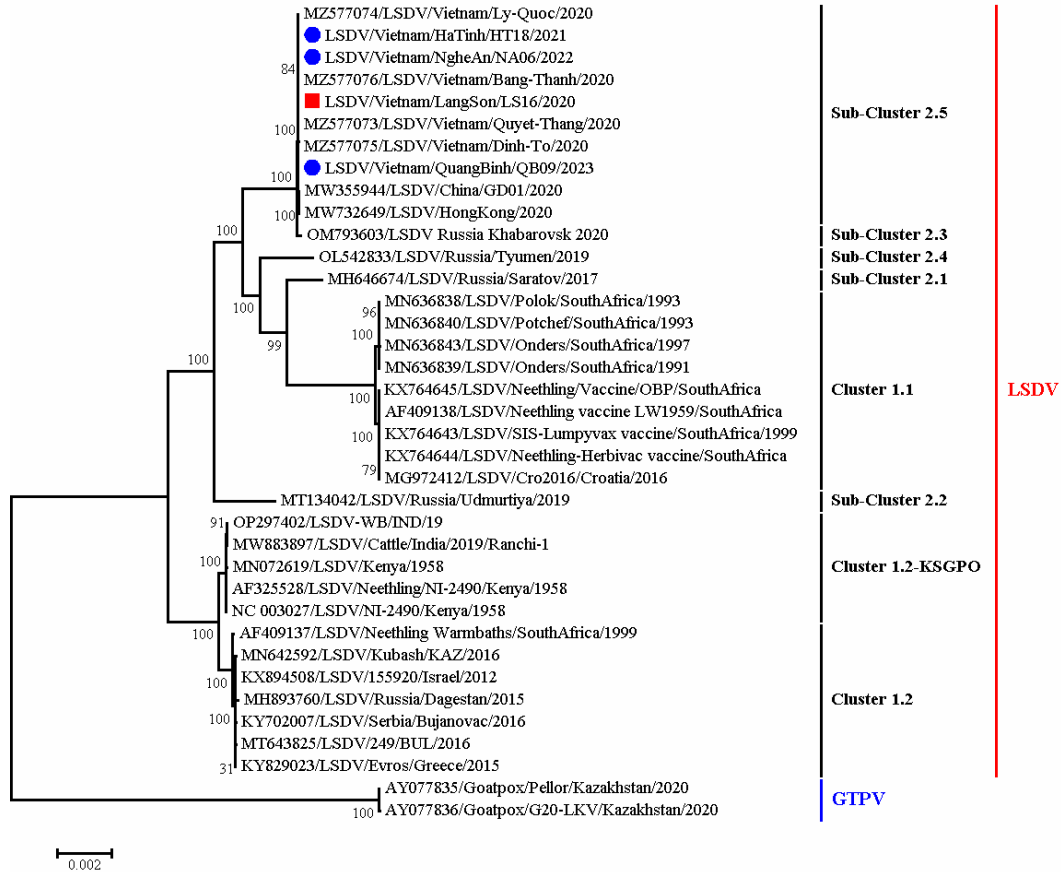
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV, Indonesia 2022, S4, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.806e+05	99%	0.0	100.00%	151008	OR232414.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/HLJ2022, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.808e+05	99%	0.0	99.99%	151411	OQ555680.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV, Indonesia 2022, S1, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.805e+05	99%	0.0	99.99%	151010	OR232413.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 85A14015, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.805e+05	99%	0.0	100.00%	150856	OR735987.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/Thailand/Trang/2022, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.806e+05	99%	0.0	100.00%	150812	OQ511520.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 138158/04, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.805e+05	99%	0.0	100.00%	150857	OR347834.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 85A09027, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.805e+05	99%	0.0	100.00%	150858	OR347838.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/Thailand/YST/2021, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.892e+05	99%	0.0	100.00%	150689	OM033705.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 508800/04, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.892e+05	99%	0.0	100.00%	150688	OQ253252.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 85A01032, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.805e+05	99%	0.0	100.00%	150854	OR347835.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate A04224595, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.892e+05	99%	0.0	100.00%	150689	PQ037207.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/China/XJ01/2019, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.883e+05	99%	0.0	99.99%	150697	OM105589.1
✓	Lumpy skin disease virus strain 20L42 Quyét-Thang/VNM/20	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.892e+05	99%	0.0	100.00%	150685	MZ577073.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/Thailand/PraChua/KhinKhan/2021, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.805e+05	99%	0.0	99.99%	150812	OQ349885.1
✓	Lumpy skin disease virus strain 20L81 Bang-Thanh/VNM/20	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.892e+05	99%	0.0	100.00%	150684	MZ577078.1
✓	Lumpy skin disease virus strain China/GX01/2020, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.892e+05	99%	0.0	100.00%	150685	OM803092.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 85F12959, complete genome	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.891e+05	99%	0.0	99.98%	150689	OQ267777.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/FJ/2021, complete genome	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.881e+05	99%	0.0	99.99%	150728	OP922508.1
✓	Lumpy skin disease virus strain 20L70 Dinh-To/VNM/20	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.881e+05	99%	0.0	100.00%	150690	MZ577075.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 85A13853, complete genome	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.888e+05	99%	0.0	99.98%	150653	OQ253250.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/KM/Taiwan/2020, complete genome	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.800e+05	99%	0.0	99.99%	150822	OL752713.2
✓	Lumpy skin disease virus strain 20L43 Ly-Quoc/VNM/20	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.881e+05	99%	0.0	100.00%	150599	MZ577074.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/FJ/CHA/2021, complete genome	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.914e+05	99%	0.0	100.00%	150776	QP752701.1
✓	Lumpy skin disease virus strain China/GD02/2020, complete genome	Lumpy skin dis...	2.780e+05	2.885e+05	99%	0.0	99.99%	150610	OM803091.1
✓	Lumpy skin disease virus strain China/GD01/2020, complete genome	Lumpy skin dis...	2.780e+05	2.879e+05	99%	0.0	99.99%	150606	MW355944.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV BH3/CHN/20, complete genome	Lumpy skin dis...	2.780e+05	2.893e+05	99%	0.0	99.97%	150873	OM373209.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV72/PraChua/KhinKhan/Thailand/2021, complete genome	Lumpy skin dis...	2.779e+05	2.893e+05	99%	0.0	100.00%	150802	ON152411.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/China/SX/2023, complete genome	Lumpy skin dis...	2.779e+05	2.875e+05	99%	0.0	99.97%	150575	PP984832.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate China/Xinjiang/Cattle/Aug-2019, complete genome	Lumpy skin dis...	2.777e+05	2.881e+05	99%	0.0	99.96%	150532	OP508345.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/MZGD/2020/China, complete genome	Lumpy skin dis...	2.777e+05	2.894e+05	99%	0.0	99.98%	150644	OP985536.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/HongKong/2020	Lumpy skin dis...	2.773e+05	2.870e+05	99%	0.0	99.94%	150513	MW732649.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/NMG/2020, partial genome	Lumpy skin dis...	2.737e+05	2.814e+05	99%	0.0	100.00%	148453	ON618408.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/Russia/Saratov/2017	Lumpy skin dis...	2.732e+05	2.829e+05	99%	0.0	99.41%	150606	MH648674.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/Kurgan/2018, complete genome	Lumpy skin dis...	2.728e+05	2.808e+05	99%	0.0	99.43%	150270	QR194148.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 13082022, complete genome	Lumpy skin dis...	2.720e+05	2.834e+05	99%	0.0	99.24%	150797	PQ201927.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV-WB/IND/19, complete genome	Lumpy skin dis...	2.720e+05	2.843e+05	99%	0.0	99.24%	150969	OP297402.1
✓	Lumpy skin disease virus strain KSGP 0240	Lumpy skin dis...	2.719e+05	2.818e+05	99%	0.0	99.25%	150683	KX683219.1
✓	Lumpy skin disease virus NI-2490, complete genome	Lumpy skin dis...	2.718e+05	2.845e+05	99%	0.0	99.25%	150773	NC_003027.1

Hình 4.21. So sánh kết quả giải trình tự toàn bộ genome vi rút LSD phân lập từ tỉnh Hà Tĩnh (HT18) trên ngân hàng dữ liệu Genbank

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/HLJ2022, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.812e+05	99%	0.0	99.99%	151411	OQ555860.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV_Indonesia_2022_S4, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.909e+05	99%	0.0	99.99%	151009	OR232414.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV_Indonesia_2022_S1, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.909e+05	99%	0.0	99.99%	151010	OR232413.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 65A14015, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.909e+05	99%	0.0	99.99%	150856	OR735987.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/Thailand/Trang/2022, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.909e+05	99%	0.0	99.99%	150812	OQ511520.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 138158/64, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.909e+05	99%	0.0	99.99%	150857	OR347834.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 65A09027, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.909e+05	99%	0.0	99.99%	150856	OR347836.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 65A01032, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.909e+05	99%	0.0	99.99%	150854	OR347835.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/Thailand/YST/2021, complete genome	Lumpy skin dis...	2.783e+05	2.894e+05	99%	0.0	100.00%	150689	OM033705.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 508800/64, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.894e+05	99%	0.0	100.00%	150688	OQ253252.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate A04224585, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.894e+05	99%	0.0	100.00%	150689	PQ037207.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/Thailand/PraChuaPhinKhan/2021, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.908e+05	99%	0.0	99.99%	150812	OQ349895.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/China/XJ01/2019, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.885e+05	99%	0.0	99.99%	150697	OM105589.1
✓	Lumpy skin disease virus strain 20L42 Quyét-Thang/VNM/20	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.894e+05	99%	0.0	100.00%	150685	MZ577073.1
✓	Lumpy skin disease virus strain 20L81 Bang-Thanh/VNM/20	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.894e+05	99%	0.0	100.00%	150684	MZ577078.1
✓	Lumpy skin disease virus strain China/GX01/2020, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.894e+05	99%	0.0	100.00%	150685	OM803092.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/FJ2021, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.883e+05	99%	0.0	100.00%	150726	OP922508.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 65F12958, complete genome	Lumpy skin dis...	2.782e+05	2.893e+05	99%	0.0	99.98%	150689	OQ287777.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/FJ/CHA/2021, complete genome	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.917e+05	99%	0.0	99.99%	150776	OP752701.1
✓	Lumpy skin disease virus strain 20L70 Dinh-To/VNM/20	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.882e+05	99%	0.0	100.00%	150600	MZ577075.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 65A13853, complete genome	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.888e+05	99%	0.0	99.98%	150653	OQ253250.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/KM/Taiwan/2020, complete genome	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.898e+05	99%	0.0	99.97%	150822	OL752713.2
✓	Lumpy skin disease virus strain 20L43 Ly-Quoc/VNM/20	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.882e+05	99%	0.0	100.00%	150599	MZ577074.1
✓	Lumpy skin disease virus strain China/GD02/2020, complete genome	Lumpy skin dis...	2.781e+05	2.884e+05	99%	0.0	99.99%	150610	OM803091.1
✓	Lumpy skin disease virus strain China/GD01/2020, complete genome	Lumpy skin dis...	2.780e+05	2.881e+05	99%	0.0	99.99%	150606	MW355944.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV_BH3/CHN/20, complete genome	Lumpy skin dis...	2.780e+05	2.893e+05	99%	0.0	99.95%	150873	OM373209.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV72/PrachuapKhiriKhan/Thailand/2021, complete genome	Lumpy skin dis...	2.780e+05	2.895e+05	99%	0.0	99.99%	150602	ON152411.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/China/SX/2023, complete genome	Lumpy skin dis...	2.779e+05	2.875e+05	99%	0.0	99.97%	150575	PP894832.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/MZGD/2020/China, complete genome	Lumpy skin dis...	2.777e+05	2.895e+05	99%	0.0	99.98%	150644	OP985538.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate China/Xinjiang/Cattle/Aug-2019, complete genome	Lumpy skin dis...	2.777e+05	2.883e+05	99%	0.0	99.97%	150532	OP508345.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/HongKong/2020	Lumpy skin dis...	2.773e+05	2.871e+05	99%	0.0	99.94%	150513	MW732849.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/NMG/2020, partial genome	Lumpy skin dis...	2.738e+05	2.816e+05	99%	0.0	99.99%	148453	ON616408.1
✓	Lumpy skin disease virus strain LSDV/Russia/Saratov/2017	Lumpy skin dis...	2.732e+05	2.831e+05	99%	0.0	99.41%	150606	MH646874.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV/Kurgan/2018, complete genome	Lumpy skin dis...	2.728e+05	2.808e+05	99%	0.0	99.43%	150270	OR194148.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate LSDV-WB/IND/19, complete genome	Lumpy skin dis...	2.721e+05	2.847e+05	99%	0.0	99.24%	150989	OP297402.1
✓	Lumpy skin disease virus isolate 13092022, complete genome	Lumpy skin dis...	2.720e+05	2.837e+05	99%	0.0	99.24%	150797	PQ201927.1
✓	Lumpy skin disease virus strain KSGP 0240	Lumpy skin dis...	2.719e+05	2.819e+05	99%	0.0	99.25%	150683	KX683219.1
✓	Lumpy skin disease virus NI-2490, complete genome	Lumpy skin dis...	2.719e+05	2.848e+05	99%	0.0	99.24%	150773	NC_003027.1

Hình 4.22. So sánh kết quả giải trình tự toàn bộ genome vi rút LSD phân lập từ tỉnh Quảng Bình (QB09) trên ngân hàng dữ liệu Genbank

4.3.5. Kết quả phân tích mối quan hệ giữa các chủng vi rút LSD tại Việt Nam với các chủng tham chiếu đã được công bố trên ngân hàng gen (Genbank) dựa vào trình tự toàn bộ genome



Hình 4.23. Cây phả hệ phát sinh mối quan hệ của một số chủng vi rút LSD phân lập tại Việt Nam và trên thế giới dựa vào toàn bộ trình tự genome của vi rút

Dựa vào phân tích trình tự toàn bộ genome của vi rút gây bệnh VDNC được chia thành 03 nhóm chính (cluster) bao gồm cluster 1.1, cluster 1.2 và cluster 2. Cluster 1.1 bao gồm các chủng vi rút LSD phân lập sớm từ Nam Phi những năm 1950s, đại diện là chủng vi rút Neethling-LW1959 (AF409138.1) đã được giảm độc lực để trở thành chủng vắc xin lưu hành trên thế giới (Badhy và cs, 2021; Schalkwyk và cs, 2022). Sự phân bố của Cluster 1.1 bị hạn chế bởi địa lý, do vậy sự lưu hành của cluster 1.1 không phổ biến tại các quốc gia khác (Hình 4.16). Ngược lại thì Cluster 1.2 lại có phổ lưu hành rộng rãi hơn từ Châu Phi, Trung Đông, Châu Âu và Châu Á (Schalkwyk và cs, 2022). Cluster 1.2 lần đầu tiên được

phân lập và ghi nhận tại Kenya, với chủng đại diện là KSGPO 240-Kenya 1959 (KX683216), sau đó lan rộng ra các nước Châu Phi khác, Châu Âu và Châu Á. Cluster 1.2 được chia thành 03 sub-cluster nhỏ bao gồm sub-Cluster 1.2 truyền thống từ những ổ dịch đầu tiên, sub-cluster 1.2-KSGPO năm 2019 tại Ấn Độ đại diện là chủng LSDV Ranchi-1 India 2019 (MW883897) và sub-cluster 1.2-KSPO-India 2020 đại diện là chủng LSDV 208/PVNRTVU India 2020 (ON400507) (Hình 4.16).

Hiện nay, vi rút LSD cluster 2 đang lưu hành rộng rãi trên thế giới trải dài từ các quốc gia Châu Phi qua Châu Âu và Châu Á. Dựa trên trình tự toàn bộ genome của vi rút LSD người ta đã xác định được 05 sub-cluster 2 hiện đang lưu hành trên thế giới bao gồm sub-cluster 2.1-2.5 (Krotova và cs, 2022a; Krotova và cs, 2022b; Sprygin và cs, 2018c). Sub-cluster 2.1 đầu tiên được phân lập là chủng vi rút tái tổ hợp tại Saratov của Nga năm 2017, đại diện là chủng LSDV/Saratov/Russia/2017 (MH646674) (Krotova và cs, 2022a; Krotova và cs, 2022b; Sprygin và cs, 2018c). Sub-cluster 2.2 cũng được phân lập tại Nga năm 2019 với chủng đại diện là LSDV/Russia/Udmurtiya/2019 (MT134042), về mặt di truyền chủng này có sự khác biệt với chủng Saratov của Nga năm 2017 (Hình 3.36). Sub-cluster 2.3 đại diện là Kostanay/Kazakhstan/2018 (MT992618), nhưng không có bất kỳ thông tin gì liên quan đến chủng này (Hình 4.16). Sub-cluster 2.4 cũng được phát hiện tại Nga năm 2019, đại diện là chủng LSDV/Russia/Tyumen/2019. Phân tích di truyền cho thấy chủng này tương đồng đến 38% SNP với KSGPO-240 và 62% với vắc xin Neethling-LW-1959, dẫn đến mối quan hệ phát sinh loài gần hơn với sub-cluster 1.1 (Krotova và cs, 2022b; Krotova và cs, 2022c).

Sub-cluster 2.5 lần đầu tiên được mô tả trong một đợt bùng phát ở khu vực Tân Cương của Trung Quốc vào năm 2019, đại diện là chủng LSDV/China/GD01/2019 (MW355944) và chủng LSDV/China/XJ201901 (OM984495) (Lu và cs, 2020).

Bảng 4.6. Khoảng cách di truyền về trình tự nucleotide của các chủng vi rút LSD phân lập tại Việt Nam và các chủng tham chiếu trên thế giới dựa vào trình tự toàn bộ genome vi rút

TT	Chủng vi rút LSD	Cluster	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		
1	Kubash/KAZ/2016	1.2																																	
2	249/BUL/2016	1.2	0.000																																
3	Evros/Greece/2015	1.2	0.000	0.000																															
4	Serbia/Bujanovac/2016	1.2	0.000	0.000	0.000																														
5	155920/Israel/2012	1.2	0.000	0.000	0.000	0.000																													
6	Neethling_Warmbaths/SouthAfrica/1999	1.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																												
7	Russia/Dagestan/2015	1.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																											
8	Kenya/1958	1.2-KSGPO	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001																										
9	NI-2490/Kenya/1958	1.2-KSGPO	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000																								
10	Neethling/NI-2490/Kenya/1958	1.2-KSGPO	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000																							
11	WB/IND/19	1.2-KSGPO	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000																						
12	Cattle/India/2019/Ranchi-1	1.2-KSGPO	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000																					
13	China/GD01/2020	2.5	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007																				
14	Vietnam/Quyet-Thang/2020	2.5	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.000																			
15	Vietnam/LangSon/LS16/2020	2.5	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.000	0.000																		
16	Vietnam/Ly-Quoc/2020	2.5	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.000	0.000	0.000																	
17	Vietnam/Bang-Thanh/2020	2.5	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000																
18	Vietnam/NgheAn/NA06/2022	2.5	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000															

Các chủng vi rút thuộc sub-cluster 2.5 đã chứng minh khả năng lây lan dịch bệnh nhanh chóng, bằng chứng là các chủng vi rút này đã lây lan rộng khắp Trung Quốc, Việt Nam, Đài Loan, Thái Lan, Campuchia, Malaysia và Indonesia, Mông Cổ và Nga vào năm 2020. Các chủng vi rút thuộc sub-cluster 2.5 này có 48% SNP giống hệt với KSGPO-240 và 52% giống hệt với vắc xin Neethling-LW-1959 (Krotova và cs, 2022b). Đáng chú ý, trong cùng thời gian, sub-cluster 2.5 tái tổ hợp mới đang lan rộng khắp Đông Nam Á, một trong những chủng bố mẹ của nó, chủng vắc xin KSGPO-240, đã lan rộng khắp Bangladesh, Ấn Độ, Myanmar, Nepal, Bhutan, Pakistan và Sri-Lanka. Cho đến nay, chưa có báo cáo nào về sự tái tổ hợp tiếp theo giữa sub-cluster tái tổ hợp 2.5 và các chủng vắc xin bố mẹ KSGPO-240 (Mazloum và cs, 2023). Dựa trên phân tích phá hệ di truyền và phân tích trình tự toàn bộ genome của ba chủng vi rút phân lập tại các tỉnh Bắc Trung Bộ của Việt Nam cho thấy, chủng vi rút, NA06, HT18 và QB09 có độ tương đồng cao, dao động từ 99.6-99.8% so với các chủng vi rút LSD phân lập tại Trung Quốc như LSDV/China/GD01/2019 (MW355944) và chủng LSDV/China/XJ201901 (OM984495) và nằm trong nhóm vi rút LSD tái tổ hợp sub-cluster 2.5 đang lưu hành tại Việt Nam và các nước Đông Nam Châu Á.

4.3.6. Tính ổn định di truyền của ba chủng vi rút LSD gây bệnh VDNC qua các đời cấy chuyển trên tế bào dòng MDBK

Để đánh giá sự bảo tồn kháng nguyên cũng như xác định sự bảo tồn vật chất di truyền, chúng tôi tiến hành giải trình tự đoạn gen P32 của 03 chủng vi rút sau 10, 20 và 30 đời cấy chuyển. Kết quả giải trình tự gen P32 của 03 chủng vi rút LSD gồm LSDV-NA06, LSDV-HT18 và LSDV-QB09 qua các đời cấy chuyển thứ 10, 20 và 30 được thể hiện qua hình 4.17.

Kết quả hình 4.17 cho thấy cả ba chủng đều có độ tương đồng gen P32 đạt 100% với nhau và với chủng Tân Cương Trung Quốc 2019, không có sự sai khác hay thay đổi về vật chất di truyền trong 30 lần cấy chuyển trên tế bào dòng MDBK. Sự tương đồng này phản ánh đặc điểm di truyền của 03 chủng vi rút LSD đang lưu hành tại Việt Nam ổn định, đồng thời cung cấp dữ liệu quan trọng về đặc tính kháng nguyên

phục vụ công tác nghiên cứu phát triển vắc xin phòng bệnh VDNC sử dụng chủng thực địa phân lập tại Việt Nam.



Hình 4.24. Kết quả alignment trình tự P32 của 3 chủng vi rút LSD phân lập tại khu vực Bắc Trung Bộ sau 10 đời, 20 đời và 30 đời cấy chuyển so với chủng Tân Cương Trung Quốc

4.3.7. Xác định sự có mặt của vi rút LSD sau khi gây nhiễm trên động vật bằng chứng thực địa

Động vật thí nghiệm gồm 12 bê cùng nguồn gốc, độ tuổi, thể trạng được chia làm 4 lô, mỗi lô có 3 con. Lô 1 được gây nhiễm vi rút với liều gây nhiễm 2×10^6 TCID₅₀/mL, lô 2 với liều gây nhiễm $2 \times 10^{6,5}$ TCID₅₀/mL và lô 3 với liều gây nhiễm 2×10^7 TCID₅₀/mL chủng LSDV/Vietnam/Nghe an/NA06 (NA06). Trước thí nghiệm tất cả bê khỏe mạnh, không có biểu hiện lâm sàng của bệnh Lở mồm long móng, Tụ huyết trùng, Lao, Tiêu chảy và VDNC. Tất cả các lô thí nghiệm đều được tiến hành kiểm tra sự có mặt của kháng thể kháng vi rút gây bệnh VDNC bằng phương pháp ELISA và sự có mặt của vi rút gây bệnh VDNC bằng phương pháp real-time PCR. Kết quả được thể hiện ở bảng 4.10 cho thấy toàn bộ bê thí nghiệm đều cho kết quả âm tính với vi rút gây bệnh VDNC (không có giá Ct) và không phát hiện thấy kháng thể kháng vi rút gây bệnh VDNC (Chỉ số S/P% < 30).

Bảng 4.10. Kết quả đánh giá sự có mặt của vi rút LSD và kháng thể kháng vi rút gây bệnh VDNC của bò trước khi gây nhiễm

TT	Ký hiệu	Nhóm		Kết quả ELISA	Kết quả Relatime-PCR
1	Bv-01	Đối chứng âm		Âm tính	Âm tính
2	Bv-02			Âm tính	Âm tính
3	Bv-03			Âm tính	Âm tính
4	Bv-04	Lô gây nhiễm 01		Âm tính	Âm tính
5	Bv-05			Âm tính	Âm tính
6	Bv-06			Âm tính	Âm tính
7	Bv-07	Lô gây nhiễm 02		Âm tính	Âm tính
8	Bv-08			Âm tính	Âm tính
9	Bv-09			Âm tính	Âm tính
10	Bv-10	Lô gây nhiễm 03		Âm tính	Âm tính
11	Bv-11			Âm tính	Âm tính
12	Bv-12			Âm tính	Âm tính

Sau khi tiến hành gây nhiễm, lấy mẫu máu 2 ngày/lần để kiểm tra sự xuất hiện của vi rút LSD kết quả trình bày tại bảng 4.11.

Kết quả real-time PCR cho thấy vi rút LSD đã được phát hiện trong mẫu máu của bê sau khi gây nhiễm với các Ct khác nhau. Lô 3 được gây nhiễm với liều 2×10^7 TCID₅₀/mL, vi rút được phát hiện sớm nhất vào ngày thứ 3 sau gây nhiễm, với giá trị Ct là 36,3. Ở lô 1 và lô 2, với liều lần lượt là 2×10^6 và $2 \times 10^{6,5}$ TCID₅₀/mL, vi rút chỉ được phát hiện ở 2/6 cá thể bê tại thời điểm 5 ngày sau gây nhiễm, với giá trị Ct lần lượt là 37,7 và 37,0. Đến ngày thứ 7 sau gây nhiễm, tất cả bê trong ba lô gây nhiễm đều cho kết quả dương tính với vi rút LSD. Giá trị Ct phản ánh mức độ nhân lên của vi rút, với sự khác biệt rõ rệt giữa các nhóm liều: lô 3 có giá trị Ct thấp nhất (28,3–29,4), tiếp theo là lô 2 (32,4–35,3), và cuối cùng là lô 1 (32,6–36,8). Từ những kết quả này có thể nói rằng quá trình gây nhiễm vi rút LSD chủng NA06 đã được thực hiện thành công, đồng thời cho thấy mức độ nhân lên của vi rút có tăng lên khi liều lượng gây nhiễm tăng.

Bảng 4.11. Kết quả kiểm tra sự xuất hiện của vi rút LSD trong máu bò thí nghiệm bằng phương pháp Real time PCR

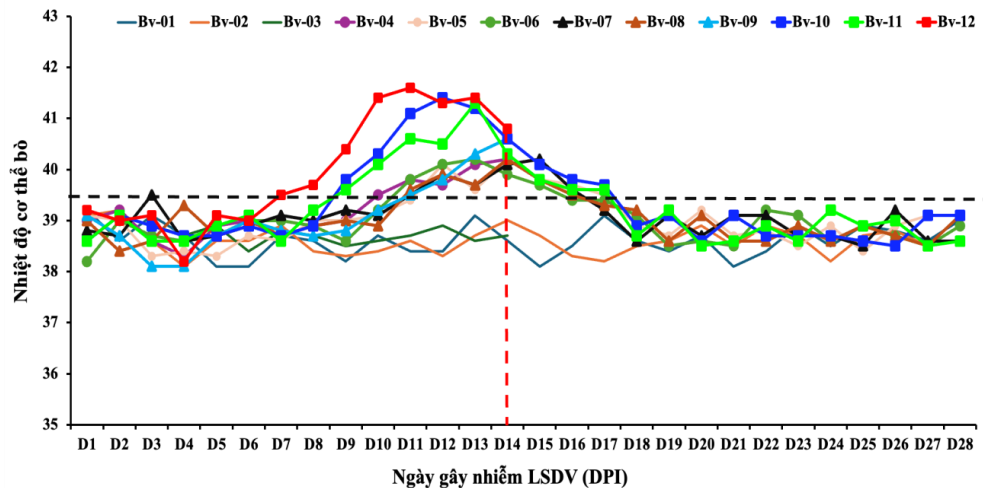
TT	Ký hiệu	Nhóm	Liều vi rút gây nhiễm	Kết quả real-time PCR mẫu máu (giá trị Ct)			
				D1	D3	D5	D7
1	Bv-01	Đôi chứng âm	0	-	-	-	-
2	Bv-02		0	-	-	-	-
3	Bv-03		0	-	-	-	-
4	Bv-04	Lô gây nhiễm 01	2×10^6	-	-	37,7	32,6
5	Bv-05		2×10^6	-	-	-	36,3
6	Bv-06		2×10^6	-	-	-	36,8
7	Bv-07	Lô gây nhiễm 02	$2 \times 10^{6,5}$	-	-	-	35,0
8	Bv-08		$2 \times 10^{6,5}$	-	-	37,0	32,4
9	Bv-09		$2 \times 10^{6,5}$	-	-	-	35,3
10	Bv-10	Lô gây nhiễm 03	2×10^7	-	-	35,4	29,4
11	Bv-11		2×10^7	-	-	36,3	31,2
12	Bv-12		2×10^7	-	36,3	33,2	28,3

Ghi chú: '-': không có giá trị Ct; D (dpi): ngày sau gây nhiễm

Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó, trong đó vi rút LSD được phát hiện trong máu từ ngày thứ 3 đến thứ 7 sau gây nhiễm. Ngoài ra, các nghiên cứu này còn cho thấy vi rút có thể được phát hiện trong các mẫu ngoáy mũi, miệng ở khoảng thời gian từ 5–7 ngày sau gây nhiễm (Kononov và cs, 2019b; Wolff và cs, 2020b).

4.3.8. Kết quả đánh giá các triệu chứng lâm sàng của bê được gây nhiễm vi rút LSD chủng NA06

Sau khi gây nhiễm vi rút LSD, bê thí nghiệm được đo thân nhiệt hằng ngày vào hai thời điểm cố định là 9 giờ sáng và 16 giờ chiều. Số liệu được ghi chép và phân tích. Kết quả kiểm tra thân nhiệt của bê thí nghiệm sau gây nhiễm với chủng vi rút NA06 được thể hiện ở hình 4.25 (bê sốt nếu thân nhiệt lớn hơn $39,5^{\circ}\text{C}$).



Hình 4.25. Kết quả kiểm tra thân nhiệt của bê sau khi gây nhiễm vi rút LSD

Hình 4.25 cho thấy bê thí nghiệm bắt đầu xuất hiện triệu chứng sốt nhẹ ($39,5 - 40,0^{\circ}\text{C}$) từ ngày thứ 5 sau gây nhiễm. Thân nhiệt tiếp tục tăng và đạt đỉnh trong khoảng $40,6 - 41,6^{\circ}\text{C}$ vào thời điểm 11–12 sau gây nhiễm, sau đó giảm dần và trở về ngưỡng sinh lý bình thường ($38,7 - 39,4^{\circ}\text{C}$) vào các ngày 15–17 sau gây nhiễm. Sự gia tăng thân nhiệt này đi kèm với hiện tượng giảm tiêu thụ thức ăn, được ghi nhận rõ rệt trong khoảng 7–10 ngày sau gây nhiễm. Ngược lại, nhóm đối chứng duy trì thân nhiệt ổn định trong khoảng $38,3 - 39,2^{\circ}\text{C}$, không có biểu hiện sốt hoặc sức khỏe bất thường.

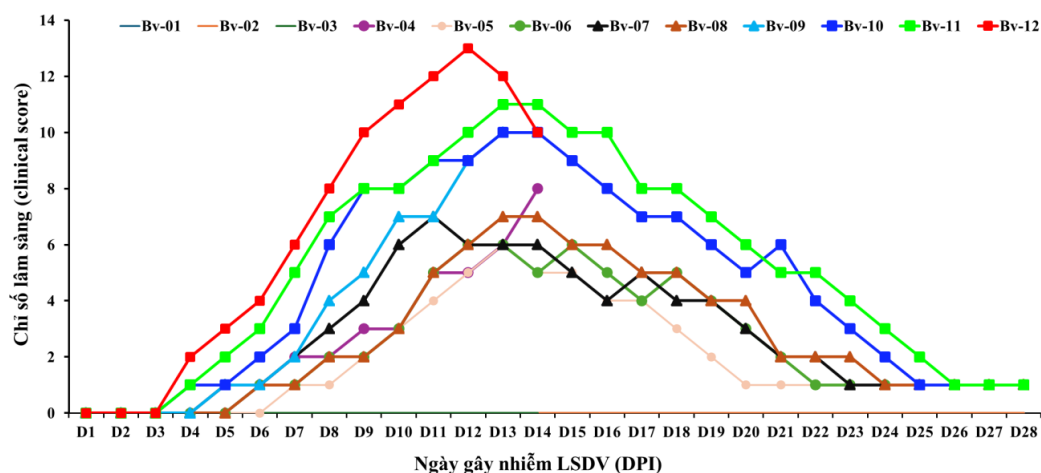
Phân tích theo từng lô thí nghiệm cho thấy mức độ sốt có tương quan với liều vi rút gây nhiễm. Ở lô 3 (liều 10^7 TCID₅₀/mL), bê bắt đầu sốt từ 5 đến 15 ngày sau gây nhiễm, với thân nhiệt dao động từ $39,6 - 41,6^{\circ}\text{C}$. Cá thể BV-12 trong lô này có thân nhiệt cao nhất, kèm theo các triệu chứng lâm sàng nghiêm trọng như suy hô hấp, viêm khớp và sự xuất hiện nhiều nốt sần trên da. Trong khi đó, bê ở lô 1 (10^6 TCID₅₀/mL) và lô 2 ($10^{6,5}$ TCID₅₀/mL) có biểu hiện sốt nhẹ hơn ($39,5 - 40,2^{\circ}\text{C}$), khởi phát từ ngày thứ 5 và kéo dài đến 17 ngày sau gây nhiễm. Thời gian

sốt trung bình trong hai lô này là khoảng 7 ngày, sau đó thân nhiệt giảm và các cá thể bê phục hồi với trạng thái sinh lý bình thường. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với các nghiên cứu trước đó khi nhiệt độ cơ thể của hầu hết động vật thí nghiệm bắt đầu tăng vào khoảng 5 đến 9 ngày sau gây nhiễm và sốt kéo dài từ 6 đến 9 ngày thậm chí hơn 10 ngày. Thí nghiệm của Adamu và cs (2024) ở bê 4,5 tháng tuổi với liều vi rút LSD $10^{3,9}$ TCID₅₀. Nhiệt độ trực tràng tăng vào ngày thứ 4 sau gây nhiễm và kéo dài đến ngày thứ 15, trường hợp nghiêm trọng bê sốt (> 39,5 °C). Thí nghiệm của Shumilova và cs (2024) trên bê đực 6-8 tháng tuổi với chủng vi rút Udmurtiya/2019 5 log TCID₅₀/mL, dấu hiệu đầu tiên của sự gia tăng nhiệt độ cơ thể (41,1°C–41,5°C) được ghi nhận vào ngày thứ 7 sau gây nhiễm. Đối với bò 1,5-2 năm tuổi được gây nhiễm có phản ứng toàn thân ở ngày thứ 4 sau khi gây nhiễm. Sang ngày thứ 5 sau gây nhiễm, nhiệt độ cơ thể tăng lên 41,0°C và sốt kéo dài trong khoảng 39,5–40,0°C trong hai ngày tiếp theo (Kutumbetov và cs, 2025). Nhiều trường hợp nhiệt độ tăng từ 40,6–42°C và có đỉnh sốt vào ngày thứ 10 đến ngày thứ 13 sau gây nhiễm, trước khi bắt đầu giai đoạn sốt kéo dài (Wolff và cs, 2020a). Kèm theo sốt là hiện tượng động vật bỏ ăn hoặc ăn kém hơn, trạng thái cơ thể ủ rũ ít vận động cùng với uống nhiều nước ở đỉnh sốt (Adamu và cs, 2024; Shumilova và cs, 2024; Kutumbetov và cs, 2025).

Ngoài việc theo dõi thân nhiệt, bê thí nghiệm cũng được quan sát và đánh giá triệu chứng lâm sàng hàng ngày và chấm điểm theo thang chấm điểm như trong mô tả ở phần phương pháp (Carn và Kitching, 1995a). Triệu chứng lâm sàng bò thí nghiệm được trình bày trong Bảng 4.12 và Hình 4.26-4.28.

Sau khi gây nhiễm vi rút LSD, các biểu hiện lâm sàng đầu tiên được ghi nhận từ 4–6 ngày sau nhiễm, với mức độ và thời điểm khởi phát khác nhau tùy theo liều lượng vi rút. Các triệu chứng bao gồm giảm hoạt động, ủ rũ, giảm lượng thức ăn tiêu thụ, tăng tiết nước bọt, chảy nước mắt nước mũi, nổi nốt sần trên da và hình thành các tổn thương loét ở miệng và mũi. Nốt sần tiến triển thành mụn nước hoặc mụn, sau đó đóng vảy, đặc biệt rõ ở vùng da mỏng, ít lông. Hạch bạch huyết nông sưng to, xuất hiện ho và thở khó nhẹ. Lượng nước uống tăng đáng kể từ 10–14 ngày sau nhiễm so với nhóm đối chứng. Ở lô thí nghiệm 3 (10^7 TCID₅₀/ml), toàn bộ bê thí nghiệm biểu hiện triệu chứng nghiêm trọng, trong đó cá thể BV-12 đạt điểm lâm sàng cao nhất (13 điểm). Lô 2 ($10^{6,5}$ TCID₅₀/ml) ghi

nhận mức độ lâm sàng trung bình, với BV-08 đạt điểm tối đa là 10. Lô 1 (10^6 TCID₅₀/ml) biểu hiện triệu chứng nhẹ đến trung bình và phục hồi hoàn toàn sau 21 ngày sau gây nhiễm. Không có biểu hiện bệnh lý nào được ghi nhận và không có cá thể nào chết ở thời điểm 28 sau gây nhiễm ở nhóm đối chứng.



Hình 4.26. Kết quả đánh giá triệu chứng lâm sàng của bò sau khi gây nhiễm

Các triệu chứng lâm sàng của bê sau gây nhiễm bao gồm: Xuất hiện nhiều nốt sần ở nhiều vùng khác nhau của cơ thể bao gồm vú, tinh hoàn, đuôi, lưng, cổ, tầng sinh môn và chân, các nốt sần này có kích thước từ vài milimét đến 7 cm đường kính. Những nốt sần trên da có kích thước đồng đều, nhỏ, nổi lên với lông dựng đứng, thường hợp nhất thành những nốt lớn hơn, không đều, lan rộng khắp bề mặt cơ thể. Những nốt sần này thường xuất hiện ở lớp biểu bì và hạ bì sự xuất hiện của các tổn thương dạng nốt sần có liên quan đến sự tiến triển của bệnh với tổn thương ở dạng hoại tử loét và mưng mủ nghiêm trọng với sự hình thành vảy hoặc vảy bên ngoài trong các trường hợp cấp tính (Al-Salihi và Hassan, 2015; Tuppurainen và cs, 2017a).

Kết quả này tương đồng với một số kết quả nghiên cứu đối với bò nhiễm tự nhiên và thực nghiệm bệnh VDNC đều có các triệu chứng chán ăn, trầm cảm, chảy nước dãi, chảy nước mũi, có hoặc không kèm theo đục giác mạc và gầy mòn. Các hạch bạch huyết dưới xương bả vai và trước đầu sưng phì đại (Abutarbush và cs, 2015; Wolff và cs, 2020b; Ali và cs, 2021; Hamdi và cs, 2021, Mathewos và cs, 2022; Pandey và cs, 2022; Nguyễn Quốc Cường và cs, 2022; Adamu và cs, 2024; Phạm Minh Hằng và cs, 2024; Shumilova và cs, 2024; Kutumbetov và cs, 2025).

Bảng 4.12. Đánh giá triệu chứng lâm sàng của bò thí nghiệm gây nhiễm

TT	Triệu chứng	Lô đối chứng			Lô 1			Lô 2			Lô 3		
		BV-01	BV-02	BV-03	BV-04	BV-05	BV-06	BV-07	BV-08	BV-09	BV-10	BV-11	BV-12
1	Giảm hoạt động, trầm cảm bò nằm nhiều, sốt		-	-	++	+	+	++	+++	++	++	++	+++
2	Chán ăn/Giảm ăn	-	-	-	++	+	+	++	+++	++	++	+++	+++
3	Tăng tiết nước bọt	-	-	-	+++	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
4	Chảy nước mũi/nước mắt	-	-	-	++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5	Nốt sần tròn, cứng, kích thước 1-7 cm, phân bố trên da toàn thân.	-	-	-	++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6	Nốt sần tiến triển thành mụn nước hoặc mụn mủ, có thể gây lở loét.	-	-	-	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
7	Hình thành vảy dày trên vùng da bị tổn thương, dễ bong tróc.	-	-	-	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
8	Loét niêm mạc miệng, mũi; có thể gây khó thở, ho.	-	-	-	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
9	Hạch bẹn, hạch bạch huyết trước vai sưng lớn.	-	-	-	+	+	+	++	+++	++	++	++	+++
10	Ho khan, có dấu hiệu khó thở vừa phải.	-	-	-	+	-	-	++	++	++	+++	+++	+++
11	Phù các chi, ngực, tăng sinh môn	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+++	+++	+++
12	Viêm kết mạc, viêm giác mạc, nhạy cảm với ánh sáng.	-	-	-	+	+	-	++	++	++	+++	+++	+++

*Ghi chú: +++: Triệu chứng nặng, ++: Triệu chứng trung bình, +: Triệu chứng nhẹ,
- : Bình thường; Điểm 0 (-); 1-5 điểm (+); 6-9 điểm (++); 10-13 điểm (+++);
>13 điểm (Hủy)*



Hình 4.27. Hình ảnh minh họa triệu chứng lâm sàng của bò sau gây nhiễm vi rút LSD chủng thực địa

Ghi chú: (A) Bò sưng mắt, chảy nước mắt, (B) Thu thập nốt sần trên vùng da bò, (C) Bò chảy nước mũi, sưng mũi, (D) Nốt sần bao phủ toàn bộ vùng da lưng và bụng bò, (E) Các triệu chứng ở vùng mũi, mắt, tai, và (F) Nốt sần ở vùng đầu và cổ bò.

4.3.9. Kết quả đánh giá các bệnh tích đại thể của bê sau gây nhiễm

Các lô thí nghiệm 1, 2 và 3 đến ngày thứ 7 đều có kết quả dương tính với Realtime PCR (Bảng 4.13). Nhưng đến ngày thứ 14 thân nhiệt bò đạt đỉnh là 39,6 - 41,6°C và có giá trị Ct đạt từ 18.1-22.4. Kết quả này tương đồng với thí nghiệm của Adamu và cs (2024), Shumilova và cs (2024), Kutumbetov và cs (2025) khi DNA của vi rút LSD được phát hiện trong máu và swab vào khoảng 9-15 ngày sau gây nhiễm. Đây có thể là đỉnh điểm mà vi rút LSD nhân lên trong máu bò thí nghiệm (Kononov và cs, 2019b; Lu và cs, 2020; Tuppurainen và cs, 2018; Wolff và cs, 2020a). Những con bê (BV-01, BV-04, BV-08 và BV-12) thuộc 4 lô được mổ khám trong đó bê mang ký hiệu BV-01 là đối chứng, còn lại 3 bê có những triệu chứng điển hình như suy hô hấp, nhiều nốt sần và tình trạng viêm khớp... để kiểm tra tổn thương đại thể và vị trí khu trú của vi rút trong các cơ quan nội tạng của bê thí nghiệm. Kết quả đánh giá bệnh tích được thể hiện tại bảng 4.13 và hình 4.27.

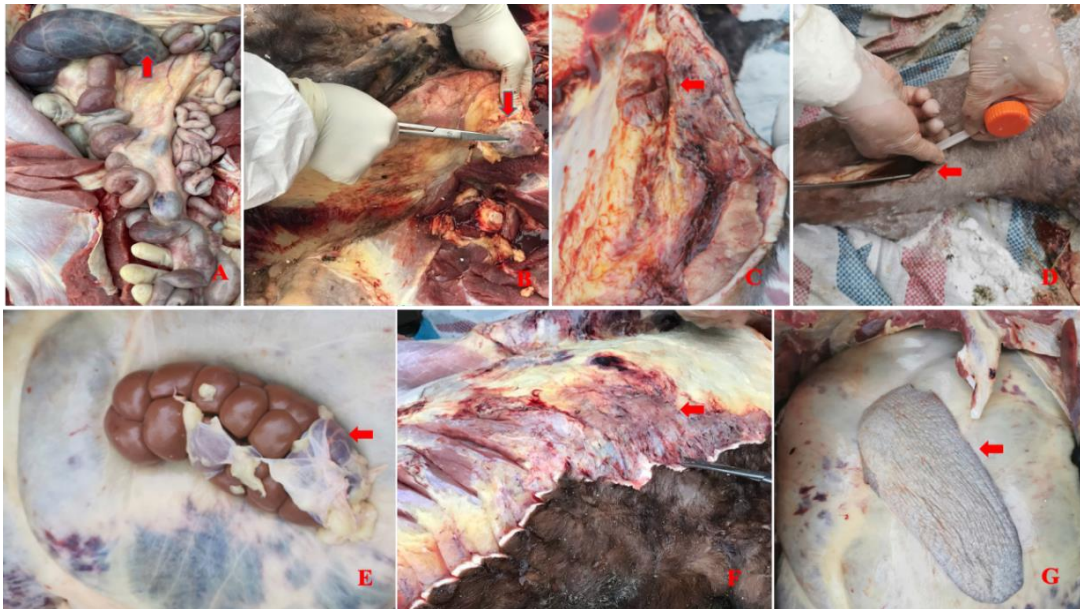
**Bảng 4.13. Kết quả đánh giá bệnh tích đại thể của bò sau gây nhiễm vi rút
LSD chủng thực địa**

Cơ quan	Bệnh tích	Lô đối chứng			Lô 1			Lô 2			Lô 3		
		BV-01	BV-02	BV-03	BV-04	BV-05	BV-06	BV-07	BV-08	BV-09	BV-10	BV-11	BV-12
Da và cơ	Xuất huyết từ mô dưới da	-	-	-	+	-	-	-	++	+	+	+	++
Lưỡi	Viêm loét trợt loét, lưỡi to ra và phù nề	-	-	-	+	-	-	++	+++	++	++	+++	+++
Niêm mạc mũi	Viêm da loét và xói mòn ở gương mũi	-	-	-	++	+	+	++	+++	++	+++	+++	+++
Hạch lympho	Sưng to, phù, xuất huyết	-	-	-	++	+	+	++	+++	++	++	+++	+++
Phổi	Viêm, Phù, Xuất huyết	-	-	-	+	-	-	+	++	+	++	++	+++
Khí quản	Xuất hiện nốt hoại tử, ổ xuất huyết	-	-	-	++	+	+	++	+++	++	+++	+++	+++
Dạ dày trước	Sưng to, xuất huyết	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	++
Ruột non	Xuất huyết	-	-	-	+	-	-	+	++	+	++	++	+++

Ghi chú: +++: Tổn thương nặng, ++: Tổn thương mức trung bình, + : Tổn thương nhẹ, - : không tổn thương.

Khám nghiệm đại thể bê thí nghiệm sau gây nhiễm cho thấy tổn thương điển hình tại nhiều cơ quan, tập trung ở da, hô hấp, tiêu hóa và bạch huyết. Tổn thương ngoài da bao gồm các nốt sần đồng đều, nổi cao, tiến triển thành loét, mưng mủ và đóng vảy. Mô dưới da phù nề, có ổ xuất huyết khu trú. Niêm mạc mũi và

miệng bị xói mòn, lưỡi phù nề với các vết loét sâu và lan tỏa. Khí quản viêm cấp, xuất huyết, có ổ hoại tử kèm tiết dịch nhầy. Phổi viêm nặng, có ổ áp xe và dịch mủ. Hạch bạch huyết (đặc biệt là hạch bẹn và hạch vai) sưng to, xuất huyết, có mủ. Ngoài ra, tổn thương lan đến các cơ quan sinh dục, đường tiêu hóa và mô sâu như khớp, bao gân. Các biến chứng như viêm vú, viêm tử cung và viêm phổi do bội nhiễm cũng được ghi nhận trong giai đoạn muộn của bệnh. Kết quả cho thấy chủng vi rút NA06 là chủng có độc lực cao, có khả năng gây bệnh trên bò với các biểu hiện triệu chứng lâm sàng, bệnh tích giống với các chủng vi rút LSD gây bệnh tại thực địa.



Hình 4.28. Biểu hiện bệnh tích bò nhiễm vi rút LSD chủng thực địa

Ghi chú: (A) xuất huyết và tích khí tại ruột bò gây nhiễm, (B) xuất huyết hạch bẹn nông, (C) xuất huyết hạch dưới hàm, (D) Dịch khớp chân trước, (E) xuất huyết vùng màng thận, (F) tím tái và xuất huyết vùng dưới da, và (G) xuất huyết, hoại tử, xung phù vùng lưỡi bò gây nhiễm vi rút LSD chủng thực địa

Các nốt sần hoại tử có thể được tìm thấy ở hầu hết các bộ phận của đường tiêu hóa (môi, nướu, vòm miệng, dạ dày trước), hô hấp (niêm mạc mũi, hầu, thanh quản, khí quản và các cấu trúc tiểu phế quản) và đường tiết niệu sinh dục của cả con đực (tinh hoàn) và cái (tử cung, âm đạo, vú). Trong trường hợp nhiễm trùng nặng, các mô sâu hơn như bao gân, khớp hoạt dịch và thậm chí xương

mỡ cũng bị ảnh hưởng (Moudgil và cs, 2023). Phổi bị viêm, rối loạn chức năng khí quản, viêm vú, viêm tử cung, viêm tử cung và viêm tinh hoàn là những biến chứng thường gặp bất cứ khi nào có sự tham gia thứ phát của vi khuẩn hoặc nấm (Ali và cs, 2012; El-Neweshy và cs, 2013).

Kết quả tương tự với một số nghiên cứu khác khi mổ khám động vật thí nghiệm ở các ngày 11, 15, 21 sau gây nhiễm cho thấy những thay đổi bệnh lý đã được quan sát thấy ở các cơ quan nội tạng bao gồm phổi, ruột, khí quản, lách, hạch bạch huyết dưới vai, hạch bạch huyết dưới hàm và da (Adamu và cs, 2024); Shumilova và cs, 2024; Kutumbetov và cs, 2025). Các biến đổi bệnh lý ở động vật thí nghiệm được gây nhiễm với chủng độc lực cao giống với gia súc mắc bệnh tự nhiên thể lâm sàng (Ali và cs, 2021; Hamdi và cs, 2021; Mathewos và cs, 2022).

Kết quả theo dõi sự nhân lên của vi rút LSD chủng NA06 trong máu của bê thí nghiệm sau gây nhiễm được trình bày ở bảng 4.14 và bảng 4.15

Dữ liệu từ bảng 4.14 cho thấy, kết quả đánh giá sự nhân lên của vi rút LSD trong máu bò bằng phương pháp real-time PCR có sự khác biệt tùy theo liều vi rút gây nhiễm. Cụ thể, ở nhóm bò được gây nhiễm với liều 2×10^7 TCID₅₀/mL, vi rút được phát hiện trong máu từ ngày thứ 3 đến 5 sau khi gây nhiễm và đạt tải lượng cao nhất vào khoảng 12–14 sau gây nhiễm, với giá trị Ct dao động từ 18,1 đến 23,5, cho thấy sự nhân lên mạnh và sớm của vi rút, Trong khi đó, ở nhóm bò được gây nhiễm liều $2 \times 10^{6,5}$ TCID₅₀/mL, vi rút được phát hiện muộn hơn, từ ngày 5–7 sau gây nhiễm và đạt mức cao nhất vào 12–14 sau gây nhiễm với giá trị Ct trong khoảng 20,3–24,3. Đối với nhóm bò được gây nhiễm với liều thấp nhất là 2×10^6 TCID₅₀/mL, vi rút cũng được phát hiện từ 5–7 sau gây nhiễm, tuy nhiên thời điểm đạt tải lượng vi rút cao nhất muộn hơn, vào khoảng 14–16 sau gây nhiễm, với giá trị Ct dao động từ 21,3 đến 25,3. Như vậy, có thể nói rằng, liều gây nhiễm vi rút cao hơn dẫn đến sự nhân lên nhanh và mạnh hơn của vi rút trong máu bò thí nghiệm.

Kết quả nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu trước đây của Shumilova và cs (2024) và Kutumbetov và cs (2025). Cụ thể, khi lượng vi rút đưa

vào gây nhiễm khác nhau thời gian xuất hiện vi rút trong máu động vật thí nghiệm cũng khác nhau. Shumilova và cs (2024) đã gây nhiễm động vật thí nghiệm với liều 5logTCID50 vi rút xuất hiện trong máu từ ngày thứ 10-20 sau gây nhiễm với Ct trong khoảng 22,7-34,6. Kutumbetov và cs (2025) gây nhiễm động vật thí nghiệm với liều 4×10^3 TCID50 vi rút xuất hiện trong máu ngày thứ 7-21 sau gây nhiễm với Ct trong khoảng 20,2-29,5.

Bảng 4.14. Kết quả xác định sự nhân lên của vi rút LSD trong mẫu máu toàn phần của bò sau gây nhiễm

TT	Ký hiệu	Lô Thí Nghiệm	Liều vi rút gây nhiễm	Kết quả real-time PCR (giá trị Ct)										
				D1	D3	D5	D7	D10	D12	D14	D16	D18	D21	D28
1	Bv-01	Đôi chứng âm	0	-	-	-	-	-	-	†	†	†	†	†
2	Bv-02		0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Bv-03		0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Bv-04	Lô gây nhiễm 01	2×10^6	-	-	37,7	32,6	25,4	21,3	†	†	†	†	†
5	Bv-05		2×10^6	-	-	-	36,3	27,4	24,8	22,5	25,8	31,3	35,1	không có Ct
6	Bv-06		2×10^6	-	-	-	36,8	30,3	25,3	21,8	26,3	32,7	35,9	không có Ct
7	Bv-07	Lô gây nhiễm 02	$2 \times 10^{6,5}$	-	-	-	35,9	28,2	24,3	20,7	23,9	27,8	30,6	38,7
8	Bv-08		$2 \times 10^{6,5}$	-	-	37	32,4	27,4	20,3	†	†	†	†	†
9	Bv-09		$2 \times 10^{6,5}$	-	-	-	35,3	29,3	23,7	21,3	24,3	28,6	32	không có Ct
10	Bv-10	Lô gây nhiễm 03	2×10^7	-	-	35,4	29,4	27,5	23,5	19,5	25,5	27,8	29,1	35,6
11	Bv-11		2×10^7	-	-	36,3	31,2	26,3	22,4	20,2	26,8	28,5	31,2	36,3
12	Bv-12		2×10^7	-	38	33,2	28,3	22,3	18,1	†	†	†	†	†

Ghi chú: Dấu (-) biểu thị không có giá trị Ct

Dấu (†) biểu thị cá thể đã được mổ khám

Nghiên cứu sự xuất hiện vi rút trong chất tiết của động vật thí nghiệm được trình bày tại bảng 4.15. Kết quả bảng 4.15 cho thấy sau 5 ngày gây nhiễm đã bắt đầu có sự xuất hiện vi rút trong dịch ngoáy mũi, miệng của bò ở lô 3, lô 2 lần lượt với liều gây nhiễm 2×10^7 TCID50/mL và $2 \times 10^{6,5}$ TCID50/mL. Ở lô 1 sự có mặt của vi rút bắt đầu ghi nhận từ ngày thứ 7 sau gây nhiễm. Sự bài thải vi rút qua dịch tiết của bò mắc bệnh liên tục các ngày sau đó và ngừng bài thải sớm nhất tại 21 sau gây

nhiễm. Trong khi đó, bò đối chứng cho kết quả âm tính và hoàn toàn khỏe mạnh. Tại 14 ngày sau gây nhiễm, các cá thể bò BV-01, BV-04, BV-08, BV-12 lần lượt thuộc lô đối chứng, lô 1, lô 2 và lô 3 được mổ khám kiểm tra bệnh tích và xác định nơi khu trú của vi rút.

Bảng 4.15. Kết quả xác định sự có mặt của vi rút LSD trong mẫu dịch hầu họng, mũi của bò sau gây nhiễm

TT	Ký hiệu	Lô Thí Nghiệm	Liều vi rút gây nhiễm	Kết quả real-time PCR (giá trị Ct)										
				D1	D3	D5	D7	D10	D12	D14	D16	D18	D21	D28
1	Bv-01	Đôi chứng âm	0	-	-	-	-	-	-	†	†	†	†	†
2	Bv-02		0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Bv-03		0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Bv-04	Lô gây nhiễm 01	2×10^6	-	-	-	35,4	34,4	29,5	†	†	†	†	†
5	Bv-05		2×10^6	-	-	-	37	35,3	31,2	32,3	33,6	36,8	-	-
6	Bv-06		2×10^6	-	-	-	36,5	34,2	30,5	31,8	33,3	36,4	-	-
7	Bv-07	Lô gây nhiễm 02	$2 \times 10^{6,5}$	-	-	-	36,2	33,2	28,6	27,1	32,3	35,8	-	-
8	Bv-08		$2 \times 10^{6,5}$	-	-	38,3	35,4	31,4	27,2	†	†	†	†	†
9	Bv-09		$2 \times 10^{6,5}$	-	-	-	35,4	32,3	27,9	26,7	31,2	32,3	37,4	-
10	Bv-10	Lô gây nhiễm 03	2×10^7	-	-	37,0	34,7	31,2	27,0	26,5	28,2	31,3	34,4	-
11	Bv-11		2×10^7	-	-	38,0	35,6	32,4	27,1	25,3	27,8	30,6	33,0	39,3
12	Bv-12		2×10^7	-	-	36,8	33,8	29,3	25,4	†	†	†	†	†

Ghi chú: Dấu (-) biểu thị không có giá trị Ct; Dấu (†) biểu thị cá thể đã được mổ khám

Kết quả nghiên cứu này cũng tương đồng với một số nghiên cứu khác (Adamu và cs, 2024; Shumilova và cs, 2024; Kutumbetov và cs, 2025). Theo kết quả nghiên cứu của Woff và cs (2020, 2021) cho thấy trong dịch tiết của bò, ghi nhận sự có mặt của vi rút ở 5 – 11 ngày sau gây nhiễm và phát hiện DNA của vi rút qua dịch mũi và miệng đến 28 ngày sau gây nhiễm với liều gây nhiễm 3.8×10^7 TCID₅₀/mL và ở 21 ngày sau gây nhiễm với liều 3.3×10^6 TCID₅₀/mL (Wolff và cs, 2020; Wolff và cs, 2021). Adamu và cs (2024) đã chỉ ra rằng vi rút LSD xuất hiện sớm nhất trong dịch tiết (kết mạc, mũi, họng) ngày thứ 6 sau gây nhiễm và kéo dài đến ngày thứ 14 vẫn dương tính với liều gây nhiễm $10^{3,9}$ TCID₅₀. Shumilova và cs (2024) tìm thấy DNA

của vi rút LSD vào ngày thứ 10 và kéo dài đến ngày thứ 20 sau gây nhiễm với giá trị Ct 28,5-35,4.

Theo cơ chế sinh bệnh, sau khi gây nhiễm vi rút LSD sẽ nhân lên và được bài thải ra ngoài môi trường thông qua đường miệng và mũi cùng với sự nhân lên trong máu từ 7 đến 19 ngày sau gây nhiễm. Đây là nguồn vi rút làm lây lan trực tiếp và gián tiếp khi động vật nuôi tiếp xúc với các dịch và chất tiết từ bò bệnh (Magori-Cohen và cs, 2012; Haegeman và cs, 2023). Vi rút cũng có thể lây lan qua việc tiếp xúc với khí dung hoặc giọt bắn. Hơn nữa, nước bọt hoặc dịch mũi từ gia súc bị nhiễm bệnh có thể làm ô nhiễm máng ăn hoặc máng uống, do đó gián tiếp tạo điều kiện cho sự lây truyền vi rút LSD (Lee và cs, 2024). Dịch nước bọt và giọt bắn là một trong những nguồn lây nhiễm vi rút LSD chính sau các vec-tơ khác (Haider và cs, 2024). Các vật dụng, trang thiết bị dính nước bọt của bò bệnh sẽ mang vi rút và lây truyền gián tiếp bởi nhân viên chăm sóc bò khi đi từ chuồng này qua chuồng khác, hoặc phương tiện vận chuyển tải vi rút từ trại này qua trại khác; nơi này qua nơi khác.

Mổ khám (tại thời điểm 14 và 28 ngày sau gây nhiễm), các mẫu bệnh phẩm được thu thập bao gồm: Khí quản, phổi, thận, gan, lách, ruột, nốt sần, hạch amidan, hạch trước hàm, hạch ruột, hạch bẹn nông được định sự có mặt của vi rút LSD bằng phương pháp real-time PCR. Kết quả được trình bày ở bảng 4.16-4.17.

Sự khu trú của vi rút LSD trong gan, thận, lách và ruột ở bò mắc bệnh sau 14 ngày gây nhiễm là không đáng kể. Bò được gây nhiễm vi rút ở liều gây nhiễm 2×10^7 TCID₅₀/mL cho kết quả dương tính với giá trị Ct dao động từ 27,1 – 32,4. Trong khi đó ở các cơ quan khác như khí quản, phổi, hạch Amidan, hạch trước hàm, hạch ruột, hạch bẹn nông cho kết quả dương tính cao hơn (Ct 18,3-27,6). Do vậy trong công tác chẩn đoán sẽ không ưu tiên việc thu thập mẫu ở các cơ quan phủ tạng (gan, thận, lách, ruột) để phục vụ chẩn đoán (Kononov và cs, 2019b).

Bảng 4.16. Xác định sự có mặt của vi rút LSD trong mẫu phủ tạng của bò sau 14 ngày gây nhiễm

TT	Ký hiệu	Lô thí nghiệm	Liều vi rút gây nhiễm	Kết quả real-time PCR (giá trị Ct)										
				Khí quản	Phổi	Thận	Gan	Lách	Ruột	Nốt sần	Hạch Amidan	Hạch trước hàm	Hạch ruột	Hạch bẹn nông
1	Bv-01	Đối chứng âm	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Bv-04	Lô gây nhiễm 01	2×10^6	22,7	23,5	33,5	31,5	31,3	36,4	21	21,5	24,2	25,5	27,6
3	Bv-08	Lô gây nhiễm 02	$2 \times 10^{6.5}$	21,4	21,9	32,6	30,3	29,5	34,7	20,1	20,9	22,5	23,7	25,3
4	Bv-12	Lô gây nhiễm 03	2×10^7	19,4	20,0	31,3	28,3	27,1	32,4	15,6	18,3	19,7	20,6	21,4

Bảng 4.17. Xác định sự có mặt của vi rút LSD trong mẫu phủ tạng của bò sau 28 ngày gây nhiễm

TT	Ký hiệu	Lô thí nghiệm	Liều vi rút gây nhiễm	Kết quả real-time PCR (giá trị Ct)										
				Khí quản	Phổi	Thận	Gan	Lách	Ruột	Nốt sần	Hạch Amidan	Hạch trước hàm	Hạch ruột	Hạch bẹn nông
1	Bv-02	Đối chứng âm	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Bv-03		0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Bv-05	Lô gây nhiễm 01	2×10^6	37,2	38,5	-	-	-	-	36,4	-	-	-	-
4	Bv-06		2×10^6	37,7	-	-	-	-	-	35,8	-	-	-	-
5	Bv-07	Lô gây nhiễm 02	$2 \times 10^{6,5}$	35,5	36,5	-	-	-	-	33,5	-	-	37,8	38,3
6	Bv-09		$2 \times 10^{6,5}$	36,9	-	-	-	-	-	34,3	38,0	-	-	-
7	Bv-10	Lô gây nhiễm 03	2×10^7	34,3	35,7	-	-	-	37,5	31,8	36,5	37,1	33,8	35,8
8	Bv-11		2×10^7	33,5	34,6	-	-	-	36,4	32,3	34,1	35,5	34,4	36,4

Sau 28 ngày gây nhiễm, tải lượng vi rút ở các cơ quan phủ tạng gần như không có ở tất cả các lô thí nghiệm (Ct >30). Nghiên cứu của Wolff và cs (2022a) cũng chỉ ra rằng các giá trị Ct thấp khoảng 34-36 ở các hạch bạch huyết cổ và trung thất, mẫu phổi và giá trị Ct đạt khoảng 30-33 đối với gan, lách, và giá trị Ct từ 18-30 sau gây nhiễm vi rút với liều 10^5 TCID₅₀/ml tại 19-28 ngày sau gây nhiễm. Ngược lại, tải lượng vi rút cao đã được phát hiện trong các mẫu gồm các nốt sần và vùng da đang lành lại có giá trị Ct nằm trong khoảng 13-16 tại ngày thứ 12-14 sau khi gây nhiễm (Lu và cs, 2020; Mulatu và Feyisa, 2018; WOAHA, 2021b; Wolff và cs, 2020b).

4.3.10. Đánh giá tính sinh miễn dịch của chủng vi rút LSD phân lập tại thực địa bằng phương pháp trung hòa vi rút

Chủng vi rút NA06 tiếp tục được lựa chọn để nghiên cứu tính sinh miễn dịch. Để thực hiện nghiên cứu này chúng tôi đã phối hợp với Công ty Cổ phần Thuốc Thú y TW 1 (VETVACO). Đối tượng thí nghiệm gồm 15 con bê 6 tháng tuổi được chia thành 5 lô, mỗi lô 3 con, gây nhiễm vi rút LSD bất hoạt ở các liều khác nhau: Lô 1: Lô đối chứng âm ; Lô 2 : $2 \times 10^{5.5}$ TCID₅₀/mL; Lô 3: 2×10^6 TCID₅₀/mL; Lô 4: $2 \times 10^{6.5}$ TCID₅₀/mL và Lô 5: vắc xin thương mại (Bảng 4.18) (chủng vi rút NA06 được bất hoạt bằng BEI)

Các bê thí nghiệm được tiêm bắp và được theo dõi hàng ngày để ghi nhận các biểu hiện lâm sàng. Máu được lấy định kỳ 7 ngày/lần để thu huyết thanh và đánh giá hiệu giá kháng thể kháng vi rút LSD bằng phương pháp VNT.

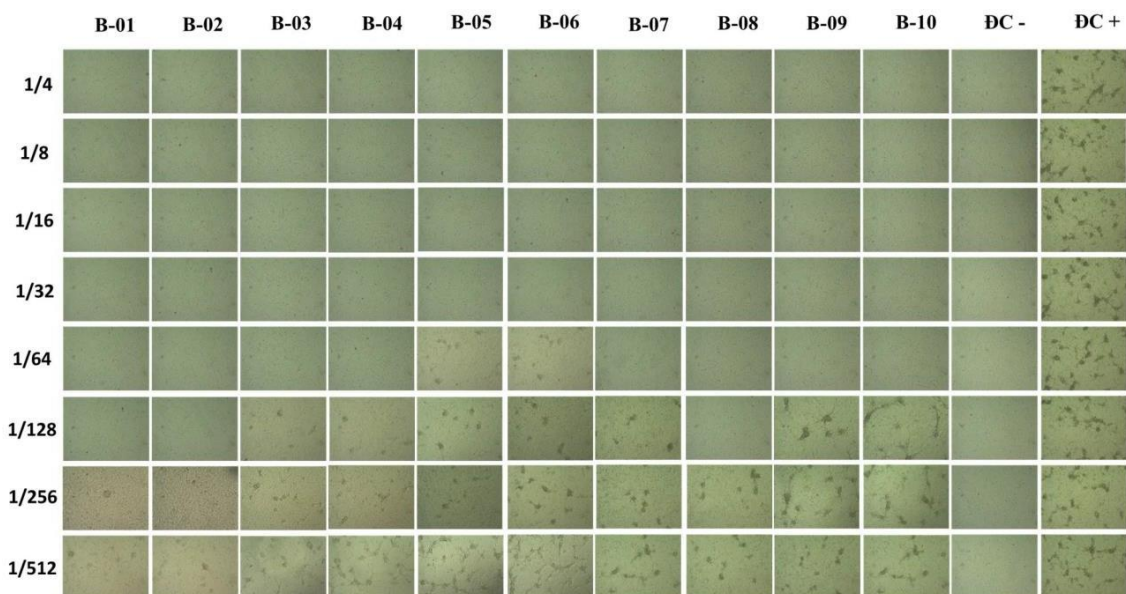
Kết quả phân tích hiệu giá kháng thể kháng vi rút LSD qua các lần lấy mẫu được trình bày trong bảng 4.19 và Hình 4.31. Kết quả chỉ ra rằng, Lô 1 nhóm đối chứng âm (B-01, B-02, B-03), hiệu giá kháng thể duy trì ở mức 0 tại tất cả các thời điểm (D1 đến D49), chúng tỏ không có kháng thể kháng vi rút LSD. Ở lô 2 nhóm bê được tiêm vi rút với liều gây nhiễm $2 \times 10^{5.5}$ TCID₅₀/ml (B-04, B-05, B-06) bắt đầu xuất hiện kháng thể từ ngày thứ 7 (D7) với hiệu giá thấp 1/4 -1/8. Hiệu giá kháng thể tăng dần theo thời gian và đạt cao nhất ở mức 1/128–1/256 vào ngày thứ 42 - 49 (D42–D49). Lô 3 nhóm tiêm vi rút bất hoạt với liều gây nhiễm 2×10^6 TCID₅₀/ml (B-07, B-08, B-09) có kháng thể xuất hiện sớm hơn, từ D7 với hiệu giá 1/8, và đạt

mức cao nhất 1/256 vào D42–D49, thể hiện đáp ứng miễn dịch mạnh hơn so với nhóm tiêm vi rút bất hoạt liều $2 \times 10^{5.5}$ TCID₅₀/ml. Nhóm tiêm vi rút bất hoạt với liều gây nhiễm $2 \times 10^{6.5}$ TCID₅₀/ml (B-10, B-11, B-12) có hiệu giá kháng thể cao nhất và xuất hiện sớm nhất, đạt 1/64 từ D14 và tăng nhanh đạt mức 1/256–1/512 ở D42–D49, chứng tỏ khả năng sinh miễn dịch tối ưu. Nhóm tiêm vắc xin thương mại (B-13, B-14, B-15) cũng cho thấy hiệu quả cao, với kháng thể xuất hiện từ D7 (1/8-1/16) và đạt mức cao nhất 1/256–1/512 vào D42–D49, tương đương với nhóm tiêm vi rút bất hoạt ở liều gây nhiễm $2 \times 10^{6.5}$ TCID

Bảng 4.18. Bảng kết quả VNT đánh giá khả năng sản sinh kháng thể của bò sau tiêm vi rút LSD bất hoạt

TT	Mã	Lô thí nghiệm	Liều vi rút gây nhiễm	Kết quả (VNT)							
				D1	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49
1	B-01	Lô 1: Đối chứng âm	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	B-02		0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	B-03		0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	B-04	Lô 2	$2 \times 10^{5.5}$	0	8	16	32	64	128	256	256
5	B-05		$2 \times 10^{5.5}$	0	4	16	32	32	64	128	128
6	B-06		$2 \times 10^{5.5}$	0	8	16	16	32	64	128	128
7	B-07	Lô 3	2×10^6	0	8	32	64	128	128	256	256
8	B-08		2×10^6	2	16	32	64	64	128	128	256
9	B-09		2×10^6	0	8	16	32	32	64	64	128
10	B-10	Lô 4	$2 \times 10^{6.5}$	0	16	64	128	256	256	256	256
11	B-11		$2 \times 10^{6.5}$	4	16	64	64	128	128	256	512
12	B-12		$2 \times 10^{6.5}$	2	16	32	64	128	256	512	512
13	B-13	Lô 5: Vắc xin thương mại	Theo nhà sản xuất hướng dẫn	2	16	32	64	128	128	256	256
14	B-14			4	16	64	128	256	256	512	512
15	B-15			0	16	64	64	128	256	256	512

Ghi chú: D (ngày); Chỉ số VNT ≥ 32 được coi là dương tính và có khả năng bảo hộ



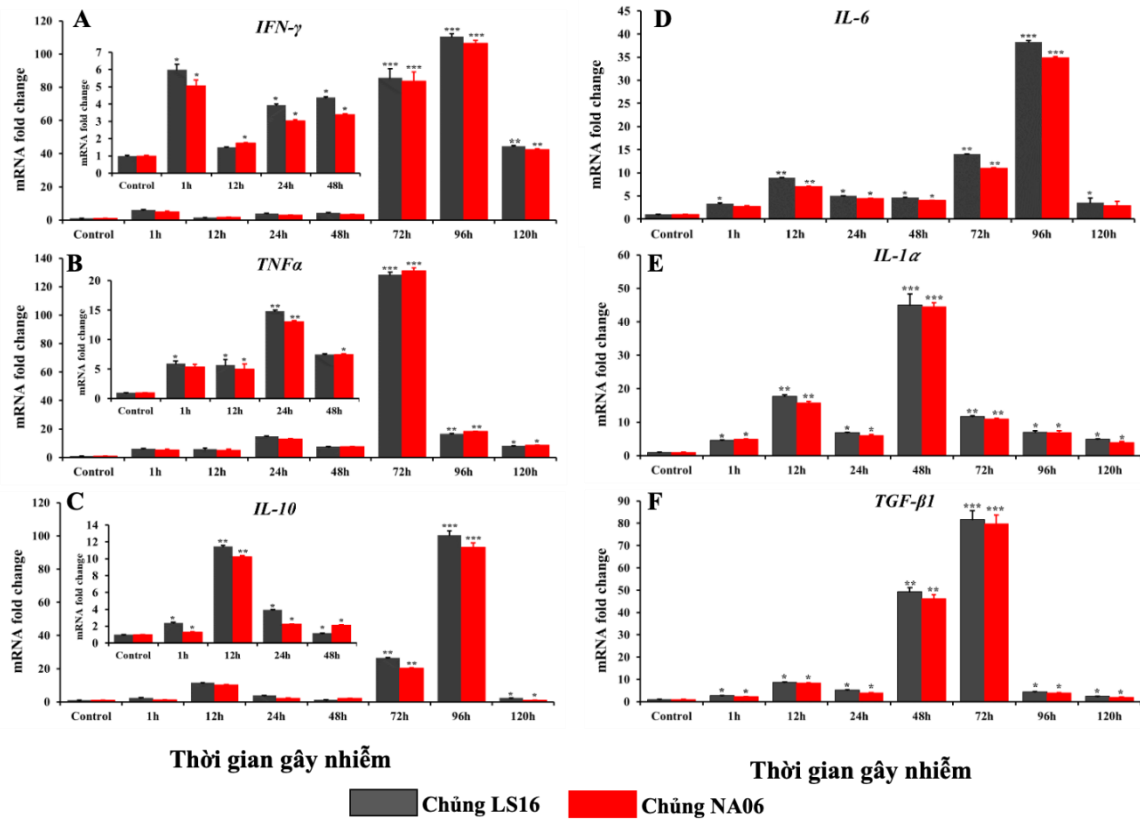
Hình 4.29. Minh họa phản ứng trung hoà của một số mẫu huyết thanh bò thí nghiệm sau tiêm vi rút LSD bất hoạt với độ phóng đại 10X

4.3.11. Biểu hiện của các cytokine miễn dịch trên tế bào dòng MDBK sau khi gây nhiễm vi rút gây bệnh VDNC chủng thực địa

Tiến hành gây nhiễm 0.01 MOI vi rút gây bệnh VDNC (LS16 và NA06) trên tế bào MDBK và đánh giá đáp ứng của các cytokine kháng viêm bằng phương pháp qRT-PCR. Các mức đáp ứng khác nhau của các cytokine IFN γ , TNF α , IL-10, IL-1 α , TGF β 1 và IL-6 được quan sát thấy trong hai giai đoạn bao gồm: Giai đoạn đầu từ 1 đến 24 giờ và giai đoạn sau từ 24 đến 120 giờ sau khi gây nhiễm. Sự thay đổi về nồng độ các cytokine sau khi gây nhiễm vi rút gây bệnh VDNC được thể hiện trong Hình 4.30. Trong giai đoạn đầu, nồng độ của các cytokine được kiểm tra đã tăng đáng kể vào lúc 6 giờ ($p < 0,05$) và trong giai đoạn sau, nồng độ cao nhất của các cytokine được ghi nhận trong khoảng từ 72 đến 96 giờ sau gây nhiễm khi so sánh với đối chứng, ngoại trừ cytokine IL1 α .

Đáng chú ý là có sự gia tăng đáng kể nồng độ IFN γ từ 1 đến 6 giờ sau gây nhiễm (từ 5,2 đến 11,5 lần) trong tế MDBK bị nhiễm vi rút LSD ($p < 0,05$) (Hình 4.30). Sau 6 giờ gây nhiễm, nồng độ của IFN γ giảm về mức bình thường sau 12, 24 và 48 giờ sau gây nhiễm ($p > 0,05$). Sự sản xuất các cytokine này tăng lên sau 72 giờ sau gây nhiễm vi rút. Mức sản xuất IFN γ tối đa được quan sát thấy vào 96

giờ sau gây nhiễm, thay đổi xấp xỉ 110,5 lần khi so sánh với đối chứng âm đối với tế bào gây nhiễm với chủng vi rút LS16 và khoảng 105 lần đối với tế bào gây nhiễm với chủng vi rút NA06 ($p < 0,001$).



Hình 4.30. Sự điều chỉnh đáp ứng Cytokine trên tế bào MDBK sau gây nhiễm vi rút LSD (LS16: chủng đối chứng dương)

Nồng độ của $TNF\alpha$ mRNA được đánh giá như trong Hình 4.30B. Trong giai đoạn đầu, sự gia tăng đáng kể cytokine này được quan sát sớm nhất 1 giờ sau gây nhiễm và đạt đỉnh đầu tiên sau 24 giờ gây nhiễm với mức thay đổi lần lượt là 5,95 và 14,65 lần. Mức đỉnh thứ hai của cytokine này được quan sát thấy tại thời điểm 72 giờ sau gây nhiễm, với mức thay đổi xấp xỉ 128,28 lần ($p < 0,001$) và giảm xuống ở mức bình thường sau 120 giờ gây nhiễm đối với tế bào gây nhiễm với chủng vi rút LS16 và thay đổi khoảng 131,2 lần sau 72 giờ ($p < 0,001$), sau đó trở lại bình thường sau 120h gây nhiễm đối với chủng vi rút NA06 (Hình 4.30B).

Trên tế bào MDBK, khi gây nhiễm với chủng vi rút LS16 lượng cytokine IL-10 được sinh ra cũng thay đổi sau khi nhiễm vi rút gây bệnh VDNC. Lượng

cytokine này cao nhất trong giai đoạn đầu tiên được quan sát thấy sau 12 giờ gây nhiễm với mức thay đổi gấp 11.46 lần ($p < 0,001$), sau đó giảm đáng kể sau 24 giờ gây nhiễm (Hình 4.29C) ($p < 0,05$). Trong giai đoạn thứ hai, mức sản sinh IL-10 mRNA tăng đáng kể tại thời điểm 72 giờ sau gây nhiễm và đạt nồng độ cao nhất vào lúc 96h sau gây nhiễm với mức thay đổi gấp 100 lần (Hình 4.30). Tương tự như vậy, biểu hiện của IL-10 trên tế bào MDBK sau khi gây nhiễm với vi rút LSD chủng NA06 cũng biến thiên tương tự như gây nhiễm chủng vi rút LS16, đạt đỉnh cao nhất trong giai đoạn 1 sau 12 giờ gây nhiễm và sau 96 giờ gây nhiễm của giai đoạn 2 (Hình 4.30)

Đối với IL-6 mRNA, chủng vi rút LS16 kích thích nồng độ của cytokine này tăng lên đáng kể trong tế bào MDBK sau 12 giờ gây nhiễm (thay đổi 8.9 lần) ($p < 0,001$), sau đó giảm cho đến 24 giờ sau gây nhiễm (thay đổi 5,03 lần). Trong giai đoạn thứ hai, mức độ biểu hiện của IL-6 mRNA được điều chỉnh tăng lên sau 72 giờ gây nhiễm, đạt mức cao thứ hai tại thời điểm 96 giờ sau gây nhiễm (thay đổi 38,28 lần) và sau đó giảm về mức bình thường sau 120 giờ gây nhiễm khi so sánh với đối chứng, và chủng vi rút NA06 cũng kích thích biểu hiện của IL-6 tăng mạnh trong giai đoạn 1 sau 12h gây nhiễm đạt 7,02 lần ($p < 0,001$) và sau 96h gây nhiễm trong giai đoạn 2, tăng gấp 34,86 lần ($p < 0,001$) (Hình 4.30D).

Mức độ biểu hiện của IL-1 α mRNA cũng được đánh giá trong thí nghiệm *in vitro*. Đối với chủng vi rút LS16, tương tự như IL6 ở pha đầu tiên, sự biểu hiện của IL-1 α mRNA được điều chỉnh tăng đáng kể sau 12 giờ gây nhiễm (thay đổi 17,7 lần) ($P < 0,001$) và sau đó giảm đáng kể sau 24 giờ gây nhiễm (thay đổi là 6,8 lần so với thời điểm 12 giờ sau gây nhiễm). Trong giai đoạn thứ hai, nồng độ của IL-6 mRNA tăng đáng kể với mức thay đổi gấp 45,05 lần tại thời điểm 48h sau gây nhiễm và giảm dần xuống sau 120 giờ gây nhiễm với mức thay đổi lần lượt là 11,34; 6,98 và 4,86 lần sau 72, 96 và 120 giờ sau gây nhiễm và đối với chủng vi rút NA06 thì mức độ biến thiên IL-6 cũng tương tự (Hình 4.30E).

Mức sản xuất cytokine TGF β 1 mRNA từ các tế bào MDBK sau khi nhiễm chủng vi rút gây bệnh VDNC thực địa cũng đã tăng lên đáng kể sau 3 giờ gây nhiễm và đạt đỉnh đầu tiên tại thời điểm 12 giờ sau gây nhiễm khi so sánh với đối

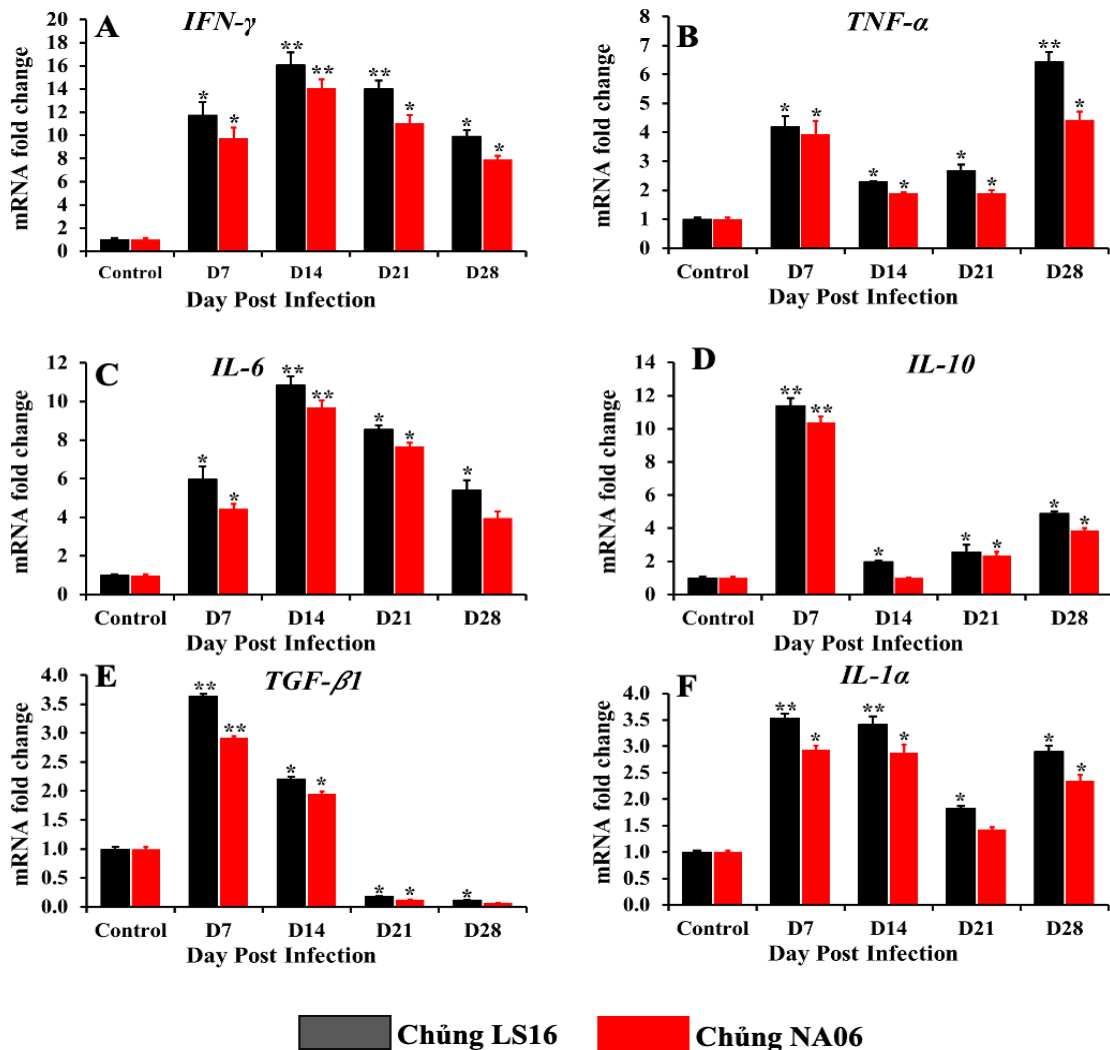
chúng (thay đổi 8,49 lần) ($P < 0,01$). Sau đó, nồng độ cytokine này giảm xuống trong giai đoạn từ 12 đến 24 giờ sau gây nhiễm (thay đổi 5,29 lần) (Hình 4.30F). Trong giai đoạn thứ hai, nồng độ của TGF β 1 mRNA đã tăng lên đáng kể với mức tăng lần lượt là 49,23 và 81,71 lần tại thời điểm 48 giờ và 72 giờ sau gây nhiễm nhưng sau đó lại giảm mạnh xuống tại các thời điểm 96 giờ và 120 giờ sau gây nhiễm khi so sánh với đối chứng ($p < 0,05$) (Hình 4.30F).

Các kết quả nghiên cứu trên cũng cho thấy có sự tương đồng cao về mức độ biểu hiện các cytokine gây ra do chủng vi rút LSD LSDV/Vietnam/Langson/LS16 phân lập tại tỉnh Lạng Sơn 2020 và chủng vi rút LSDV/Vietnam/Nghean/NA06 phân lập tại tỉnh Nghệ An năm 2021 (Hình 4.30).

4.3.12. Biểu hiện của các cytokine miễn dịch trên động vật sau khi gây nhiễm vi rút LSD chủng thực địa

Chúng tôi đã đánh giá sự hiện diện của cytokine kháng viêm trong máu bò nhiễm vi rút gây bệnh VDNC chủng LS16 và NA06 ở liều gây nhiễm $2 \times 10^{6,5}$ TCID $_{50}$ /mL. Máu của bò thí nghiệm được thu thập vào ngày thứ 0, 7, 14, 21 và 28 sau gây nhiễm để phân tích nồng độ của các cytokine. Các đáp ứng sản sinh IFN γ , TNF α , IL-10, IL-1 α , TGF β 1 và IL-6 mRNA trong các mẫu máu được thể hiện trong Hình 4.31.

Kết quả cho thấy sự thay đổi về mức độ đáp ứng cytokine trong máu của gia súc bị nhiễm chủng thực địa này ở Việt Nam. Tất cả các loại cytokine đều xuất hiện với mức đáng kể tại thời điểm 7 ngày sau gây nhiễm trong thí nghiệm này. Nồng độ của các cytokine TNF α , IL-10 và IL-1 α mRNA trong máu của gia súc bị nhiễm chủng thực địa này tăng lên sau 7 ngày gây nhiễm và sau đó giảm xuống tại thời điểm 14 ngày sau gây nhiễm (Hình 4.31B, D và F). Mức độ đáp ứng sản sinh TNF α , IL-1 α và IL-10 trong máu gia súc liên tục được tăng lên đến ngày thứ 28 sau gây nhiễm (Hình 4.31). Ngoài ra, mức độ sản sinh IL-10 cao nhất được quan sát thấy tại thời điểm 7 ngày sau gây nhiễm và mức độ đáp ứng TNF α và IL-1 α cao nhất được ghi nhận tại thời điểm 28 ngày sau gây nhiễm ($p < 0,05$).



Hình 4.31. Mức độ đáp ứng của các Cytokine trong máu của bò sau gây nhiễm vi rút gây bệnh VDNC chủng thực địa

Sự sản sinh $IFN\gamma$ và $IL-6$ mRNA đã được ghi nhận tăng lên trong các mẫu máu của gia súc sau khi gây nhiễm bằng vi rút gây bệnh VDNC thực địa được sử dụng trong thí nghiệm với mức sản xuất hai loại cytokine này cao nhất được quan sát thấy tại thời điểm 14 ngày sau gây nhiễm, thay đổi lần lượt khoảng 16 lần đối với $IFN\gamma$ và 10 lần đối với $IL-6$ mRNA ($P < 0,05$). Tiếp theo là mức độ đáp ứng $IFN\gamma$ và $IL-6$ mRNA giảm nhẹ sau 28 ngày gây nhiễm với mức thay đổi tương ứng khoảng 9 và 3 lần khi so sánh với đối chứng (Hình 4.31A và 4.31C). Đáng chú ý là, nồng độ $TGF\beta 1$ mRNA trong máu toàn phần của gia súc bị nhiễm chủng thực địa này tăng lên ngay tại thời điểm 7 ngày sau gây nhiễm (thay đổi khoảng 2,5 lần)

và duy trì ở mức đáp ứng này cho đến 14 ngày sau gây nhiễm. Tuy nhiên, mức giảm đáng kể đã được quan sát thấy tại các thời điểm 21 và 28 ngày sau gây nhiễm khi so sánh với đối chứng như được thể hiện trong Hình 4.31E. Ngoài ra, sự biến động mức độ biểu hiện các cytokine sau khi bò gây nhiễm với hai chủng vi rút LS16 phân lập tại tỉnh Lạng Sơn 2020 và NA06 phân lập tại tỉnh Nghệ An năm 2021 là không khác nhau ($p > 0,05$).

Kết quả trong nghiên cứu này tương đồng với nghiên cứu của Fay và cs (2022). Trong quá trình sinh bệnh thời điểm 5-7 ngày sau gây nhiễm một quần thể các tế bào trong đó có cả tế bào lympho T CD4⁺ và CD8⁺ đều sản xuất IFN- γ đỉnh điểm ngày thứ 15 và ngày 21 sau gây nhiễm với vi rút LSD. Tuy nhiên đối với TNF α và IL4 nghiên cứu của Nongbua và cs (2024) thì TNF- α và IL4 ở bò mắc bệnh thấp hơn so với bò không mắc bệnh. Điều này có thể giải thích là thí nghiệm của Nongbua và cs (2024) thực hiện trên một nhóm các con bò có độ tuổi khác nhau từ 4 tháng tuổi trở lên nên phản ứng miễn dịch ở các độ tuổi khác nhau và thời gian lấy máu cũng khác so với nghiên cứu này. Ngoài ra, IL-8 được phát hiện có biểu hiện tăng lên, tương quan với nhiễm trùng thứ phát do vi khuẩn và sự xâm nhập của bạch cầu trung tính vào chỗ tổn thương trên da (Manjunathareddy và cs, 2024).

Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng IFN γ đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ và ức chế mức độ bệnh lý ngày càng gia tăng trong quá trình động vật bị nhiễm mầm bệnh (Makris và cs, 2017). Sự điều hòa tăng của IFN γ mRNA có khả năng điều chỉnh tăng khả năng miễn dịch tự nhiên và phản ứng dịch thể. Đây là một đặc điểm quan trọng trong đáp ứng cytokine Th0, điều chỉnh mức độ sản sinh cytokine Th1 và có liên quan đến sự tăng lên về mức độ bệnh lý ở vật chủ (Mattila và cs, 2011; Bowen và Olson, 2013; Kim và cs, 2013; Song và cs, 2022b). IFN γ là một phần thiết yếu trong việc kích hoạt miễn dịch hoặc truyền tín hiệu để điều hòa đáp ứng miễn dịch tự nhiên ở động vật. Các tín hiệu dẫn đường như JAK-STAT, tín hiệu interferon loại I và tín hiệu MAPK hoặc NF- κ B (Song và cs, 2022b).

Kết quả nghiên cứu này đã chứng minh rằng nồng độ của cytokine IFN γ mRNA trong tế bào MDBK tăng lên đáng kể sau khi gây nhiễm vi rút gây bệnh VDNC từ 1 đến 6 giờ và sau đó tiếp tục tăng lên cho đến 72 sau gây nhiễm. Khi so sánh với nhóm đối chứng cũng cho thấy nồng độ của hai cytokine này trong máu của gia súc bị nhiễm vi rút tăng cao rõ ràng so với nhóm đối chứng ($p < 0.05$). Những kết quả này chỉ ra rằng sự tăng tiết IFN γ mRNA trong cả tế bào MDBK và trên động vật đóng một vai trò quan trọng để kích thích miễn dịch tự nhiên và miễn dịch dịch thể của vật chủ sau khi nhiễm vi rút gây bệnh VDNC. Với những kết quả này, nghiên cứu của chúng tôi sẽ tiếp tục tìm hiểu cơ chế kích hoạt miễn dịch tự nhiên đáp ứng với vi rút gây bệnh VDNC trên dòng tế bào MDBK trong tương lai.

TNF α là một cytokine gây viêm được sản xuất bởi các tế bào miễn dịch như đại thực bào, bạch cầu đơn nhân và tế bào lympho T. Đây là thành phần quan trọng của phản ứng viêm đối với một số mầm bệnh khác nhau, bao gồm vi rút, vi khuẩn và ký sinh trùng (Bean và cs, 2016; Olivera và cs, 2022; Yu và cs, 2021). Cytokine này cũng đóng vai trò rất quan trọng trong khả năng chống lại sự nhiễm bệnh cả trên tế bào và trên động vật (Smirnov và cs, 2016; Arrigucci và cs, 2018; Cubillos-Angulo và cs, 2019; Roos và cs, 2019; Venetsanopoulou và cs, 2022). Cơ chế của TNF α ở động vật được chứng minh rõ ràng ở chỗ nó ảnh hưởng đến việc sản sinh apoptosis, kích hoạt giữa các tế bào với nhau, kích thích sản xuất một số cytokine gây viêm khác và dẫn truyền các tế bào viêm đến vị trí bị xâm nhiễm mầm bệnh (Bean và cs, 2016; Olivera và cs, 2022). TNF α hoạt động và liên kết với một số cytokine Th0, Th1, Th2 hoặc Th17, trong đó các loại interferon đóng vai trò quan trọng, để tạo ra các đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào với mầm bệnh (Mattila và cs, 2011; Kim và cs, 2013; Arrigucci và cs, 2018). Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng vai trò của TNF α hoạt động và liên kết với các cytokine khác để điều hòa đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào đối với các tác nhân gây bệnh truyền nhiễm như vi khuẩn lao bò (Bovine mycobacterium), bệnh Viêm thấp khớp ở người (Rheumatoid arthritis), bệnh Cúm gia cầm (Avian influenza) (Smirnov và cs, 2016; Arrigucci và cs, 2018; Cubillos-Angulo và cs, 2019; Roos và cs, 2019;

Venetsanopoulou và cs, 2022). Sự gia tăng TNF α mRNA trong dòng tế bào MDBK và gia súc bị nhiễm vi rút gây bệnh VDNC trong nghiên cứu này cho thấy vai trò của TNF α trong việc kiểm soát và tác động đến các cytokine khác trong việc tạo ra đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào đối với vi rút gây bệnh VDNC. Hơn nữa, mức độ biểu hiện TNF α và IFN γ mRNA trong dòng tế bào MDBK và gia súc bị nhiễm vi rút gây bệnh VDNC có mối tương quan cao và có ý kiến cho rằng việc kích hoạt và liên kết giữa IFN γ và TNF α trong tế bào MDBK và trên bò có thể được tạo ra một mức độ đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và miễn dịch dịch thể của vật chủ để đáp ứng với vi rút gây bệnh VDNC.

IL-6, cùng với IFN γ , IL-1, và TNF α , được coi là một trong các cytokine quan trọng nhất trong quá trình nhiễm bệnh. IL-6 là một cytokine đa chức năng, đóng vai trò trung tâm trong việc bảo vệ vật chủ do có nhiều hoạt động miễn dịch và tạo máu cũng như khả năng mạnh mẽ để tạo ra các phản ứng miễn dịch ở giai đoạn cấp tính (Tadokoro và cs, 2014). Sau khi nhắm mục tiêu vào thụ thể đặc thù, IL-6 được liên kết và kích hoạt đường truyền tín hiệu JAK/STAT, từ đó điều chỉnh các phản ứng miễn dịch tự nhiên và miễn dịch qua trung gian tế bào đáp ứng với sự xâm nhiễm mầm bệnh (Tadokoro và cs, 2014). Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng IL-6 có thể tạo ra mức độ đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và quá trình gây viêm. Nồng độ IL-6 tăng cao có liên quan đến tình trạng viêm nghiêm trọng, đồng thời tương quan với tỷ lệ tử vong cao (Che Noh và cs, 2022; Yang và cs, 2022b). Sự tăng lên nồng độ của IL-6 trong quá trình nhiễm vi rút là dấu hiệu quan trọng cho biết mức độ của các bệnh truyền nhiễm quan trọng do nhiễm vi rút gây ra như vi rút Viêm gan B, bệnh nhân viêm gan B mãn tính, H1N1 và SARS-CoV-2 (Essa và cs, 2021; Che Noh và cs, 2022; Ding và cs, 2022b; Yang và cs, 2022b). Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng việc điều hòa sản xuất IL-6 trong quá trình đáp ứng miễn dịch với việc nhiễm vi rút LSD trên tế bào và trên động vật là khi lượng gây bệnh VDNC tăng lên. Mức độ IL-6 tăng lên có thể liên quan đến việc kích hoạt tế bào viêm và thường là trong các trường hợp với tiên lượng xấu.

IL-10 cũng là một trong những cytokine quan trọng được sản xuất bởi nhiều tế bào có tác động miễn dịch và chúng có tác dụng chính là điều chỉnh hoạt động miễn dịch ở da (Choudhary và cs, 2018; Kara và cs, 2018). Hơn nữa, IL-10 là một cytokine đa chức năng, đa hướng có tác dụng điều hòa miễn dịch và chống viêm. IL-10 ức chế quá trình đáp ứng cytokine Th1, Kháng nguyên MHC lớp II và các phân tử đồng kích thích (CSM) trên đại thực bào (Harper và cs, 2021; Wang và cs, 2022). IL-10 tăng cường khả năng sống sót của tế bào, tăng sinh tế bào và tăng khả năng sinh kháng thể trong tế bào B (Mahung và cs, 2022; Wang và cs, 2022). IL-10 có thể ức chế hoạt động truyền tín hiệu NF- κ B và tham gia vào quá trình điều hòa đường truyền tín hiệu JAK-STAT, đồng thời đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát khả năng miễn dịch của vi rút thông qua nhận biết sớm và điều hòa khả năng miễn dịch tự nhiên ở vật chủ (Harper và cs, 2021; Chou và cs, 2022; Mahung và cs, 2022). Kết quả nghiên cứu này cho thấy mức độ hiện diện cao của IL-10 mRNA ở giai đoạn đầu sau khi nhiễm vi rút gây bệnh VDNC trong tế bào MDBK và trong máu toàn phần của bò, sau đó mức độ hiện diện này giảm xuống trên cả tế bào nhiễm bệnh và trong máu của động vật. Đó có thể là do trong giai đoạn đầu của nhiễm trùng, Đáp ứng Th1 đối với việc nhiễm vi rút được kích hoạt và IFN γ là cytokine chiếm ưu thế. Sự hiện diện gia tăng của các cytokine chống viêm này ở giai đoạn sau có thể kiểm soát sự tiết ra các cytokine tiền viêm và điều chỉnh sự cân bằng của các cytokine Th-1 và Th-2 trong quá trình nhiễm vi rút gây bệnh VDNC trên tế bào MDBK và trên động vật.

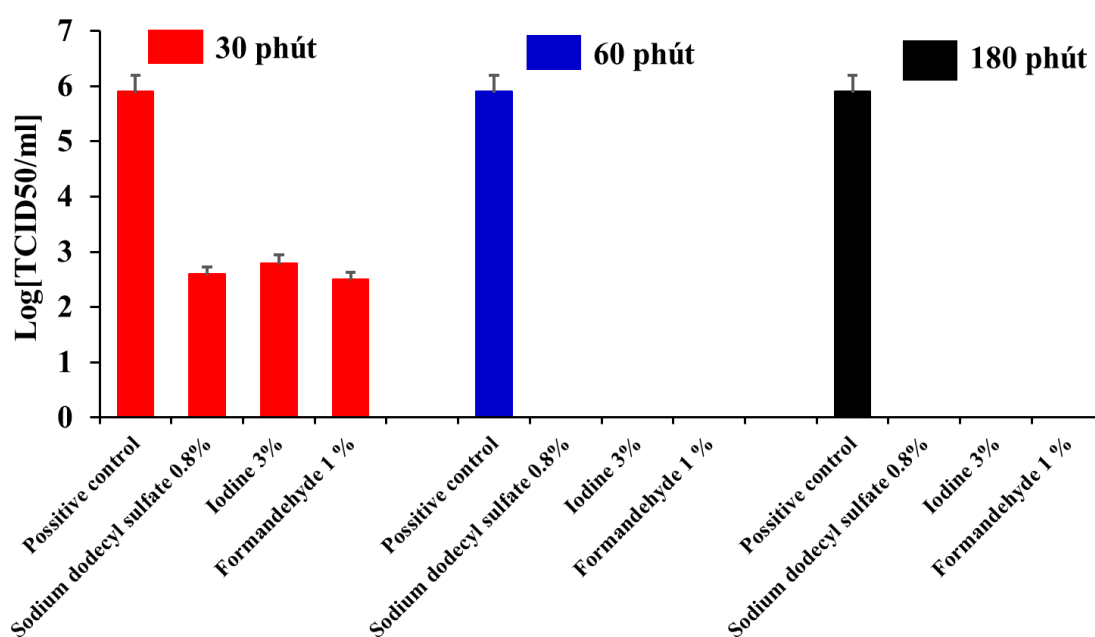
IL-1 α đang đóng vai trò quan trọng và điều chỉnh đáp ứng miễn dịch tự nhiên và miễn dịch qua trung gian tế bào đối với các bệnh truyền nhiễm và các bệnh viêm mãn tính (Ren và cs, 2022; Tahtinen và cs, 2022). IL-1 α thúc đẩy và liên kết sự sản sinh của các cytokine Th17 và kích thích và liên kết sự tiết ra cytokine IFN loại I bằng cách kích hoạt đường dẫn tín hiệu JAK-STAT (Janus kinase - Signal Transducers and Activators of Transcription), MAPK (Mitogen-activated protein kinase) và ERK (Extracellular signal-regulated kinase 1/2)/AKT (Protein Kinase B) từ đó kiểm soát và điều chỉnh đáp ứng miễn dịch đối với mầm

bệnh (Jiang và cs, 2021; Chung và cs, 2022; Li và cs, 2022; Schneider và cs, 2022; Song và cs, 2022a; Tahtinen và cs, 2022). Trong nghiên cứu này, một lượng lớn IL-1 α mRNA trong tế bào MDBK và trong máu toàn phần của động vật đã được tiết ra để đáp ứng với vi rút gây bệnh VDNC. Điều này đã chứng minh vai trò của IL-1 α trong việc kiểm soát đáp ứng miễn dịch và trong việc liên kết với các cytokine khác đối với đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào khi nhiễm vi rút gây bệnh VDNC. Mức độ đáp ứng của IL-1 α và IFN γ mRNA trên tế bào MDBK và trên gia súc nhiễm vi rút này có mối tương quan với nhau và liên quan đến mức độ đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và dịch thể của vật chủ khi có sự xâm nhiễm của vi rút gây bệnh VDNC.

TGF β 1 (Transforming growth factor beta-1) là một cytokine kháng viêm phổ biến nhất mặc dù một số nghiên cứu chỉ ra rằng cytokine này liên quan đến vai trò trong sự biệt hóa của tế bào Th 17 là tế bào có khả năng gây viêm cao tạo ra IL-17 (Wang và cs, 2021; Fix và cs, 2022; Hachana và Larrivee, 2022; Yang và cs, 2022a). TGF β 1 điều chỉnh nhiều quá trình sinh học bao gồm quá trình viêm, sửa chữa mô, hình thành khối u, quá trình phát triển và hệ thống miễn dịch (Fix và cs, 2022; Hachana và Larrivee, 2022). Nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng việc tăng mức độ biểu hiện của IFN γ sẽ ức chế quá trình phosphoryl hóa Smad3 ở hạ lưu tín hiệu TGF β (Transforming Growth Factor beta) và làm giảm sự đáp ứng của TGF β (Wang và cs, 2021; Chen và cs, 2022; Ding và cs, 2022). Kết quả nghiên cứu cho thấy biểu hiện sớm của TGF β 1 trong máu toàn phần của gia súc bị nhiễm vi rút gây bệnh VDNC và sau đó số lượng cytokine này được điều chỉnh giảm xuống cho đến ngày 28 sau gây nhiễm. Điều này cho thấy vai trò của TGF β 1 trong việc kiểm soát và điều chỉnh hệ thống miễn dịch để đáp ứng với vi rút gây bệnh VDNC ở gia súc. MRNA TGF β 1 có thể là gen quan trọng trong việc đáp ứng đối với vi rút này trên động vật.

4.4. Đánh giá sự miễn cảm của một số thuốc sát trùng thông dụng đối với vi rút LSD theo khuyến cáo của WOAH

Kết quả đánh giá khả năng ức chế sự nhân lên của vi rút LSD bởi các chất sát trùng gồm Sodium dodecyl sulfate 0,8%, Iodine 3%, formalin 1%, chloroform 5%, ether 20%, phenol 2%, NaOH 3%, ammonium 0,5% và Virkon 2% trên tế bào MDBK cho thấy mức độ hiệu quả của từng chất sát trùng trong việc tiêu diệt hoàn toàn hoặc làm giảm đáng kể khả năng tồn tại của vi rút LSD trên môi trường tế bào. Kết được trình bày trong bảng 4.19 và các hình 4.32a-4.32c, 4.34-4.35



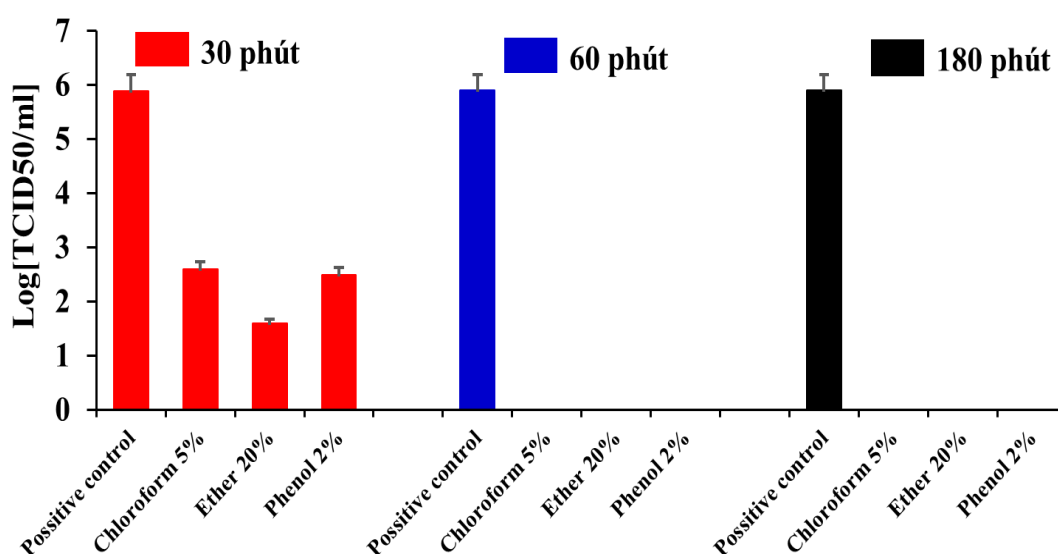
Hình 4.32a. Kết quả đánh giá khả năng ức chế vi rút LSD của một số chất sát trùng bằng phương pháp chuẩn độ vi rút

Kết quả ở Bảng 4.19 và hình 4.32a cho thấy rằng các chất sát trùng Iodine 3%, formaldehyde 1% và Sodium dodecyl sulfate 0,8% có hiệu lực cao trong việc tiêu diệt vi rút LSD trên môi trường tế bào. Sự suy giảm nhanh hiệu giá vi rút sau 30 phút xử lý và sau 60 phút xử lý vi rút không còn được phát hiện bằng phương pháp chuẩn độ đã chứng minh khả năng ức chế mạnh mẽ của các chất này đối với sự nhân lên của vi rút trong giai đoạn đầu (phân tích thống kê với mức ý nghĩa $p < 0,01$). Điều này phù hợp với các khuyến cáo từ WOAH về hiệu quả của các hóa chất nêu trên trong kiểm soát dịch bệnh VDNC.

Bảng 4.19. Kết quả chuẩn độ vi rút LSD sau khi xử lý bằng một số chất sát trùng theo khuyến cáo của WOAH

Chất sát trùng	Thời gian	Giá trị trung bình của TCID₅₀/mL
Đối chứng dương	30 phút	10 ^{5.9}
Sodium dodecyl sulfate 0.8%	30 phút	10 ^{2.6}
Iodine 3%	30 phút	10 ^{2.8}
Formandehyde 1%	30 phút	10 ^{2.5}
Chloroform 5%	30 phút	10 ^{2.6}
Ether 20%	30 phút	10 ^{1.6}
Phenol 2%	30 phút	10 ^{2.5}
NaOH 3%	30 phút	10 ^{2.6}
Amonium 0.5%	30 phút	10 ^{1.6}
Virkon S 2%	30 phút	10 ^{2.5}
Đối chứng âm	30 phút	0
Đối chứng dương	60 phút	10 ^{5.9}
Sodium dodecyl sulfate 0.8%	60 phút	0
Iodine 3%	60 phút	0
Formandehyde 1%	60 phút	0
Chloroform 5%	60 phút	0
Ether 20%	60 phút	0
Phenol 2%	60 phút	0
NaOH 3%	60 phút	0
Amonium 0.5%	60 phút	0
Virkon S 2%	60 phút	0
Đối chứng âm	60 phút	0
Đối chứng dương	180 phút	10 ^{5.9}
Sodium dodecyl sulfate 0.8%	180 phút	0
Iodine 3%	180 phút	0
Formandehyde 1%	180 phút	0
Chloroform 5%	180 phút	0
Ether 20%	180 phút	0
Phenol 2%	180 phút	0
NaOH 3%	180 phút	0
Amonium 0.5%	180 phút	0
Virkon S 2%	180 phút	0
Đối chứng âm	180 phút	0

Theo kết quả bảng 4.19 và hình 4.32b các mẫu được xử lý bằng Chloroform 5%, Ether 20% và Phenol 2% ghi nhận sự suy giảm đáng kể nồng độ vi rút ngay từ thời điểm 30 phút sau xử lý, với giá trị lần lượt là $10^{2.6}$ TCID₅₀/ml, $10^{1.6}$ TCID₅₀/ml và $10^{2.5}$ TCID₅₀/ml. Đặc biệt, sau 60 và 180 phút xử lý, vi rút cũng không còn được phát hiện trong tất cả các mẫu, cho thấy các chất sát trùng này có khả năng tiêu diệt hoàn toàn vi rút LSD. Phân tích thống kê cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy cao ($p < 0,01$) giữa các nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng.

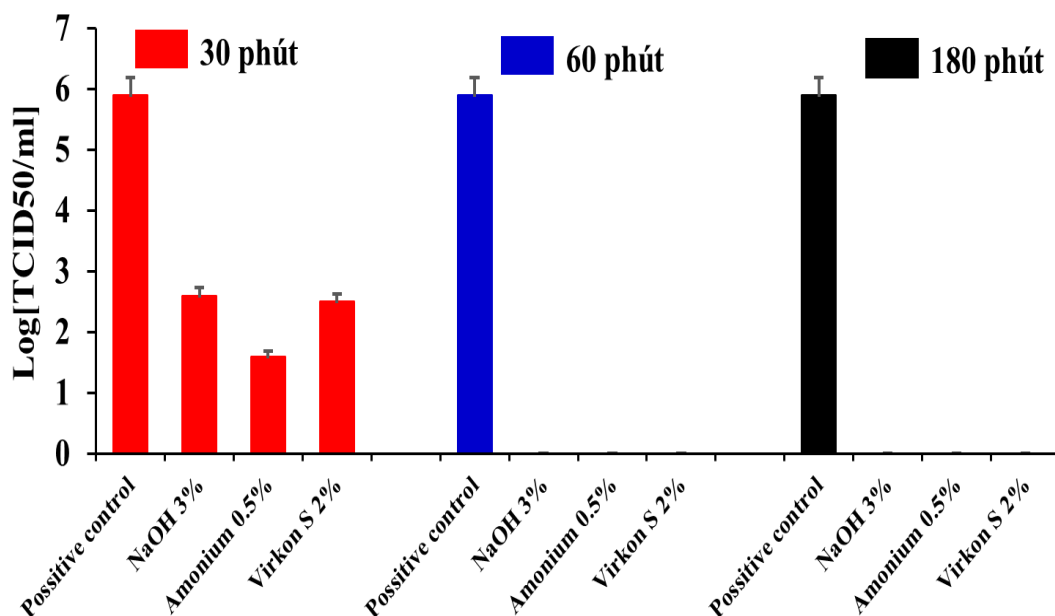


Hình 4.32b. Kết quả đánh giá khả năng ức chế vi rút LSD của một số chất sát trùng bằng phương pháp chuẩn độ vi rút

Kết quả bảng 4.19 và hình 4.32c chất sát trùng NaOH 3%, Amonium 0.5% và Virkon 2% cũng cho thấy khả năng tiêu diệt vi rút LSD, nồng độ vi rút LSD giảm dần theo thời gian xử lý 30 phút là $10^{2.6}$ TCID₅₀/mL đối với chất NaOH 3%, $10^{1.6}$ TCID₅₀/mL đối với Amonium 0.5% và $10^{2.5}$ TCID₅₀/mL đối với Virkon 2%, còn sau 60 phút và 180 phút sau xử lý thì đã tiêu diệt hoàn toàn vi rút.

Nhìn chung, tính miễn cảm của vi rút đối với chất sát trùng phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm loại vi rút (có vỏ bọc hay không có vỏ bọc), kích thước, hình thái và cấu trúc axit nucleic (một sợi hay hai sợi). Vi rút không có vỏ bọc, như vi rút đường ruột, có khả năng chống lại tác dụng của các chất sát trùng phổ biến như cồn 70% và hợp chất amoni bậc bốn 1% tốt hơn so với vi rút có vỏ bọc.

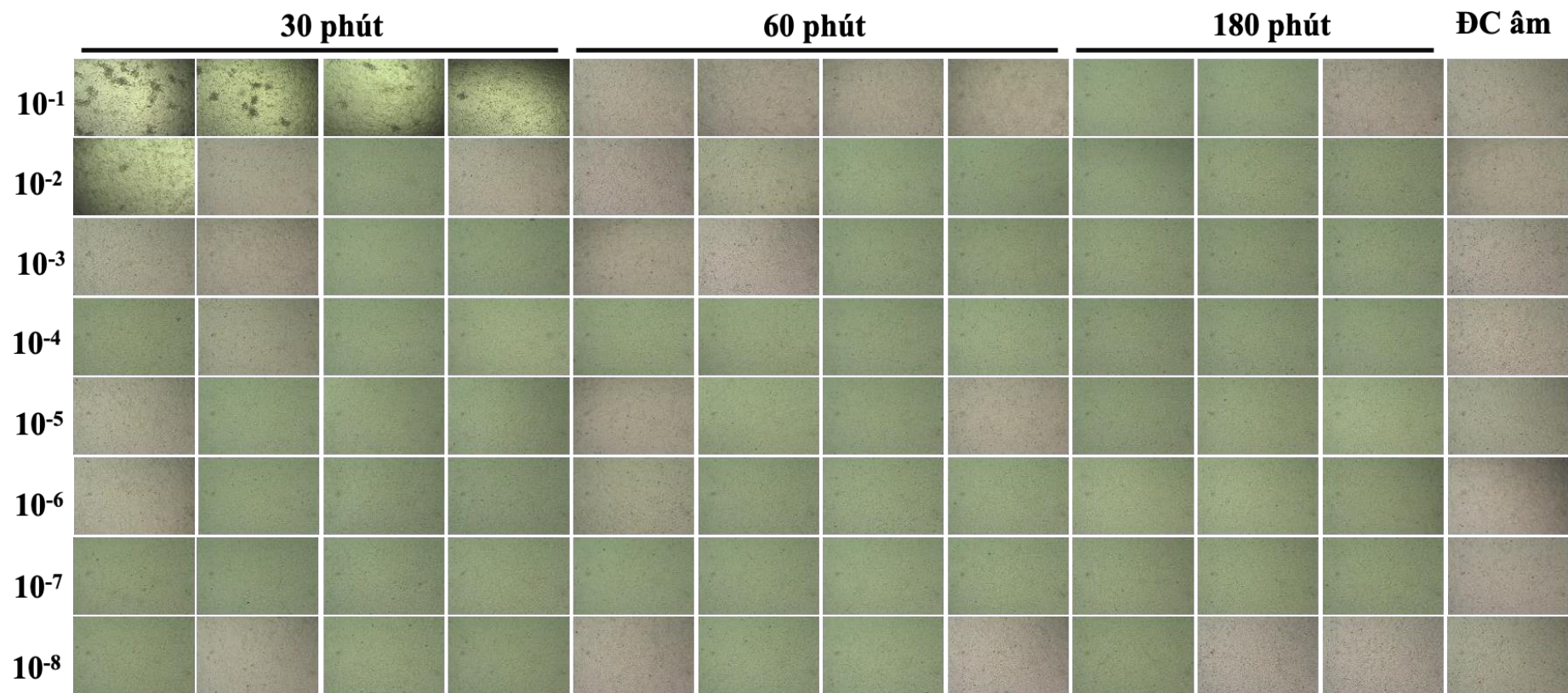
Vi rút có vỏ bọc thường kém ổn định hơn khi ở bên ngoài vật chủ của chúng. vi rút LSD là vi rút có vỏ bọc lipid bên ngoài, tuy nhiên lớp vỏ này cũng khiến vi rút dễ bị bất hoạt bởi các chất sát trùng hoặc dung môi hòa tan lipid.



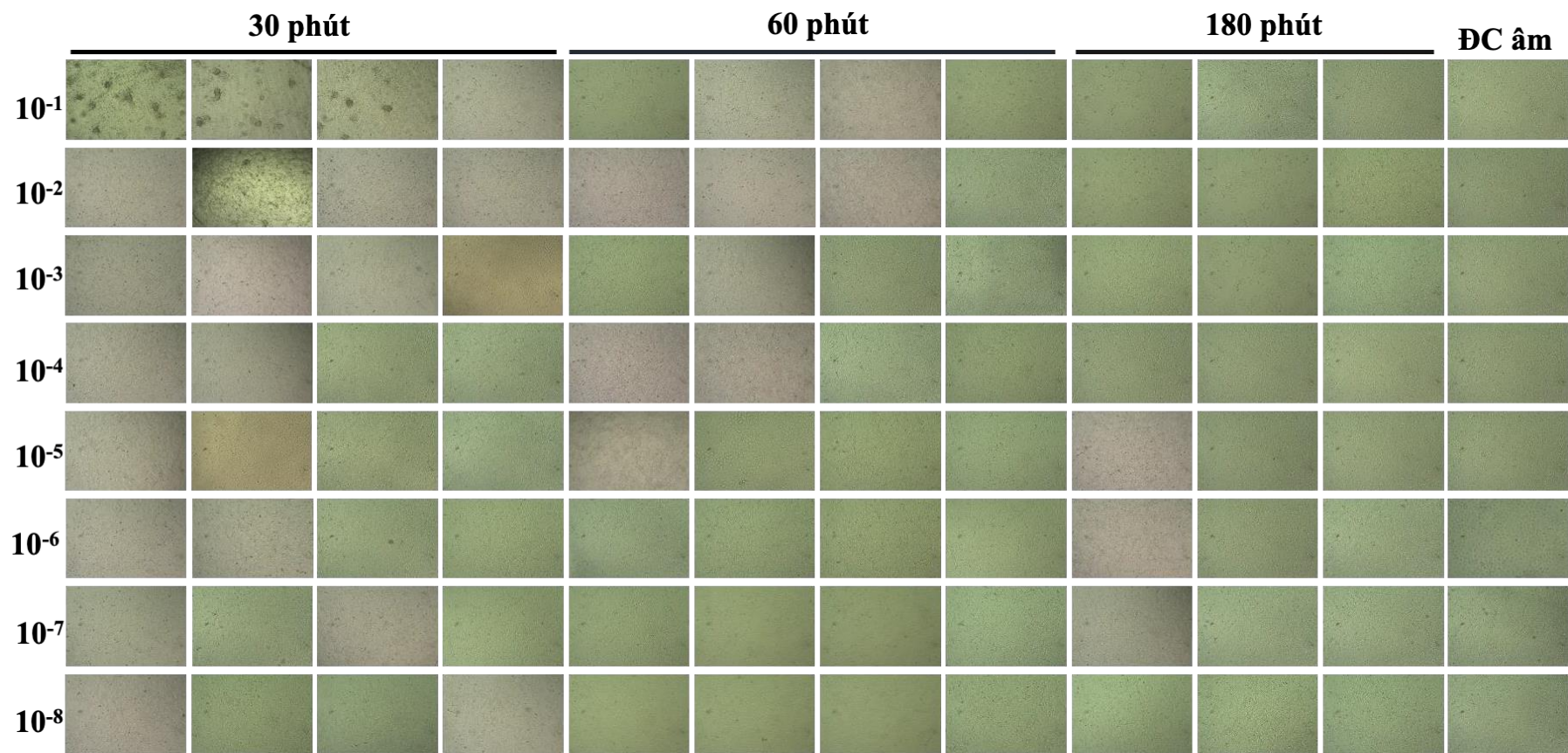
Hình 4.32c. Kết quả đánh giá khả năng ức chế vi rút LSD của một số chất sát trùng bằng phương pháp chuẩn độ vi rút

Ngoài ra một số yếu tố môi trường ảnh hưởng đến hiệu quả của chất khử trùng. Nếu khử trùng đòi hỏi các phản ứng hóa học diễn ra, chẳng hạn như đối với formaldehyde, thì tốc độ khử trùng sẽ cao hơn ở nhiệt độ cao. Ở nhiệt độ lạnh, một số chất khử trùng có thể không hiệu quả do đó tốc độ khử trùng sẽ cực kỳ thấp. Độ ẩm cũng là một yếu tố khác có thể ảnh hưởng đến sự xâm nhập của chất khử trùng vào vi rút. Đối với các phản ứng như chất khử trùng aldehyde, sự thay đổi độ pH cũng sẽ ảnh hưởng đến hiệu quả khử trùng (Lin và ctv, 2020).

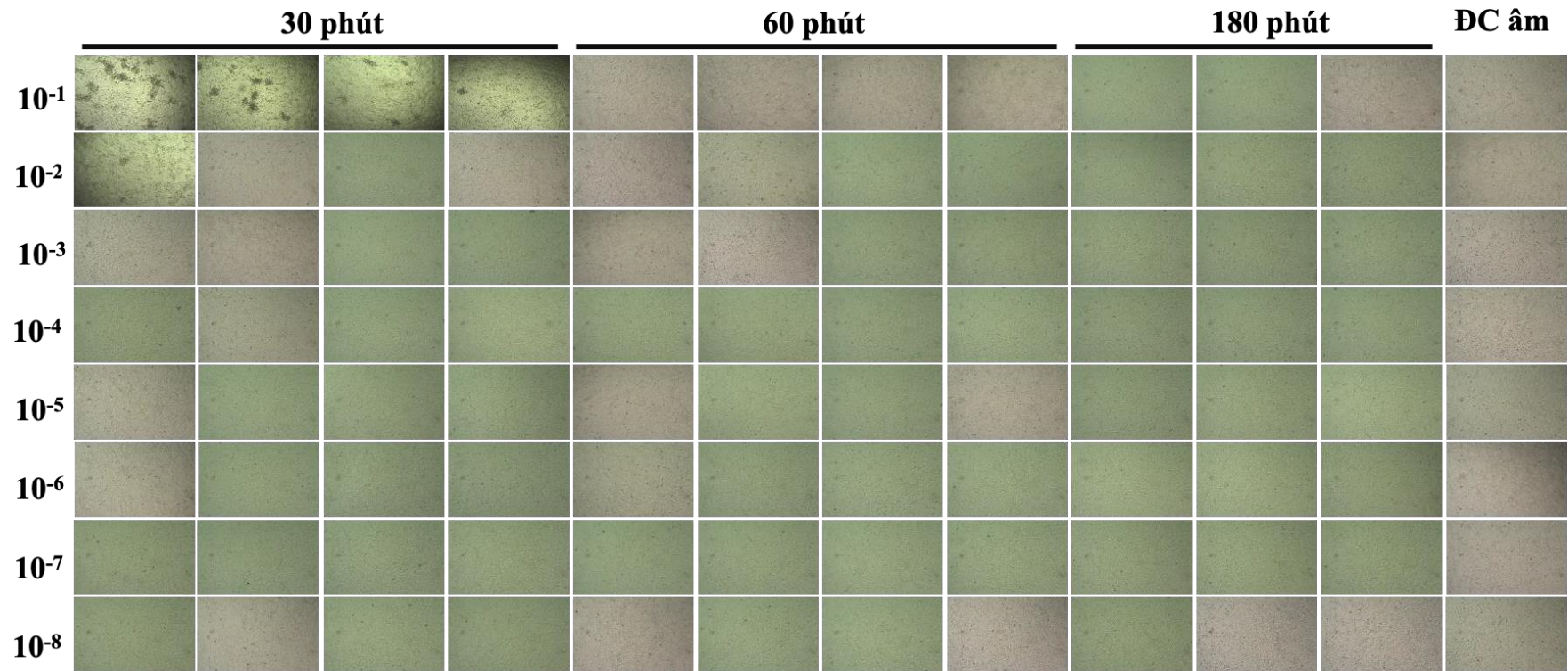
Kết quả nghiên cứu phù hợp với các khuyến cáo của WOA, FAO và một số công trình công bố trước đây cũng đã chứng minh rằng các loại chất này có khả năng ức chế sự nhân lên của vi rút trong môi trường chăn nuôi (Hakobyan và ctv, 2019; Niederwerder và ctv, 2019).



Hình 4.33. Kết quả chuẩn độ vi rút LSD sau khi xử lý bằng Iodine 3% trên tế bào dòng MDBK sau 30, 60 và 180 phút gây nhiễm ở ngày thứ 5 với độ phóng đại 10x



Hình 4.34. Kết quả đánh giá khả năng ức chế vi rút LSD của chất sát trùng Phenol 2% theo khuyến cáo của WOHAI bằng phương pháp chuẩn độ vi rút (với độ phóng đại 10x)



Hình 4.35. Hình ảnh minh họa kết quả đánh giá khả năng ức chế vi rút LSD của chất sát trùng VirkonS 2% theo khuyến cáo của WOHAI bằng phương pháp chuẩn độ vi rút (với độ phóng đại 10x)

PHẦN 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

5.1. Kết luận

1. Đã xác định được 200/200 mẫu bệnh phẩm dương tính với vi rút LSD thu thập tại vùng Bắc Trung bộ bằng phương pháp realtime-PCR theo khuyến cáo của WOAHA. Trong đó, mẫu vảy và u cục cho thấy hàm lượng vi rút cao nhất, khẳng định đây là loại bệnh phẩm thích hợp nhất cho mục đích chẩn đoán phát hiện sự có mặt của vi rút trong mẫu bệnh phẩm.

2. Đã giải trình tự 3 gen chỉ báo (P32, RPO30, GPCR) của 21 chủng vi rút LSD và đăng tải 63 trình tự gen trên GenBank. Phân tích trình tự gen p32 và RPO30, GPO30 cho thấy các chủng vi rút LSD tại Bắc Trung Bộ thuộc phân nhóm tái tổ hợp 2.5 và Subgroup III và có mức độ tương đồng cao với các chủng lưu hành tại Trung Quốc,. Đồng thời nghiên cứu này cũng đã giải trình tự toàn bộ genome của ba chủng vi rút LSD phân lập tại Nghệ An (NA06), Hà Tĩnh (HT18) và Quảng Bình (QB09). Kết quả phân tích hệ di truyền và phân tích trình tự toàn bộ genome của 03 chủng vi rút cho thấy các chủng vi rút này có tính tương đồng cao với các chủng vi rút phân lập tại Trung Quốc, Hồng Kông, Thái Lan và tại phân lập tại Việt Nam năm 2020.

3. Đã phân lập thành công 10 chủng vi rút LSD trên môi trường tế bào dòng MDBK và xác định được hiệu giá vi rút dao động từ $6.3-7.1 \log_{10}$ TCID₅₀/ml. Trong đó vi rút gây nhiễm ban đầu ở nồng độ 0.01MOI cho khả năng nhân lên tốt nhất trên tế bào MDBK. Không có sự biến đổi về đặc tính di truyền hay trình tự nucleotide của 03 chủng HT18 và NA06, QB09 qua 10, 20 và 30 đời cấy chuyển. Gây nhiễm thành công vi rút LSD chủng LSDV/Vietnam/NgheAn/NA06 trên bê thí nghiệm. Kết quả cho thấy bê có phản ứng sốt, biểu hiện lâm sàng rõ rệt, đồng thời vi rút được phát hiện trong máu và dịch tiết từ những ngày đầu sau gây nhiễm, đạt đỉnh từ ngày 11–14. Kết quả đánh giá tính sinh miễn dịch cho thấy bê được tiêm vi rút bất hoạt bằng BEI sau 28 ngày đều sản sinh kháng thể trung hòa và có khả năng bảo hộ khi thử thách cường độc. Đồng thời có sự thay đổi nồng độ các cytokine tiền viêm (IFN γ , IL-

1 α và TNF α) và kháng viêm (IL-6, IL-10 và TGF β 1) trong máu và tế bào khi so với nhóm đối chứng.

4. Đã đánh giá khả năng bất hoạt của 9 loại hóa chất khử trùng thông dụng theo khuyến cáo của WOHAI. Kết quả khẳng định các hóa chất này có hiệu quả tiêu diệt hoàn toàn vi rút LSD trong 60 phút.

5.2. Kiến nghị

Trên cơ sở những kết quả nghiên cứu đạt được, chúng tôi có những kiến nghị, đề xuất sau:

1. Thu thập và phân tích mẫu bệnh phẩm tại các vùng sinh thái khác nhau của Việt Nam, nhằm đánh giá đặc điểm sinh học và sinh học phân tử của vi rút LSD, để đưa ra các khuyến cáo trong phòng chống dịch bệnh và chiến lược sử dụng vắc xin phòng bệnh tại Việt Nam.

2. Cần tiếp tục nghiên cứu độc lực, tính sinh miễn dịch của các chủng vi rút LSD phân lập tại Việt Nam và đề xuất sử dụng các chủng tiềm năng để sản xuất vắc xin phòng bệnh VDNC tại Việt Nam.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN LUẬN ÁN

1. **Trần Anh Tuấn**, Đinh Văn Tài, Đặng Văn Hiệp, Phan Lanh, Nguyễn Thị Huyền, Chu Thị Như, Nguyễn Thanh Thủy, Trương Anh Đức, Trần Thị Thanh Hà, Đặng Vũ Hoàng. Ứng dụng các phương pháp chẩn đoán phát hiện virus gây bệnh viêm da nổi cục từ mẫu bệnh phẩm thực địa. Trang 5-13
Tập chí: Khoa học Kỹ thuật Thú y tập XXX số 5 năm 2023.
2. **Anh Tuan Tran**, Anh Duc Truong, Dung Thi Kim Nguyen, Hung Tuan Nguyen, Thanh Thuy Nguyen, Ha Thi Thanh Tran, Hoang Vu Dang.
Biological properties and diverse cytokine profiles followed by in vitro and in vivo infections with LSDV strain isolated in first outbreaks in Vietnam .
Vet Res Commun 47, 2005–2016 (2023).
3. **Anh Tuan Tran**, Ha Thi Thanh Tran, Anh Duc Truong, Van Tai Dinh, Anh Kieu Dang, Nhu Thi Chu, Lanh Phan, Hoai Thi Phan, Huyen Thi Nguyen, Nga Bui Thi To, Hoang Vu Dang . Molecular characterization of lumpy skin disease virus in North Central Vietnam during 2021 and early 2022.
Vet Ital. 2024 Apr 11;60(1).
4. Ha Thi Thanh Tran, Anh Duc Truong, **Anh Tuan Tran**, Nhu Thi Chu, Vinh The Nguyen and Hoang Vu Dang. A new variant of lumpy skin disease virus circulating in Vietnam based on sequencing analysis of GPCR gene.
Open Veterinary Journal, (2024), Vol. 14: 1701-1707.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Cục Thú y, 2023. Hệ thống báo cáo dịch bệnh dịch bệnh Việt Nam (VAHIS), <https://vahis.vn/member/Dashboard.aspx?id=31>
2. Cục Thú y, 2025. Cục Thú y, 2023. Hệ thống báo cáo dịch bệnh dịch bệnh Việt Nam (VAHIS), <https://vahis.vn/member/Dashboard.aspx?id=31>
3. Cục Thú y, 2021. Báo cáo kết quả giải trình tự vi rút gây bệnh viêm da nổi cục của Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương ngày 16 tháng 11 năm 2020.
4. Nguyễn Quốc Cường, Tiền Ngọc Tiên, Lý Thị Liên Khai (2022). Bệnh Viêm da nổi cục trên bò tại tỉnh Trà Vinh và Đồng Tháp. Khoa học Kỹ thuật Thú Y 29 (7): 25-34
5. Phạm Minh Hằng, Phạm Anh Hùng, Nguyễn Nam Hùng, Chu Thị Thu Thủy, Lê Đắc Vinh, Phạm Thành Nhung, Trần Hùng, Hoàng Thị Ngọc Diệp, Trần Công Tám, Nguyễn Văn Thuận, Đỗ Văn Chung, Huỳnh Ngọc Diệp, Mai Xuân Lý, Nguyễn Thị Hồng Loan, Lê Thị Mai Khanh, 2024. Nghiên cứu bệnh lý học lâm sàng trên gia súc mắc bệnh tự nhiên bệnh viêm da nổi cục. Tạp chí KHKT Thú y tập XXXI Số 2-2024
6. QCVN 01-41:2011/BNNPTNT. Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về yêu cầu xử lý vệ sinh đối với việc tiêu hủy động vật và sản phẩm động vật
7. QCVN 01-83:2011/BNNPTNT. Bệnh động vật-Yêu cầu chung lấy mẫu bệnh phẩm, bảo quản và vận chuyển TCVN 8402:2010. Bệnh động vật-Quy trình mổ khám
8. Trần Thị Thanh Hà, Trương Anh Đức, Lý Đức Việt, Hoàng Văn Tuấn, Nguyễn Thị Chinh, Đặng Thị Kiều Anh, Nguyễn Thê Vinh, Hoàng Thị Nhung, Nông Đại Thế, Đỗ Tiến Đạt, Dương Doãn Doanh, Nguyễn Nam Hùng, Đặng Vũ Hoàng 2021. Phân lập vi rút gây bệnh viêm da nổi cục (Lumpy skin disease-LSD) ở bò trên tế bào dòng Madin-Dabry Bovine Kidney (MDBK). Khoa học kỹ thuật Thú Y 28, 5-12.

9. Võ Thị Hải Lê, Nguyễn Xuân Hòa, Lê Đình Huệ, Lê Hoàn, 2022. Nghiên cứu tình hình bệnh viêm da nổi cục trên đàn trâu, bò tại một số tỉnh thuộc khu vực Bắc Trung Bộ. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y Tập XXIX Số 1, 2022.

Tiếng Anh

10. Abdallah, F.M., El Damaty, H.M., Kotb, G.F., 2018. Sporadic cases of lumpy skin disease among cattle in Sharkia province, Egypt: Genetic characterization of lumpy skin disease virus isolates and pathological findings. *Vet World* 11, 1150-1158.
11. Abera, Z., Degefu, H., Gari, G., Ayana, Z., 2015. Review on epidemiology and economic importance of lumpy skin disease. *Int. J. Basic Appl. Virol* 4, 8-21.
12. Abutarbush, S., Ababneh, M., Al Zoubi, I., Al Sheyab, O., Al Zoubi, M., Alekish, M., Al Gharabat, R., 2015a. Lumpy Skin Disease in Jordan: Disease Emergence, Clinical Signs, Complications and Preliminary-associated Economic Losses. *Transboundary and emerging diseases* 62, 549-554.
13. Abutarbush, S.M., 2015b. Hematological and serum biochemical findings in clinical cases of cattle naturally infected with lumpy skin disease. *The Journal of Infection in Developing Countries* 9, 283-288.
14. Acharya, K.P., Subedi, D., 2020. First outbreak of lumpy skin disease in Nepal. *Transbound Emerg Dis* 67, 2280-2281.
15. Adamu, K., Abayneh, T., Getachew, B., Mohammed, H., Deresse, G., Zekarias, M., Chala, W., Gelaye, E., 2024. Lumpy skin disease virus isolation, experimental infection, and evaluation of disease development in a calf. *Sci Rep* 14, 20460.
16. Agianniotaki, E.I., Chaintoutis, S.C., Haegeman, A., Tasioudi, K.E., De Leeuw, I., Katsoulos, P.D., Sachpatzidis, A., De Clercq, K., Alexandropoulos, T., Polizopoulou, Z.S., Chondrokouki, E.D., Dovas, C.I., 2017a. Development and validation of a TaqMan probe-based real-time

PCR method for the differentiation of wild type lumpy skin disease virus from vaccine virus strains. *J Virol Methods* 249, 48-57.

17. Agianniotaki, E.I., Mathijs, E., Vandenbussche, F., Tasioudi, K.E., Haegeman, A., Iliadou, P., Chaintoutis, S.C., Dovas, C.I., Van Borm, S., Chondrokouki, E.D., De Clercq, K., 2017b. Complete Genome Sequence of the Lumpy Skin Disease Virus Isolated from the First Reported Case in Greece in 2015. *Genome Announc* 5.
18. Agianniotaki, E.I., Tasioudi, K.E., Chaintoutis, S.C., Iliadou, P., Mangana-Vougiouka, O., Kirtzalidou, A., Alexandropoulos, T., Sachpatzidis, A., Plevraki, E., Dovas, C.I., Chondrokouki, E., 2017. Lumpy skin disease outbreaks in Greece during 2015-16, implementation of emergency immunization and genetic differentiation between field isolates and vaccine virus strains. *Vet Microbiol* 201, 78-84.
19. Agianniotaki, E. I., Babiuk, S., Katsoulos, P. D., Chaintoutis, S. C., Praxitelous, A., Quizon, K., Boscós, C., Polizopoulou, Z. S., Chondrokouki, E. D., Dovas, C. I., 2018. Comparative sensitivity study of primary cells, vero, OA3.Ts and ESH-L cell lines to lumpy skin disease, sheeppox, and goatpox viruses detection and growth. *Transbound Emerg Dis* 65(6), 2043-2048.
20. Ahmad, S. F., Patra, M. K., Mahendran, K., Paul, B. R., Khanna, S., Singh, A. K., De, U. K., Agrawal, R. K., Gaur, G. K., Dutt, T., 2023. Hematological and serum biochemical parameters and profiling of cytokine genes in lumpy skin disease in Vrindavani cattle. *Biotech* 13(2), 66.
21. Amenu, A., 2018. Review on Epidemiological Aspects and Economic Impact of Lumpy Skin Disease. *J Dairy Vet Sci* 7, 555716.
22. Akther, M., Akter, S.H., Sarker, S., Aleri, J.W., Annandale, H., Abraham, S., Uddin, J.M., 2023. Global Burden of Lumpy Skin Disease, Outbreaks, and Future Challenges. *Viruses* 15, 1861.
23. Al-Salihi, K., 2014. Lumpy skin disease: Review of literature. *Mirror of research in veterinary sciences and animals* 3, 6-23.

24. Al-Salihi, K., Hassan, I., 2015. Lumpy skin disease in Iraq: study of the disease emergence. *Transboundary and emerging diseases*62, 457-462.
25. Aleksandr, K., Olga, B., David, W.B., Pavel, P., Yana, P., Svetlana, K., Alexander, N., Vladimir, R., Dmitriy, L., Alexander, S., 2020b. Non-vector-borne transmission of lumpy skin disease virus. *Sci Rep*10, 7436.
26. Aleksandr, K., Pavel, P., Olga, B., Svetlana, K., Vladimir, R., Yana, P., Alexander, S., 2020a. Emergence of a new lumpy skin disease virus variant in Kurgan Oblast, Russia, in 2018. *Arch Virol*165, 1343-1356.
27. Ali, A. A., Neamat-Allah, A. N. F., Sheire, H. A. E., Mohamed, R. I., (2021). Prevalence, intensity, and impacts of non-cutaneous lesions of lumpy skin disease among some infected cattle flocks in Nile Delta governorates, Egypt. *Comp Clin Path.* 30, 693-700.
28. Almeida, L.M., Basu, U., Khaniya, B., Taniguchi, M., Williams, J.L., Moore, S.S., Guan, L.L., 2011. Gene expression in the medulla following oral infection of cattle with bovine spongiform encephalopathy. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*74, 110-126.
29. Amin, D.M., Shehab, G., Emran, R., Hassanien, R.T., Alagmy, G.N., Hagag, N.M., Abd-El-Moniem, M.I., Habashi, A.R., Ibraheem, E.M., Shahein, M.A., 2021. Diagnosis of naturally occurring lumpy skin disease virus infection in cattle using virological, molecular, and immunohistopathological assays. *Veterinary World*14, 2230.
30. Annandale, C.H., Holm, D.E., Ebersohn, K., Venter, E.H., 2014. Seminal transmission of lumpy skin disease virus in heifers. *Transboundary and emerging diseases*61, 443-448.
31. Aranke, M., Moheimani, R., Phuphanich, M., Kaye, A. D., Ngo, A. L., Viswanath, O., Herman, J., 2021. Disinfectants In Interventional Practices. *Curr Pain Headache Rep* 25(4), 21.
32. Arrigucci, R., Lakehal, K., Vir, P., Handler, D., Davidow, A.L., Herrera, R., Estrada-Guzman, J.D., Bushkin, Y., Tyagi, S., Lardizabal, A.A.,

- Gennaro, M.L., 2018. Active Tuberculosis Is Characterized by Highly Differentiated Effector Memory Th1 Cells. *Front Immunol*9, 2127.
33. Ayelet, G., Haftu, R., Jemberie, S., Belay, A., Gelaye, E., Sibhat, B., Skjerve, E., Asmare, K., 2014. Lumpy skin disease in cattle in central Ethiopia: outbreak investigation and isolation and molecular detection of the virus. *Rev Sci Tech*33, 877-887.
 34. Babiuk, S., 2018. Taxonomy, In: Tuppurainen, E.S.M., Babiuk, S., Klement, E. (Eds.) *Lumpy Skin Disease*. Springer International Publishing, Cham, pp. 21-23.
 35. Badhy, S.C., Chowdhury, M.G.A., Settypalli, T.B.K., Cattoli, G., Lamien, C.E., Fakir, M.A.U., Akter, S., Osmani, M.G., Talukdar, F., Begum, N., Khan, I.A., Rashid, M.B., Sadekuzzaman, M., 2021. Molecular characterization of lumpy skin disease virus (LSDV) emerged in Bangladesh reveals unique genetic features compared to contemporary field strains. *BMC Vet. Res* 17, 61.
 36. Badr, Y., Noreldin, A. E., Elewa, Y. H. A., Ahmed, M. S., Inoshima, Y., Baker, N. M., Aamer, W. N., Abas, O. M., Nayel, M., Rahman, M. M., Elgendy, E., Saleh, A. G., El-Neweshy, M. S., 2022. Cellular infiltration, cytokines, and histopathology of skin lesions associated with different clinical forms and stages of naturally occurring lumpy skin disease in cattle. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 90-91,101894.
 37. Bean, C., Spencer, S.K., Bowles, T., Kyle, P.B., Williams, J.M., Gibbens, J., Wallace, K., 2016. Inhibition of T-cell activation attenuates hypertension, TNFalpha, IL-17, and blood-brain barrier permeability in pregnant rats with angiogenic imbalance. *Am J Reprod Immunol*76, 272-279.
 38. Beard, P.M., 2016. Lumpy skin disease: a direct threat to Europe. *Vet Rec*178, 557-558.

39. Boumart, Z., Daouam, S., Belkourati, I., Rafi, L., Tuppurainen, E., Tadlaoui, K.O., El Harrak, M., 2016. Comparative innocuity and efficacy of live and inactivated sheeppox vaccines. *BMC Vet Res*12, 133.
40. Bowen, J.L., Olson, J.K., 2013. IFN γ influences type I interferon response and susceptibility to Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Viral Immunol*26, 223-238.
41. Carn, V., Kitching, R., 1995a. The clinical response of cattle experimentally infected with lumpy skin disease (Neethling) virus. *Archives of virology*140, 503-513.
42. Cetre-Sossah, C., Dickmu, S., Kwiatek, O., Albina, E., 2017. A G-protein-coupled chemokine receptor: A putative insertion site for a multi-pathogen recombinant capripoxvirus vaccine strategy. *J Immunol Methods*448, 112-115.
43. Che Noh, I., Avoi, R., Abdullah Nurul, A., Ahmad, I., Abu Bakar, R., 2022. Analysis of serum and gene expression profile of cytokines (IL-6, TNF-alpha and TGF-beta1) in chronic hepatitis C virus infection. *PeerJ*10, e13330.
44. Chen, B., Mu, C., Zhang, Z., He, X., Liu, X., 2022. The Love-Hate Relationship Between TGF-beta Signaling and the Immune System During Development and Tumorigenesis. *Front Immunol*13, 891268.
45. Chou, L.F., Chen, T.W., Yang, H.Y., Tian, Y.C., Chang, M.Y., Hung, C.C., Lai, C.H., Hsu, S.H., Tsai, C.Y., Ko, Y.C., Lian, J.H., Yang, C.W., 2022. Implication of the IL-10-Expression Signature in the Pathogenicity of *Leptospira*-Infected Macrophages. *Microbiol Spectr*10, e0259521.
46. Choudhari, A., Moregaonkar, S., Gangane, G., Markandeya, N., Narladkar, B., 2020. Lumpy skin disease (lsd), an emerging disease in India: a review. *Agricultural Reviews* 41, 398-402.
47. Choudhary, M.L., Alagarasu, K., Chaudhary, U., Kawale, S., Malasane, P., Gurav, Y.K., Padbidri, V., Kadam, D., Sangle, S.A., Salvi, S., Bavdekar, A.R., D'Costa, P., Chadha, M.S., 2018. Association of Single Nucleotide

Polymorphisms in TNFA and IL10 Genes with Disease Severity in Influenza A/H1N1pdm09 Virus Infections: A Study from Western India. *Viral Immunol*31, 683-688.

48. Chung, A.W., Kozielski, A.J., Qian, W., Zhou, J., Anselme, A.C., Chan, A.A., Pan, P.Y., Lee, D.J., Chang, J.C., 2022. Tocilizumab overcomes chemotherapy resistance in mesenchymal stem-like breast cancer by negating autocrine IL-1A induction of IL-6. *NPJ Breast Cancer*8, 30.
49. Clemmons, E.A., Alfson, K.J., Dutton III, J.W., 2021. Transboundary animal diseases, an overview of 17 diseases with potential for global spread and serious consequences. *Animals*11, 2039.
50. Coetzer, J. A. W. , Tuppurainen, E. , Babiuk, S. , & Wallace, D. B. (2018). Lumpy Skin Disease. In “Infectious Diseases of Livestock. Part 2”, Anipedia. <https://anipedia.org/resources/lumpy-skin-disease/1201>
51. Conley, L., Tao, Y., Henry, A., Koepf, E., Cecchini, D., Pieracci, J., Ghose, S., 2017. Broad-spectrum microbicidal activity, toxicologic assessment, and materials compatibility of a new generation of accelerated hydrogen peroxide-based environmental surface disinfectant. *Biotechnol Bioeng* 114(4), 813-820.
52. Coussens, P. M., Verman, N., Coussens, M. A., Elftman, M. D., McNulty, A. M., 2004. Cytokine Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Tissues of Cattle Infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Evidence for an Inherent Proinflammatory Gene Expression Pattern. *Infect Immun* 72, 1409-22.
53. Cubillos-Angulo, J.M., Arriaga, M.B., Silva, E.C., Muller, B.L.A., Ramalho, D.M.P., Fukutani, K.F., Miranda, P.F.C., Moreira, A.S.R., Ruffino-Netto, A., Lapa, E.S.J.R., Sterling, T.R., Kritski, A.L., Oliveira, M.M., Andrade, B.B., 2019. Polymorphisms in TLR4 and TNFA and Risk of *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Development of Active Disease in Contacts of Tuberculosis Cases in Brazil: A Prospective Cohort Study. *Clin Infect Dis* 69, 1027-1035.

54. Das, M., Chowdhury, M.S.R., Akter, S., Mondal, A.K., Uddin, M.J., Rahman, M.M., Rahman, M.M., 2021. An updated review on lumpy skin disease: perspective of Southeast Asian countries. *J. adv. biotechnol. exp. ther*4, 322-333.
55. Datten, B., Chaudhary, A.A., Sharma, S., Singh, L., Rawat, K.D., Ashraf, M.S., Alneghery, L.M., Aladwani, M.O., Rudayni, H.A., Dayal, D., Kumar, S., Chaubey, K.K., 2023. An Extensive Examination of the Warning Signs, Symptoms, Diagnosis, Available Therapies, and Prognosis for Lumpy Skin Disease. *Viruses*15, 604.
56. Di Felice, E., Pinoni, C., Khaiseb, S., Camma, C., Capobianco Dondona, A., Polci, A., Molini, U., Monaco, F., 2020. Complete Coding Sequences of Lumpy Skin Disease Virus Strains Isolated from Cutaneous Lesions in Namibian Cattle during 2016 Outbreaks. *Microbiol Resour Announc* 9, e00124-20.
57. Ding, H.X., Dong, N.X., Zhou, C.X., Wang, F.J., Xing, N., Ma, H.F., Hou, L., 2022. Liraglutide Attenuates Restenosis After Vascular Injury in Rabbits With Diabetes Via the TGF-beta/Smad3 Signaling Pathway. *Altern Ther Health Med* 28, 22-28.
58. Douglass, N., Munyanduki, H., Omar, R., Gers, S., Mutowembwa, P., Heath, L., Williamson, A.L., 2020. Influence of the Viral Superoxide Dismutase (SOD) Homologue on Lumpy Skin Disease Virus (LSDV) Growth, Histopathology and Pathogenicity. *Vaccines (Basel)* 8, 664.
59. Douglass, N., Van Der Walt, A., Omar, R., Munyanduki, H., Williamson, A.L., 2019. The complete genome sequence of the lumpy skin disease virus vaccine Herbivac LS reveals a mutation in the superoxide dismutase gene homolog. *Arch Virol*164, 3107-310
60. Eggers, M., 2019. Infectious Disease Management and Control with Povidone Iodine. *Infect Dis Ther* 8(4), 581-593.
61. El-Bagoury, G. F., El-Toukhy, E. I., Mohammed G. El-Hamady, M. G., 2023. Phylogenetic and sequence analysis of Lumpy skin disease virus

- circulating in some governorates of Egypt during 2019/2020. *Benha Veterinary Medical Journal* 44, 45-50
62. Elhaig, M. M., Selim, A., Mahmoud, M., 2017. Lumpy Skin Disease in Cattle: Frequency of Occurrence in a Dairy Farm and a Preliminary Assessment of Its Possible Impact on Egyptian Buffaloes. *Onderstepoort J Vet Res* 84, 1–6.
 63. El-Kenawy, A. A., El-Tholoth, M. S., 2011. Lumpy Skin Disease Virus Identification in Different Tissues of Naturally Infected Cattle and Chorioallantoic Membrane of Embryonated Chicken Eggs Using Immunofluorescence, Immunoperoxidase Techniques and Polymerase Chain Reaction. *Int J Virol* 158–166.
 64. El-Tholoth, M., El-Kenawy, A.A., 2016. G-Protein-Coupled Chemokine Receptor Gene in Lumpy Skin Disease Virus Isolates from Cattle and Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) in Egypt. *Transbound Emerg Dis* 63, e288-e295.
 65. Essa, S., Siddique, I., Saad, M., Raghupathy, R., 2021. Modulation of Production of Th1/Th2 Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Neutrophils by Hepatitis C Virus Infection in Chronically Infected Patients. *Pathogens* 10, 1519.
 66. European Food Safety Authority (2015). Scientific Opinion on lumpy skin disease1 EFSA Panel on Animal Health and Welfare. *EFSA Journal* 13(1):3986
 67. Fagbo, S., Coetzer, J.A., Venter, E.H., 2014. Seroprevalence of Rift Valley fever and lumpy skin disease in African buffalo (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park and Hluhluwe-iMfolozi Park, South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 85, e1-e7.
 68. Fay, P. C., Cook, C. G., Wijesiriwardana, N., Tore, G., Comtet, L., Carpentier, A., Shih, B., Freimanis, G., Haga, I. R., Beard, P. M., 2020. Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells are a suitable cell line for the propagation and study of the bovine poxvirus lumpy skin disease virus. *J Virol Methods* 285:113943.

69. Fay, P. C., Wijesiriwardana, N., Munyanduki, H., Sanz-Bernardo, B., Lewis, I., Haga, I. R., Moffat, K., van Vliet, A. H. M., Hope, J., Graham, S. P., Beard, P. M., 2022. The immune response to lumpy skin disease virus in cattle is influenced by inoculation route. *Front Immunol* 13, 1051008.
70. Fix, S.M., Forget, M.A., Sakellariou-Thompson, D., Wang, Y., Griffiths, T.M., Lee, M., Haymaker, C.L., Dominguez, A.L., Basar, R., Reyes, C., Kumar, S., Meyer, L.A., Hwu, P., Bernatchez, C., Jazaeri, A.A., 2022. CRISPR-edited TGFBR2 knockout renders human ovarian cancer tumor-infiltrating lymphocytes resistant to TGF-beta signaling. *J Immunother Cancer* 10, 10, e003750.
71. Flannery, J., Shih, B., Haga, I.R., Ashby, M., Corla, A., King, S., Freimanis, G., Polo, N., Tse, A.C., Brackman, C.J., Chan, J., Pun, P., Ferguson, A.D., Law, A., Lycett, S., Batten, C., Beard, P.M., 2022. A novel strain of lumpy skin disease virus causes clinical disease in cattle in Hong Kong. *Transbound Emerg Dis* 69, e336-e343.
72. Gari, G., Abie, G., Gizaw, D., Wubete, A., Kidane, M., Asgedom, H., Bayissa, B., Ayelet, G., Oura, C.A., Roger, F., Tuppurainen, E.S., 2015. Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three capripoxvirus vaccine strains against lumpy skin disease virus. *Vaccine* 33, 3256-3261.
73. Gumbe, A.F., 2018. Review on lumpy skin disease and its economic impacts in Ethiopia. *J. Dairy Vet. Anim. Res* 7, 39-46.
74. Gupta, T., Patial, V., Bali, D., Angaria, S., Sharma, M., Chahota, R., 2020. A review: Lumpy skin disease and its emergence in India. *Vet Res Commun* 44, 111-118.
75. Hachana, S., Larrivee, B., 2022. TGF-beta Superfamily Signaling in the Eye: Implications for Ocular Pathologies. *Cells* 11, 2336.
76. Haegeman, A., Sohier, C., Mostin, L., De Leeuw, I., Van Campe, W., Philips, W., De Regge, N., De Clercq, K., 2023. Evidence of lumpy skin

disease virus transmission from subclinically infected cattle by *Stomoxys calcitrans*. *Viruses*15, 1285.

77. Haftu, R., 2012. Lumpy Skin Disease (Lsd): Outbreak Investigation, Isolation and Molecular Detection of Lsdv in Selected Areas of Eastern Shewa, Ethiopia'. PhD Proposal1, 1-65.
78. Haider, A., Abbas, Z., Taqveem, A., Ali, A., Khurshid, M., Naggar, R.F.E., Rohaim, M.A., Munir, M., 2024. Lumpy Skin Disease: Insights into Molecular Pathogenesis and Control Strategies. *Veterinary Sciences*11, 561.
79. Hakobyan, A., Arabyan, E., Kotsinyan, A., Karalyan, Z., Sahakyan, H., Arakelov, V., Nazaryan, K., Ferreira, F., Zakaryan, H., 2019. Inhibition of African swine fever virus infection by genkwanin. *Antiviral research* 167, 78-82.
80. Hamdi, J., Boumart, Z., Daouam, S., El Arkam, A., Bamouh, Z., Jazouli, M., Tadlaoui, K.O., Fihri, O.F., Gavrilov, B., El Harrak, M., 2020a. Development and Evaluation of an Inactivated Lumpy Skin Disease Vaccine for Cattle. *Vet Microbiol*245, 108689.
81. Hamdi, J., Boumart, Z., Daouam, S., El Arkam, A., Bamouh, Z., Jazouli, M., Tadlaoui, K.O., Fihri, O.F., Gavrilov, B., El Harrak, M., 2020b. Development and evaluation of an inactivated lumpy skin disease vaccine for cattle. *Veterinary microbiology*245, 108689.
82. Harper, T.A., Bacot, S.M., Fennell, C.J., Matthews, R.L., Zhu, C., Yue, P., Benton, A., Friedman, D., Akue, A., KuKuruga, M.A., Lee, S., Wang, T., Feldman, G.M., 2021. IL-10 Signaling Elicited by Nivolumab-Induced Activation of the MAP Kinase Pathway Does Not Fully Contribute to Nivolumab-Modulated Heterogeneous T Cell Responses. *Int J Mol Sci* 22,11848.
83. Hasib, F.M.Y., Islam, M.S., Das, T., Rana, E.A., Uddin, M.H., Bayzid, M., Nath, C., Hossain, M.A., Masuduzzaman, M., Das, S., Alim, M.A., 2021.

- Lumpy skin disease outbreak in cattle population of Chattogram, Bangladesh. *Vet Med Sci*7, 1616-1624.
84. Huang, Z.J., Li, H.C., Liu, S., Song, X.J., 2012. Activation of cGMP-PKG signaling pathway contributes to neuronal hyperexcitability and hyperalgesia after in vivo prolonged compression or in vitro acute dissociation of dorsal root ganglion in rats. *Sheng li xue bao: [Acta physiologica Sinica]*64, 563-576.
 85. Ireland, D.C., Binopal, Y.S, 1998. Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *Journal of Virol Methods* 74, 1-7.
 86. Jameel, G.H., 2016. Determination of complications decrease the risk factor in Cattle infected by lumpy skin disease virus in diyala province, Iraq. *International Journal of Micro Biology, Genetics and Monocular Biology Research*2, 1-9.
 87. Jiang, M., Zhong, G., Zhu, Y., Wang, L., He, Y., Sun, Q., Wu, X., You, X., Gao, S., Tang, D., Wang, D., 2021. Retardant effect of dihydroartemisinin on ulcerative colitis in a JAK2/STAT3-dependent manner. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 53, 1113-1123.
 88. Juskiewicz, M., Walczak, M., Woźniakowski, G., 2019. Characteristics of selected active substances used in disinfectants and their virucidal activity against ASFV. *Journal of veterinary research* 63, 17-25.
 89. Kamr, A., Hassan, H., Toribio, R., Anis, A., Nayel, M., Arbag, A., 2022. Oxidative stress, biochemical, and histopathological changes associated with acute lumpy skin disease in cattle. *Vet World*. 15(8),1916–1923.
 90. Kara, P.D., Mather, A.S., Pretorius, A., Chetty, T., Babiuk, S., Wallace, D.B., 2018. Characterisation of putative immunomodulatory gene knockouts of lumpy skin disease virus in cattle towards an improved vaccine. *Vaccine*36, 4708-4715.
 91. Kariwa, H., Fujii, N., Takashima, I., 2006. Inactivation of SARS coronavirus by means of povidone-iodine, physical conditions and chemical reagents. *Dermatology* 212 Suppl 1(Suppl 1), 119-123.

92. Khan, Y.R., Ali, A., Hussain, K., Ijaz, M., Rabbani, A.H., Khan, R.L., Abbas, S.N., Aziz, M.U., Ghaffar, A., Sajid, H.A., 2021. A review: Surveillance of lumpy skin disease (LSD) a growing problem in Asia. *Microbial pathogenesis*158, 105050.
93. Kayesh, M. E. H., Hussan, M. T., Hashem, M. A., Eliyas, M., Anower, A. K. M. M., 2020. Lumpy Skin Disease Virus Infection: An Emerging Threat to Cattle Health in Bangladesh. *Hosts Viruses* 7, 97.
94. Krešić, N., Šimić, I., Bedeković, T., Acinger-Rogić, Ž., Lojkić, I., 2020. Evaluation of Serological Tests for Detection of Antibodies against Lumpy Skin Disease Virus. *J Clin Microbiol* 58, e00348-20.
95. Kim, Y., Lee, S., Kim, Y.S., Lawler, S., Gho, Y.S., Kim, Y.K., Hwang, H.J., 2013. Regulation of Th1/Th2 cells in asthma development: a mathematical model. *Math Biosci Eng*10, 1095-1133.
96. Koirala, P., Meki, I.K., Maharjan, M., Settypalli, B.K., Manandhar, S., Yadav, S.K., Cattoli, G., Lamien, C.E., 2022. Molecular Characterization of the 2020 Outbreak of Lumpy Skin Disease in Nepal. *Microorganisms*10.
97. Konnai, S., Usui, T., Ohashi, K., Onuma, M., 2003. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. *Vet Microbiol*94, 283-294.
98. Kononov, A., Byadovskaya, O., Kononova, S., Yashin, R., Zinyakov, N., Mischenko, V., Perevozchikova, N., Sprygin, A., 2019a. Detection of vaccine-like strains of lumpy skin disease virus in outbreaks in Russia in 2017. *Arch Virol*164, 1575-1585.
99. Kononov, A., Prutnikov, P., Shumilova, I., Kononova, S., Nesterov, A., Byadovskaya, O., Pestova, Y., Diev, V., Sprygin, A., 2019b. Determination of lumpy skin disease virus in bovine meat and offal products following experimental infection. *Transboundary and emergin diseases*66, 1332-1340.
100. Kononova, S., Kononov, A., Shumilova, I., Byadovskaya, O., Nesterov, A., Prutnikov, P., Babiuk, S., Sprygin, A., 2020. A lumpy skin disease virus

which underwent a recombination event demonstrates more aggressive growth in primary cells and cattle than the classical field isolate. *Transbound Emerg Dis* 68, 1377-1383

101. Krotova, A., Byadovskaya, O., Shumilova, I., van Schalkwyk, A., Sprygin, A., 2022a. An in-depth bioinformatic analysis of the novel recombinant lumpy skin disease virus strains: from unique patterns to established lineage. *BMC Genomics* 23, 396.
102. Krotova, A., Byadovskaya, O., Shumilova, I., Zinyakov, N., van Schalkwyk, A., Sprygin, A., 2022b. Molecular characterization of a novel recombinant lumpy skin disease virus isolated during an outbreak in Tyumen, Russia, in 2019. *Transbound Emerg Dis* 69, e2312-e2317.
103. Krotova, A., Mazloun, A., Byadovskaya, O., Sprygin, A., 2022c. Phylogenetic analysis of lumpy skin disease virus isolates in Russia in 2019-2021. *Arch Virol* 167, 1693-1699.
104. Kumar, N., Chander, Y., Kumar, R., Khandelwal, N., Riyesh, T., Chaudhary, K., Shanmugasundaram, K., Kumar, S., Kumar, A., Gupta, M. K., Pal, Y., Barua, S., Tripathi, B. N., 2021. Isolation and characterization of lumpy skin disease virus from cattle in India. *PLoS One*. 2021 Jan 11;16(1):e0241022.
105. Kutumbetov, L., Ragatova, A., Azanbekova, M., Myrzakhmetova, B., Aldayarov, N., Zhugunissov, K., Abduraimov, Y., Nissanova, R., Sarzhigitova, A., Kemalova, N., Issimov, A., 2025. Investigation of the Pathogenesis of Lumpy Skin Disease Virus in Indigenous Cattle in Kazakhstan. *Pathogens* 14(6), 577.
106. Lambert, M., Benmoussa, A., Diallo, I., Ouellet-Boutin, K., Dorval, V., Majeau, N., Joly-Beauparlant, C., Droit, A., Bergeron, A., Têtu, B., Fradet, Y., Pouliot, F., Provost, P., 2021. Identification of Abundant and Functional dodecaRNAs (doRNAs) Derived from Ribosomal RNA. *Int J Mol Sci* 22, 9757.

107. Lamien, C.E., Le Goff, C., Silber, R., Wallace, D.B., Gulyaz, V., Tuppurainen, E., Madani, H., Caufour, P., Adam, T., El Harrak, M., Luckins, A.G., Albina, E., Diallo, A., 2011a. Use of the Capripoxvirus homologue of Vaccinia virus 30 kDa RNA polymerase subunit (RPO30) gene as a novel diagnostic and genotyping target: development of a classical PCR method to differentiate Goat poxvirus from Sheep poxvirus. *Vet Microbiol*149, 30-39.
108. Lamien, C.E., Lelenta, M., Goger, W., Silber, R., Tuppurainen, E., Matijevic, M., Luckins, A.G., Diallo, A., 2011b. Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses. *J Virol Methods*171, 134-140.
109. Lee, S., Baker, C.M., Sellens, E., Stevenson, M.A., Roche, S., Hall, R.N., Breed, A.C., Firestone, S.M., 2024. A systematic review of epidemiological modelling in response to lumpy skin disease outbreaks. *Frontiers in Veterinary Science*11, 1459293.
110. Li, L., Qi, C., Li, J., Nan, W., Wang, Y., Chang, X., Chi, T., Gong, M., Ha, D., De, J., Ma, L., Wu, X., 2022. Quantitative real-time PCR detection and analysis of a lumpy skin disease outbreak in Inner Mongolia Autonomous Region, China. *Front Vet Sci* 9, 936581.
111. Lin, Q., Lim, J. Y. C., Xue, K., Yew, P. Y. M., Owh, C., Chee, P. L., Loh, X. J., 2020. Sanitizing agents for virus inactivation and disinfection. *View (Beijing)* 1(2), e16.
112. Lojkic, I., Simic, I., Kresic, N., Bedekovic, T., 2018. Complete Genome Sequence of a Lumpy Skin Disease Virus Strain Isolated from the Skin of a Vaccinated Animal. *Genome Announc*6.
113. Lu, G., Xie, J., Luo, J., Shao, R., Jia, K., Li, S., 2020. Lumpy skin disease outbreaks in China, since 3 August 2019. *Transbound Emerg Dis* 68, 216-219

114. Lu, G., Xie, J., Luo, J., Shao, R., Jia, K., Li, S., 2021. Lumpy skin disease outbreaks in China, since 3 August 2019. *Transboundary and Emerging Diseases* 68, 216-219.
115. Lubinga, J.C., Tuppurainen, E.S., Mahlare, R., Coetzer, J.A., Stoltsz, W.H., Venter, E.H., 2015. Evidence of transstadial and mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Amblyomma hebraeum* ticks. *Transbound Emerg Dis* 62, 174-182.
116. Ma, J., Yuan, Y., Shao, J., Sun, M., He, W., Chen, J., Liu, Q., 2022. Genomic characterization of lumpy skin disease virus in southern China. *Transbound Emerg Dis* 69, 2788-2799.
117. Mafirakureva, P., Saidi, B., Mbanga, J., 2017. Incidence and molecular characterisation of lumpy skin disease virus in Zimbabwe using the p32 gene. *Trop Anim Health Prod* 49, 47-54.
118. Magori-Cohen, R., Louzoun, Y., Herziger, Y., Oron, E., Arazi, A., Tuppurainen, E., Shpigel, N.Y., Klement, E., 2012. Mathematical modelling and evaluation of the different routes of transmission of lumpy skin disease virus. *Veterinary research* 43, 1-13.
119. Mahung, C., Stepp, W.H., Long, C., Malfitano, M., Saklayici, I., Wallet, S.M., Zhou, L.Y., Zhou, H., Cairns, B.A., Maile, R., 2022. Early expression of IL-10, IL-12, ARG1 and NOS2 genes in peripheral blood mononuclear cells synergistically correlate with patent outcome after burn injury. *J Trauma Acute Care Surg* 93, 702-711.
120. Makris, S., Paulsen, M., Johansson, C., 2017. Type I Interferons as Regulators of Lung Inflammation. *Front Immunol* 8, 259.
121. Manjunathareddy, G. B., Saminathan, M., Sanjeevakumar, L., Rao, S., Dinesh, M., Dhama, K., Singh, K. P., Tripathi, B. N., 2024. Pathological, immunological and molecular epidemiological analysis of lumpy skin disease virus in Indian cattle during a high-mortality epidemic. *Vet Q* 44(1), 1-22.

122. Mathewos, M., Dulo, F., Tanga, Z., Sombo, M., 2022. Clinicopathological and molecular studies on cattle naturally infected with lumpy skin diseases in selected districts of Wolaita Zone, Southern Ethiopia. *BMC Vet Res* 18, 297.
123. Mathijs, E., Vandenbussche, F., Haegeman, A., King, A., Nthangeni, B., Potgieter, C., Maartens, L., Van Borm, S., De Clercq, K., 2016. Complete Genome Sequences of the Neethling-Like Lumpy Skin Disease Virus Strains Obtained Directly from Three Commercial Live Attenuated Vaccines. *Genome Announc* 4.
124. Mathijs, E., Vandenbussche, F., Nguyen, L., Aerts, L., Nguyen, T., De Leeuw, I., Quang, M., Nguyen, H.D., Philips, W., Dam, T.V., Haegeman, A., Van Borm, S., De Clercq, K., 2021. Coding-Complete Sequences of Recombinant Lumpy Skin Disease Viruses Collected in 2020 from Four Outbreaks in Northern Vietnam. *Microbiol Resour Announc* 10, e0089721.
125. Mattila, J.T., Diedrich, C.R., Lin, P.L., Phuah, J., Flynn, J.L., 2011. Simian immunodeficiency virus-induced changes in T cell cytokine responses in cynomolgus macaques with latent *Mycobacterium tuberculosis* infection are associated with timing of reactivation. *J Immunol* 186, 3527-3537.
126. Maw, M.T., Khin, M.M., Hadrill, D., Meki, I.K., Settypalli, T.B.K., Kyin, M.M., Myint, W.W., Thein, W.Z., Aye, O., Palamara, E., Win, Y.T., Cattoli, G., Lamien, C.E., 2022. First Report of Lumpy Skin Disease in Myanmar and molecular Analysis of the Field Virus Isolates. *Microorganisms* 10.
127. Mazloun, A., Van Schalkwyk, A., Babiuk, S., Venter, E., Wallace, D.B., Sprygin, A., 2023. Lumpy skin disease: history, current understanding and research gaps in the context of recent geographic expansion. *Front Microbiol* 14, 1266759.
128. Mercier, A., Arsevska, E., Bournez, L., Bronner, A., Calavas, D., Cauchard, J., Falala, S., Caufour, P., Tisseuil, C., Lefrançois, T., 2018. Spread rate of

- lumpy skin disease in the Balkans, 2015–2016. *Transboundary and Emerging Diseases* 65, 240-243.
129. Milovanović, M., Dietze, K., Milićević, V., Radojičić, S., Valčić, M., Moritz, T., Hoffmann, B., 2019. Humoral immune response to repeated lumpy skin disease virus vaccination and performance of serological tests. *BMC veterinary research* 15, 1-9.
 130. Möller, L., Schünadel, L., Nitsche, A., Schwebke, I., Hanisch, M., Laue, M., 2015. Evaluation of Virus Inactivation by Formaldehyde to Enhance Biosafety of Diagnostic Electron Microscopy. *Viruses* 7(2), 666-679.
 131. Moss, B., 2012. Poxvirus cell entry: how many proteins does it take? *Viruses* 4, 688-707.
 132. Moudgil, G.; Chadha, J.; Khullar, L.; Chhibber, S.; Harjai, K., 2023. Lumpy Skin Disease: A Comprehensive Review on Virus Biology, Pathogenesis, and Sudden Global Emergence. *Preprints 2023*, 2023020074.
 133. Mulatu, E., Feyisa, A., 2018. Review: Lumpy Skin Disease. *Journal of Veterinary Science & Technology* 9: 1–8.
 134. Mutua, E.N., Bett, B.K., Bukachi, S.A., Estambale, B.A., Nyamongo, I.K., 2022. From policy to practice: An assessment of biosecurity practices in cattle, sheep and goats production, marketing and slaughter in Baringo County, Kenya. *Plos one* 17, e0266449.
 135. Neamat-Allah, A.N., 2015. Immunological, hematological, biochemical, and histopathological studies on cows naturally infected with lumpy skin disease. *Vet World* 8, 1131-1136.
 136. Niederwerder, M.C., Stoian, A.M.M., Rowland, R.R.R., Dritz, S.S., Petrovan, V., Constance, L.A., Gebhardt, J.T., Olcha, M., Jones, C.K., Woodworth, J.C., Fang, Y., Liang, J., Hefley, T.J., 2019. Infectious Dose of African Swine Fever Virus When Consumed Naturally in Liquid or Feed. *Emerg Infect Dis* 25, 891-897.
 137. Nongbua, T., Srinontong, P., Tippramuan, P., Aengwanich, W., Ounpomma, D., Wu, Z., 2024. Hematological, biochemical and cytokine

profiles in cattle: effects of lumpy skin disease virus infection and farm size. *Acta Veterinaria-Beograd* 74 (4), 523-537.

138. Olanrewaju, R. O., Lee, J. H., Kim, Y. G., Lee, J., 2024. Antimicrobial and antibiofilm activities of halogenated phenols against *Staphylococcus aureus* and other microbes. *Chemosphere* 367,143646.
139. Olivera, I., Sanz-Pamplona, R., Bolanos, E., Rodriguez, I., Etxeberria, I., Cirella, A., Egea, J., Garasa, S., Migueliz, I., Eguren-Santamaria, I., Sanmamed, M.F., Glez-Vaz, J., Azpilikueta, A., Alvarez, M., Ochoa, M.C., Malacrida, B., Propper, D., de Andrea, C.E., Berraondo, P., Balkwill, F.R., Teijeira, A., Meleo, I., 2022. A therapeutically actionable pro-tumoral axis of cytokines involving interleukin-8, TNF α and IL-1B. *Cancer Discov* 12, 2140-2157.
140. Pal, M., Paulos Gutama, K., 2023. Can Lumpy Skin Disease Be Considered a Zoonosis? *Am J Infect Dis Microbiol* 11, 13–17.
141. Pandey, N., Hopker, A., Prajapati, G., Rahangdale, N., Gore, K., Sargison, N., 2022. Observations on presumptive lumpy skin disease in native cattle and Asian water buffaloes around the tiger reserves of the central Indian highlands. *N Z Vet J* 70(2),101-108.
142. Parvin, R., Chowdhury, E.H., Islam, M.T., Begum, J.A., Nooruzzaman, M., Globig, A., Dietze, K., Hoffmann, B., Tuppurainen, E., 2022. Clinical epidemiology, pathology, and molecular investigation of Lumpy Skin Disease outbreaks in Bangladesh during 2020 - 2021 indicate the re-emergence of an old African strain. *Viruses*14, 2529.
143. Paungpin, W., Sariya, L., Chaiwattananrungruengpaisan, S., Thongdee, M., Kornmatitsuk, B., Jitwongwai, A., Taksinoros, S., Sutummaporn, K., Boonmasawai, S., Nakthong, C., 2022. Coding-complete genome sequence of a Lumpy Skin Disease virus isolated during the 2021 Thailand outbreak. *Microbiology Resource Announcements*11, e00375-00322.
144. Pervin S., Ahamed M.M., Chouhan C.S., Jahan M.S., Ahmed R., Nazmul K.H.M., Nazir H., Siddique M.P., Rahman M.T., Kafi M.A., Rahman, M.

- B., 2023. Isolation, adaptation, and characterization of lumpy skin disease virus from cattle in Bangladesh. *J. Adv. Vet. Anim Res* 10, 563–569.
145. Ren, J., Lu, X., Hall, G., Privratsky, J.R., Robson, M.J., Blakely, R.D., Crowley, S.D., 2022. IL-1 receptor signaling in podocytes limits susceptibility to glomerular damage. *Am J Physiol Renal Physiol* 322, F164-F174.
146. Rhazi, H., Safini, N., Mikou, K., Alhyane, M., Lenk, M., Tadlaoui, K. O., Elharrak, M., 2021. Comparative sensitivity study of primary cells, vero, OA3.Ts and ESH-L cell lines to lumpy skin disease, sheeppox, and goatpox viruses detection and growth. *J Virol Methods* 293, 114164.
147. Roche X, Rozstalnyy A, TagoPacheco D, Pittiglio C, Kamata A, Beltran Alcrudo D, Bisht K, Karki S, Kayamori J, Larfaoui F, Raizman E, VonDobschuetz S, Dhingra MS, Sumption K (2020). Introduction and spread of lumpy skin disease in South, East and Southeast Asia: Qualitative risk assessment and management. *FAO animal production and health, Paper 183*. Rome, FAO.
148. Romanowski, E. G., Yates, K. A., Shanks, R. M. Q., Kowalski, R. P., 2019. Benzalkonium Chloride Demonstrates Concentration-Dependent Antiviral Activity Against Adenovirus In Vitro. *J Ocul Pharmacol Ther* 35(5), 311-314.
149. Roos, E.O., Scott, L.A., Ndou, S., Olea-Popelka, F., Buss, P.E., de Klerk-Lorist, L.M., Warren, R.M., van Helden, P.D., Sylvester, T.T., Miller, M.A., Parsons, S.D.C., 2019. Cytokine gene expression assay as a diagnostic tool for detection of *Mycobacterium bovis* infection in warthogs (*Phacocoerus africanus*). *Sci Rep*9, 16525.
150. Rouby, S., Aboulsoud, E., 2016. Evidence of intrauterine transmission of lumpy skin disease virus. *The Veterinary Journal*209, 193-195.
151. Rouby, S.R., Safwat, N.M., Hussein, K.H., Abdel-Ra'ouf, A.M., Madkour, B.S., Abdel-Moneim, A.S., Hosein, H.I., 2021. Lumpy skin disease outbreaks in Egypt during 2017-2018 among sheeppox vaccinated cattle:

- Epidemiological, pathological, and molecular findings. *PLoS One*16, e0258755.
152. Rovira, J., Roig, N., Nadal, M., Schuhmacher, M., Domingo, J. L., 2016. Human health risks of formaldehyde indoor levels: An issue of concern. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 51(4), 357-363.
 153. Salib, F.A., Osman, A.H., 2011. Incidence of lumpy skin disease among Egyptian cattle in Giza Governorate, Egypt. *Veterinary world*4.
 154. Saltykov, Y. V., Kolosova, A. A., Filonova, N. N., Chichkin, A. N., Feodorova, V. A., 2021. Genetic Evidence of Multiple Introductions of Lumpy Skin Disease Virus into Saratov Region, Russia. *Pathogens* 10, 716.
 155. Sameea Yousefi, P., Dalir-Naghadeh, B., Mardani, K., Jalilzadeh-Amin, G., 2018. Phylogenetic analysis of the lumpy skin disease viruses in northwest of Iran. *Trop Anim Health Prod*50, 1851-1858.
 156. Santhamani, R., Yogisharadhya, R., Venkatesan, G., Shivachandra, S.B., Pandey, A.B., Ramakrishnan, M.A., 2014. Molecular characterization of Indian sheeppox and goatpox viruses based on RPO30 and GPCR genes. *Virus Genes*49, 286-291.
 157. Sanz-Bernardo, B., Haga, I., Wijesiriwardana, N., Hawes, P., Simpson, J., Morrison, L., MacIntyre, N., Brocchi, E., Atkinson, J., Haegeman, A., De Clercq, K., Darpel, K., Beard, P., 2020. Lumpy Skin Disease Is Characterized by Severe Multifocal Dermatitis With Necrotizing Fibrinid Vasculitis Following Experimental Infection. *Veterinary Pathology*57, 388-396.
 158. Sanz-Bernardo B, Haga IR, Wijesiriwardana N, Basu S, Lerner W, Diaz AV, Langlands Z, Denison E, Stoner J, White M, Sanders C, Hawes PC, Wilson AJ, Atkinson J, Batten C, Alphey L, Darpel KE, Gubbins S, Beard PM (2021). Quantifying and Modeling the Acquisition and Retention of Lumpy Skin Disease Virus by Hematophagus Insects Reveals Clinically but Not Subclinically Affected

Cattle Are Promoters of Viral Transmission and Key Targets for Control of Disease Outbreaks. *J. Virol.* 95 (9) e02239-20

159. Schalkwyk, A.V., Byadovskaya, O., Shumilova, I., Wallace, D.B., Sprygin, A., 2022. Estimating evolutionary changes between highly passaged and original parental lumpy skin disease virus strains. *Transbound Emerg Dis* 69, e486-e496.
160. Schmidt, F.I., Bleck, C.K.E., Reh, L., Novy, K., Wollscheid, B., Helenius, A., Stahlberg, H., Mercer, J., 2013. Vaccinia virus entry is followed by core activation and proteasome-mediated release of the immunomodulatory effector VH1 from lateral bodies. *Cell reports*4, 464-476.
161. Schneider, R., Leven, P., Mallesh, S., Bresser, M., Schneider, L., Mazzotta, E., Fadda, P., Glowka, T., Vilz, T.O., Lingohr, P., Kalff, J.C., Christofi, F.L., Wehner, S., 2022. IL-1-dependent enteric gliosis guides intestinal inflammation and dysmotility and modulates macrophage function. *Commun Bio* 15, 811.
162. Selim, A., Manaa, E., Khater, H., 2021. Seroprevalence and risk factors for lumpy skin disease in cattle in Northern Egypt. *Trop Anim Health Prod*53, 350.
163. Şevik, M., Doğan, M., 2017. Epidemiological and Molecular Studies on Lumpy Skin Disease Outbreaks in Turkey during 2014–2015. *Transboundary and Emerging Diseases* 64: 1268–1279.
164. Shumilova, I., Nesterov, A., Byadovskaya, O., Prutnikov, P., Wallace, D.B., Mokeeva, M., Pronin, V., Kononov, A., Chvala, I., Sprygin, A., 2022. A Recombinant Vaccine-like Strain of Lumpy Skin Disease Virus Causes Low-Level Infection of Cattle through Virus-Inoculated Feed. *Pathogens*11.
165. Shumilova, I., Prutnikov, P., Mazloun, A., Krotova, A., Tenitilov, N., Byadovskaya, O., Chvala, I., Prokhvatilova, L., Sprygin, A., 2024. Subclinical infection caused by a recombinant vaccine-like strain poses

- high risks of lumpy skin disease virus transmission. *Front Vet Sci* 11,1330657.
166. Singhla, T., Boonsri, K., Kreausukon, K., Modethed, W., Pringproa, K., Sthitmatee, N., Punyapornwithaya, V., Vinitchaikul, P., 2022. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Lumpy Skin Disease Virus Collected from Outbreaks in Northern Thailand in 2021. *Vet Sci* 9.
 167. Smirnov, S.S., Pisareva, M.M., Smirnova, T.D., Plotnikova, M.A., Sivak, K.V., Vorobiev, K.V., 2016. Influence of Influenza A Virus and Bacterial Lipopolysaccharide on Proliferation and Gene Expression of Cytokines and Other Cellular Factors in Cells of Established Endothelial Cell Line Ecv-304. *Tsitologiya* 58, 916-923.
 168. Smith, G. L., Talbot-Cooper, C., Lu, Y., 2018. How does vaccinia virus interfere with interferon? *Adv Virus Res* 100, 355–378.
 169. Song, H., Ding, Z., Chen, J., Chen, T., Wang, T., Huang, J., 2022a. The AMPK-SIRT1-FoxO1-NF- κ B signaling pathway participates in hesperetin-mediated neuroprotective effects against traumatic brain injury via the NLRP3 inflammasome. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1-14.
 170. Song, Q., Zhao, X., Cao, C., Duan, M., Shao, C., Jiang, S., Zhou, B., Zhou, Y., Dong, W., Yang, Y., Wang, X., Song, H., 2022b. Research advances on interferon (IFN) response during BVDV infection. *Res Vet Sci* 149, 151-158.
 171. Sprygin, A., Artyuchova, E., Babin, Y., Prutnikov, P., Kostrova, E., Byadovskaya, O., Kononov, A., 2018a. Epidemiological characterization of lumpy skin disease outbreaks in Russia in 2016. *Transboundary and emerging diseases* 65, 1514-1521.
 172. Sprygin, A., Artyuchova, E., Babin, Y., Prutnikov, P., Kostrova, E., Byadovskaya, O., Kononov, A., 2018b. Epidemiological characterization of lumpy skin disease outbreaks in Russia in 2016. *Transbound Emerg Dis* 65, 1514-1521.

173. Sprygin, A., Babin, Y., Pestova, Y., Kononova, S., Byadovskaya, O., Kononov, A., 2019a. Complete Genome Sequence of the Lumpy Skin Disease Virus Recovered from the First Outbreak in the Northern Caucasus Region of Russia in 2015. *Microbiology Resource Announcements* 8, e01733-18
174. Sprygin, A., Babin, Y., Pestova, Y., Kononova, S., Wallace, D.B., Van Schalkwyk, A., Byadovskaya, O., Diev, V., Lozovoy, D., Kononov, A., 2018c. Analysis and insights into recombination signals in lumpy skin disease virus recovered in the field. *PLoS One* 13, e0207480.
175. Sprygin, A., Pestova, Y., Byadovskaya, O., Prutnikov, P., Zinyakov, N., Kononova, S., Ruchnova, O., Lozovoy, D., Chvala, I., Kononov, A., 2020a. Evidence of recombination of vaccine strains of lumpy skin disease virus with field strains, causing disease. *PLoS One* 15, e0232584.
176. Sprygin, A., Pestova, Y., Prutnikov, P., Kononov, A., 2018d. Detection of vaccine-like lumpy skin disease virus in cattle and *Musca domestica* L. flies in an outbreak of lumpy skin disease in Russia in 2017. *Transbound Emerg Dis* 65, 1137-1144.
177. Sprygin, A., Pestova, Y., Wallace, D.B., Tuppurainen, E., Kononov, A.V., 2019b. Transmission of lumpy skin disease virus: A short review. *Virus Research* 269, 197637.
178. Sprygin, A., Pestova, Y., Wallace, D.B., Tuppurainen, E., Kononov, A.V., 2019c. Transmission of lumpy skin disease virus: A short review. *Virus Res* 269, 197637.
179. Sprygin, A., Van Schalkwyk, A., Shumilova, I., Nesterov, A., Kononova, S., Prutnikov, P., Byadovskaya, O., Kononov, A., 2020b. Full-length genome characterization of a novel recombinant vaccine-like lumpy skin disease virus strain detected during the climatic winter in Russia, 2019. *Arch Virol* 165, 2675-2677.
180. Sudhakar, S.B., Mishra, N., Kalaiyarasu, S., Ahirwar, K., Chatterji, S., Parihar, O., Singh, V.P., Sanyal, A., 2023. Lumpy skin disease virus

infection in free-ranging Indian gazelles (*Gazella bennetti*), Rajasthan, India. *Emerging Infectious Diseases* 29, 1407.

181. Sudhakar, S.B., Mishra, N., Kalaiyarasu, S., Jhade, S.K., Hemadri, D., Sood, R., Bal, G.C., Nayak, M.K., Pradhan, S.K., Singh, V.P., 2020. Lumpy skin disease (LSD) outbreaks in cattle in Odisha state, India in August 2019: Epidemiological features and molecular studies. *Transbound Emerg Dis* 67, 2408-2422.
182. Suwankitwat, N., Songkasupa, T., Boonpornprasert, P., Sripipattanakul, P., Theerawatanasirikul, S., Deemagarn, T., Suwannaboon, M., Arjkumpa, O., Buamithup, N., Hongswat, A., Jindajang, S., Nipaeng, N., Anpomma, D., Molee, L., Puangjinda, K., Lohlamoh, W., Nuansrichay, B., Narawongsanont, R., Arunvipas, P., Lekcharoensuk, P., 2022. Rapid Spread and Genetic Characterisation of a Recently Emerged Recombinant Lumpy Skin Disease Virus in Thailand. *Vet Sci* 9.
183. Tadesse Degu, B.M., Fesseha, H., 2020. Epidemiological status and economic impact of lumpy skin disease-review. *Int J Recent Biotechnol* 8, 1-15.
184. Tadokoro, T., Wang, Y., Barak, L.S., Bai, Y., Randell, S.H., Hogan, B.L., 2014. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E3641-3649.
185. Tageldin, M. H., Wallace, D. B., Gerdes, G. H., Putterill, J. F., Greyling, R. R., Phosiwa, M. N., Al Busaidy, R. M., Al Ismaaily, S. I., 2014. Lumpy Skin Disease of Cattle: An Emerging Problem in the Sultanate of Oman. *Trop Anim Health Prod* 46, 241–246.
186. Tahtinen, S., Tong, A.J., Himmels, P., Oh, J., Paler-Martinez, A., Kim, L., Wichner, S., Oei, Y., McCarron, M.J., Freund, E.C., Amir, Z.A., de la Cruz, C.C., Haley, B., Blanchette, C., Schartner, J.M., Ye, W., Yadav, M., Sahin, U., Delamarre, L., Mellman, I., 2022. IL-1 and IL-1ra are key regulators of the inflammatory response to RNA vaccines. *Nat Immunol* 23, 532-542.

187. Tasioudi, K.E., Antoniou, S.E., Iliadou, P., Sachpatzidis, A., Plevraki, E., Agianniotaki, E.I., Fouki, C., Mangana-Vougiouka, O., Chondrokouki, E., Dile, C., 2016. Emergence of Lumpy Skin Disease in Greece, 2015. *Transbound Emerg Dis*63, 260-265.
188. Tran, H.T.T., Truong, A.D., Dang, A.K., Ly, D.V., Nguyen, C.T., Chu, N.T., Hoang, T.V., Nguyen, H.T., Nguyen, V.T., Dang, H.V., 2021a. Lumpy skin disease outbreaks in vietnam, 2020. *Transbound Emerg Dis*68, 977-980.
189. Tran, H.T.T., Truong, A.D., Dang, A.K., Ly, D.V., Nguyen, C.T., Chu, N.T., Nguyen, H.T., Dang, H.V., 2021b. Genetic characterization of African swine fever viruses circulating in North Central region of Vietnam. *Transbound Emerg Dis*68, 1697-1699.
190. Tsujimura, K., Murase, H., Bannai, H., Nemoto, M., Yamanaka, T., Kondo, T., 2015. Efficacy of five commercial disinfectants and one anionic surfactant against equine herpesvirus type 1. *J Vet Med Sci* 77(11), 1545-1548.
191. Tuppurainen, E. S. M., Venter, E. H., Coetzer, J. A. W., 2005. The Detection of Lumpy Skin Disease Virus in Samples of Experimentally Infected Cattle Using Different Diagnostic Techniques. *Onderstepoort J Vet Res* 72, 153–164.
192. Tuppurainen, E., Alexandrov, T., Beltrán-Alcrudo, D., 2017a. Lumpy skin disease field manual—A manual for veterinarians. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Animal Production and Health Manual Place. Available online: http://www.fao.org/ag/againfo/home/en/news_archive/2017_New_field_manual_on_lumpy-skin-disease.html.
193. Tuppurainen, E., Dietze, K., Wolff, J., Bergmann, H., Beltran-Alcrudo, D., Fahrion, A., Lamien, C.E., Busch, F., Sauter-Louis, C., Conraths, F.J., 2021a. Vaccines and vaccination against lumpy skin disease. *Vaccines*9, 1136.

194. Tuppurainen, E., Oura, C., 2012. lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transboundary and emerging diseases*59, 40-48.
195. Tuppurainen, E.S.M., Venter, E.H., Shisler, J.L., Gari, G., Mekonnen, G.A., Juleff, N., Lyons, N.A., De Clercq, K., Upton, C., Bowden, T.R., Babiuk, S., Babiuk, L.A., 2017b. Review: Capripoxvirus Diseases: Current Status and Opportunities for Control. *Transbound Emerg Dis*64, 729-745.
196. VAHIS, 2023. Vietnam Animal Health Information System Cuc Thu y.
197. Van Schalkwyk, A., Byadovskaya, O., Shumilova, I., Wallace, D.B., Sprygin, A., 2022a. Estimating evolutionary changes between highly passaged and original parental lumpy skin disease virus strains. *Transbound Emerg Dis*69, e486-e496.
198. van Schalkwyk, A., Kara, P., Heath, L., 2022b. Phylogenomic characterization of historic lumpy skin disease virus isolates from South Africa. *Arch Virol*167, 2063-2070.
199. Venetsanopoulou, A.I., Voulgari, P.V., Drosos, A.A., 2022. Janus kinase versus TNF inhibitors: where we stand today in rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol*18, 485-493.
200. Wang, J., Chen, Z., Li, M., Ziwei, Z., Song, Y., Xu, W., Wang, L., Chen, S., 2022. Genome-wide identification, immune response profile and functional characterization of IL-10 from spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) during host defense against bacterial and viral infection. *Fish Shellfish Immunol*124, 513-524.
201. Wang, W., Guo, J., Wang, D., 2021. Promotion of chemerin in rat diabetic kidney disease through enhancement of TGF-beta1/Smads/CTGF pathway. *Am J Transl Res*13, 10206-10217.
202. WOA, 2021a. Infection with Lumpy Skin Disease Virus. *OIE Terrestrial Manual 2021*, Chapter 11.9.
203. WOA, 2021b. <lumpy-skin-disease.pdf>.
204. WOA, 2021c. <lumpy-skin-disease>.

205. Wolff, J., Beer, M., Hoffmann, B., 2022a. High Efficiency of low dose preparations of an inactivated lumpy skin disease virus vaccine candidate. *Vaccines*10, 1029.
206. Wolff, J., Krstevski, K., Beer, M., Hoffmann, B., 2020. Minimum infective dose of a lumpy skin disease virus field strain from North Macedonia. *Viruses*12, 768.
207. Wolff, J., Tuppurainen, E., Adedeji, A., Meseke, C., Asala, O., Adole, J., Atai, R., Dogonyaro, B., Globig, A., Hoffmann, D., 2021. Characterization of a Nigerian lumpy skin disease virus isolate after experimental infection of cattle. *Pathogens*11, 16.
208. Wolff, J., Tuppurainen, E., Adedeji, A., Meseke, C., Asala, O., Adole, J., Atai, R., Dogonyaro, B., Globig, A., Hoffmann, D., 2022b. Characterization of a Nigerian lumpy skin disease virus isolate after experimental infection of cattle. *Pathogens*11, 16.
209. Xie, S., Cui, L., Liao, Z., Zhu, J., Ren, S., Niu, K., Li, H., Jiang, F., Wu, J., Wang, J., Wu, J., Song, B., Wu, W., Peng, C., 2024. Genomic analysis of lumpy skin disease virus asian variants and evaluation of its cellular tropism. *NPJ Vaccines* 9(1), 65.
210. Yang, I., Son, Y., Shin, J.H., Kim, I.Y., Seong, J.K., 2022a. Ahnak depletion accelerates liver regeneration by modulating the TGF-beta/Smad signaling pathway. *BMB Rep* 55, 401-406.
211. Yang, J.R., Wang, J., Li, H.M., Gao, S., Fan, Y.C., Wang, K., 2022b. IL-6 Promoter Hypomethylation Acts As a Diagnostic Biomarker in Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol*12, 746643.
212. Zan, X., Huang, H., Guo, Y., Di, D., Fu, C., Wang, S., Wu, Y., Wang, J., Wang, Y., Ma, Y., Chai, C., Su, R., Song, Q., Wang, W., 2022. Molecular characterization of a novel subgenotype of lumpy skin disease virus strain isolated in Inner Mongolia of China. *BMC Vet Res*18, 295.

213. Zaros., L.G., Bricarello., P.A., Amarante., A.F., Coutinho., L.L., 2007. Quantification of bovine cytokine gene expression using real-time RT-PCR methodology. *Genetics and Molecular Biology* 30, 575-579.
214. Zewdie, G.A., 2021. Review on: Lumpy Skin Disease: Enhance Awareness on the Epidemiological Situation and Diagnosis; Prevention and Control Measures in Ethiopia. *Virolog. Immunol J* 5, 1–11.
215. Zeynalova, S., Asadov, K., Guliyev, F., Vatani, M., Aliyev, V., 2016. Epizootology and Molecular Diagnosis of Lumpy Skin Disease among Livestock in Azerbaijan. *Front Microbiol* 7, 1022.