

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ MÔI TRƯỜNG
VIỆN THÚ Y



TRẦN ANH TUẤN

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC VÀ SINH
HỌC PHÂN TỬ CỦA CÁC CHỦNG VI RÚT GÂY BỆNH
VIÊM DA NỘI CỤC Ở TRÂU, BÒ LƯU HÀNH TẠI
VÙNG BẮC TRUNG BỘ, VIỆT NAM**

Ngành: Ký sinh trùng và Vi sinh vật học thú y
Mã số: 9640104

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ THÚ Y

HÀ NỘI, NĂM 2025

Công trình được hoàn thành tại: VIỆN THÚ Y

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. TS. ĐẶNG VŨ HOÀNG**
- 2. TS. TRẦN THỊ THANH HÀ**

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

**Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm
luận án cấp Viện**

Vào hồi ngày tháng năm 2025

Có thể tìm hiểu Luận án tại:

- Thư viện Quốc gia**
- Thư viện Viện Thú y**

PHẦN 1. MỞ ĐẦU

1.1. Tính cấp thiết

Viêm da nổi cục (VDNC) là một trong những bệnh được xác định là mối đe dọa nghiêm trọng đối với loài động vật nhai lại bao gồm trâu, bò nuôi và trâu, bò hoang. Tổ chức Thú y Thế giới (WOAH) đã liệt kê bệnh VDNC vào danh mục các bệnh bắt buộc phải công bố dịch và xác định đây là một bệnh lây truyền xuyên biên giới.

Vi rút gây bệnh VDNC (LSD) có 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 vi rút LSD 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 bệnh VDNC đã và đang lưu hành trên trâu, bò 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

chúng vi rút phân lập ở nội địa, và là nguồn tư liệu sử dụng trong công tác giảng dạy.

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

5. Những đóng góp mới của đề tài

- Đây là nghiên cứu đầu tiên có tính hệ thống về đặc điểm sinh học và sinh học phân tử của vi rút LSD đang lưu hành tại vùng Bắc Trung Bộ của Việt Nam.

- Xác định được sự thích nghi và nhân lên của vi rút trên tế bào dòng MDBK (Mardin – Darby bovine kidney)

- Đánh giá tác động vi rút LSD đến cơ thể vật chủ

- Đánh giá được tính sinh miễn dịch của vi rút LSD trên tế bào dòng MDBK và trong cơ thể vật chủ

- Đánh giá sự miễn cảm của vi rút LSD với một số chất sát trùng thông dụng.

- Xác định mối quan hệ phả hệ của một số chủng vi rút LSD lưu hành tại vùng Bắc Trung Bộ với các chủng lưu hành trên thế giới và Việt Nam dựa vào trình tự các gen p32, RPO30, GPCR.

- Đánh giá mức độ giống và khác giữa hai chủng vi rút LSD lưu hành tại vùng Bắc Trung Bộ với các vi rút lưu hành các vùng khác của Việt Nam và các chủng tham chiếu trên thế giới dựa vào trình tự toàn bộ genome của vi rút.

PHẦN 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Lịch sử và tình hình bệnh VCND

Lịch sử và tình hình bệnh trên thế giới: Bệnh VDNC lần đầu tiên được báo cáo vào năm 1929 tại phía Bắc Rhodesia, Zambia. Sự bùng phát bệnh VDNC ở châu Á được ghi nhận ở Trung Quốc vào năm

2019 tại khu vực Tân Cương và sau đó dịch bệnh đã lây lan sang phần lớn các nước châu Á. Theo WOAHA, từ tháng 7 năm 2019 cho đến nay ước tính thiệt hại do bệnh VDNC gây ra tại các nước khu vực Châu Á trên 1.5 tỷ USD.

Tình hình bệnh VDNC tại Việt Nam và vùng Bắc Trung bộ: Bệnh VCND trên trâu, bò lần đầu được phát hiện ở Việt Nam vào tháng 10 năm 2020 tại 03 huyện của 02 tỉnh Lạng Sơn và Cao Bằng, sau đó lây lan hầu hết các tỉnh thành của Việt Nam.

Tại vùng Bắc Trung Bộ, ổ dịch đầu tiên xảy ra tại huyện Quỳnh Hợp, tỉnh Nghệ An vào tháng 12/2020, sau đó tiếp tục được phát hiện tại các tỉnh khác trong vùng. Thiệt hại do bệnh VDNC gây ra khoảng 47.182 ca mắc bệnh và 9.053 tiêu hủy, chiếm tỷ lệ 30% tổng số trâu bò nhiễm và tiêu hủy của cả nước.

2.2. Các đặc điểm sinh học của vi rút LSD

Căn bệnh và cấu trúc của vi rút: Bệnh VDNC còn được gọi là bệnh Da sần, là bệnh truyền nhiễm gây ra ở trâu, bò, do một loại vi rút thuộc chi *Capripoxvirus* (CaPV), phân họ *Chordopoxvirinae* trong họ *Poxviridae*. Vi rút LSD có hình bầu dục hoặc hình viên gạch, với bộ gen bao gồm các sợi kép DNA tuyến tính, chiều dài khoảng 151 kbp và mã hóa khoảng 156 khung đọc mở (ORF).

Sự nhân lên của vi rút trên tế bào: 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. 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.

Tương tác giữa vật chủ và vi rút: 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.

Sinh bệnh học và sự ảnh hưởng của vi rút LSD lên cơ thể vật chủ: Thời gian ủ bệnh VDNC là khoảng 5 tuần trong trường hợp mắc từ

nhiên và thực nghiệm dao động từ 4 đến 7 ngày. Vi rút LSD có đặc tính dinh dưỡng mô đối với tế bào sừng, ngay sau xâm nhập 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 và vú.

2.3. Đáp ứng miễn dịch trong bệnh VDNC

Quá trình chủ yếu được thúc đẩy bởi tế bào lympho T sản xuất các cytokine quan trọng bao gồm IFN 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. Biểu hiện của IL2, GMCSF và IL6 được tăng cường ở động vật khỏe mạnh trong khi biểu hiện của INFG, IL4 và IL10 tăng lên ở động vật mắc bệnh VDNC.

2.4. Đặc điểm sinh học phân tử của vi rút LSD

Dựa vào trình tự gen GPCR, vi rút LSD thuộc nhóm subtype I trong 2 nhóm subtype I và II của gia đình nhà *Capripoxvirus*. 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 sub-cluster riêng biệt từ sub-cluster 2.1 đến 2.5. vi rút LSD tại Việt Nam tương đồng 100% với chủng vi rút LSD phân lập ở Trung Quốc năm 2019 dựa trên gen p32 và RP030, và ở Nga năm 2017 dựa trên các gen chỉ báo p32, gen RP030, thymidine kinase và ORF103.

2.5. Kiểm soát dịch bệnh

Vắc xin phòng bệnh: Có 2 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) và vắc xin bất hoạt.

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

- Cồn: 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%, có ưu điểm là bay hơi nhanh, ít độc tính và dễ sử dụng.

- 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.

- Chất oxy hóa: natri hypoclorit và hydrogen peroxide là những đại diện tiêu biểu. Natri hypoclorit 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.

- 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.

- 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.

- 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. Tuy nhiên, do độc tính cao, nguy cơ gây đột biến và ung thư, việc sử dụng cần được kiểm soát nghiêm ngặt.

PHẦN 3. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Nội dung nghiên cứu

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

- Nghiên cứu đặc tính sinh học phân tử của các chủng vi rút gây bệnh VCND đang lưu hành tại vùng Bắc Trung Bộ.

- Nghiên cứu đặc tính sinh học của chủng vi rút LSD gây bệnh VCND đang lưu hành tại vùng Bắc Trung Bộ

- Đánh giá sự miễn cảm của một số chất sát trùng thông dụng đối với chủng vi rút LSD gây bệnh VCND 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%, VirkonS 2%

3.3. Đối tượng nghiên cứu

- Vi rút LSD; trâu, bò mắc bệnh VDNC vùng Bắc Trung Bộ

3.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Bộ môn Hóa sinh - Miễn dịch, Viện Thú y; Chi cục Chăn nuôi và Thú y vùng III – Cục Chăn nuôi và Thú y; Các tỉnh Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Trị (bao gồm Quảng Trị và Quảng Bình cũ) và Thành phố Huế (Tỉnh Thừa Thiên Huế cũ).

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

3.5. Phương pháp nghiên cứu

3.5.1 Phương pháp thu thập và xử lý mẫu bệnh phẩm

3.5.2. Phương pháp tách chiết DNA

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

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

3.5.4. Giải trình tự và phân tích di truyền

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

3.5.7. Phương pháp chuẩn độ vi rút

3.5.8. Phương pháp ELISA

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

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

3.5.11. Phương pháp đánh giá hiệu quả chất sát trùng

3.5.12. Phân tích dữ liệu và thống kê

PHẦN 4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

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

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

Tỉnh	Năm lấy mẫu	Số lượng mẫu thu thập	Realtime-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

Kết quả xét nghiệm bằng real time-PCR cho thấy có 100% mẫu bệnh phẩm dương tính với vi rút LSD thu thập tại các tỉnh Bắc Trung Bộ của Việt Nam.

Bảng 4.2. Giá trị Ct (Cycle threshold) của các loại mẫu bằng phương pháp Realtime-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)

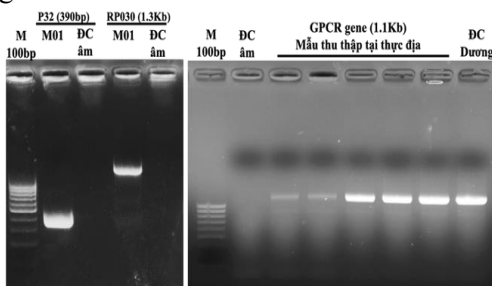
Kết quả ở Bảng 4.2 cho thấy sự khác biệt rõ rệt về giá trị Ct trung bình giữa các loại mẫu xét nghiệm. Trong đó, mẫu vảy, u cục có giá Ct trung bình thấp nhất (17.4), ngược lại, mẫu máu có Ct trung bình cao nhất (32.7). Dịch mũi, xoang miệng có Ct trung bình 25.4, nhóm

"Khác" gồm các mẫu từ phủ tạng, dịch ổ khớp có giá trị Ct là 26.7 khoảng tin cậy rất rộng (22.5–30.9).

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

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

Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 4.1) 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.



Hình 4.1. Kết quả PCR minh hoạ 03 gen chỉ báo là P32, RP030 và GPCR

Ghi chú: DC âm: Đối chứng âm; DC dương: Đối chứng dương; M01: mẫu vi rút LSD thí nghiệm; M: maker: thang chuẩn có độ dài 100bp

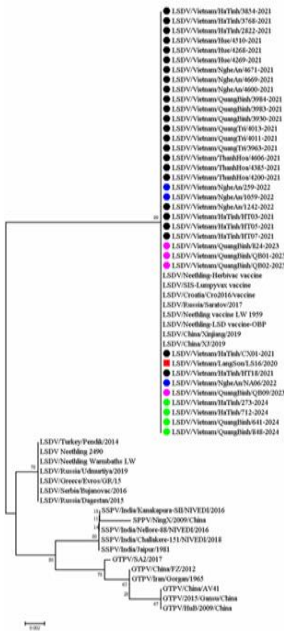
4.2.2. Xây dựng cây phả hệ các chủng vi rút LSD dựa vào trình tự các đoạn gen chỉ bảo

Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen p32 cho thấy sự tương đồng 98,1 - 100% 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% với các chủng vi rút đậu dê (GPPV). Phân tích cây phả hệ cho thấy các chủng vi rút LSD tại Việt Nam cùng nhóm với các chủng vi rút LSD ở Trung Quốc (Hình 4.2).

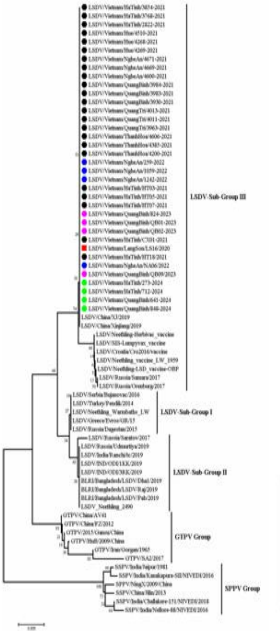
Dựa trên kết quả giải trình tự gen RPO30, vi rút gây bệnh VDNC trong nghiên cứu này được phân loại thuộc phân nhóm III và có mức độ tương đồng rất cao so với chủng tham chiếu Việt Nam (LS16) và các chủng gây bệnh VDNC đang lưu hành ở Trung Quốc (Hình 4.3).

Phân tích gen GPCR cho thấy, các chủng vi rút LSD thuộc phân nhóm tái tổ hợp (Cluster) 2.5 và cùng nhóm với các chủng vi rút ở Trung Quốc, Hồng Kông (Hình 4.3). Phân tích trình tự nucleotide và phả hệ gen RPO30, các chủng vi rút LSD thuộc phân nhóm Subgroup

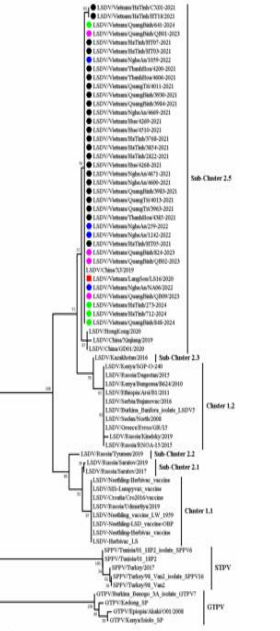
III và cùng nhóm với các chủng vi rút LSD gây bệnh ở Trung Quốc (Hình 4.4).



Hình 4.2. Cây phả hệ của các chủng vi rút LSD dựa trên trình tự đoạn gen P32 với các chủng tham chiếu



Hình 4.3. Cây phả hệ của các chủng vi rút LSD dựa trên trình tự đoạn gen RPO3 với các chủng vi rút tham chiếu



Hình 4.4. 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

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

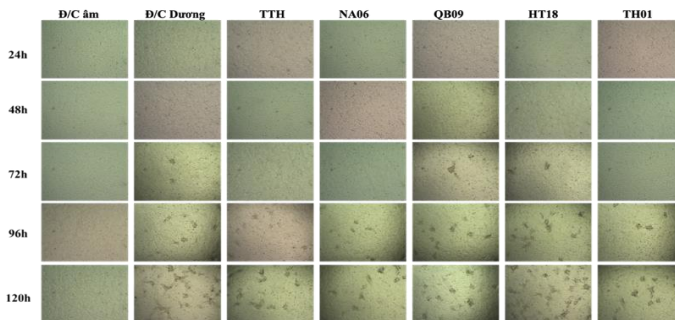
4.3.1. Kết quả phân lập vi rút LSD trên môi trường tế bào MDBK

Có 10 chủng vi rút LSD được phân lập trên môi trường tế bào dòng MDBK từ các mẫu bệnh phẩm ở 6 tỉnh (Bảng 4.3) trong vùng Bắc Trung Bộ lần lượt là Thanh Hóa (TH1, TH2), Thừa Thiên Huế (TTH), Quảng Trị (QT), Quảng Bình (QB01, QB09), Nghệ An (NA01, NA06) và Hà Tĩnh (HT02 và HT18).

Bảng 4.3. 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+

Từ hình 4.5 cho thấy rằng 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 không gây nhiễm vi rút LSD, tế bào MDBK mọc thành mảng mịn, không xuất hiện u cục.



Hình 4.5. Hình ảnh bệnh tích tế bào với độ phóng đại 10X

Ghi chú: LS16: chủng đối chứng dương; 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)

4.3.2. Kết quả chuẩn độ vi rút (TCID₅₀) LSD trên môi trường tế bào MDBK

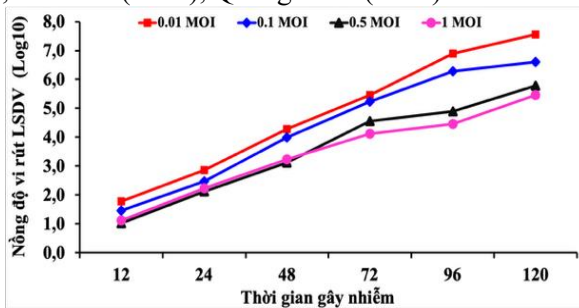
Bảng 4.4. Kết quả chuẩn độ vi rút LSD trên tế bào dòng MDBK

TT	Chủng vi rút	Số giếng có bệnh tích tế bào								Nồng độ 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

Kết quả bảng 4.4 thể hiện hiệu giá của vi rút LSD phân lập tại các tỉnh thuộc khu vực Bắc Trung Bộ, Việt Nam dao động từ 6.3-7.1 log₁₀ TCID₅₀.

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

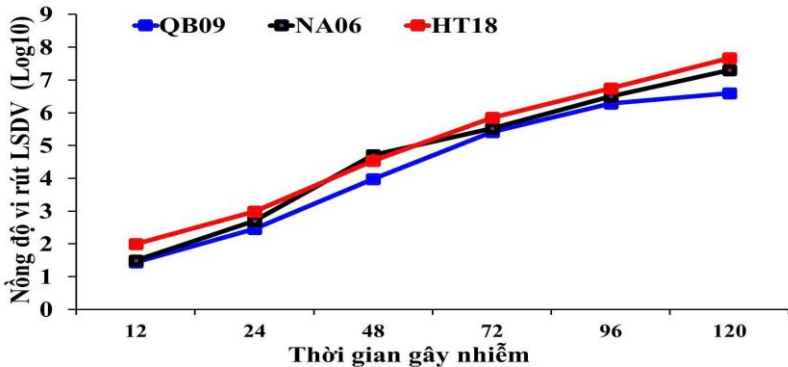
Việc lựa chọn 03 chủng vi rút này dựa trên hiệu giá vi rút và các tiêu chí khác như đại diện cho từng địa phương, theo năm như Nghệ An (2022), Hà Tĩnh (2021), Quảng Bình (2023).



Hình 4.6. Đường cong sinh trưởng của vi rút gây bệnh VDNC tại các nồng độ khác nhau chủng vi rút LSD NA06

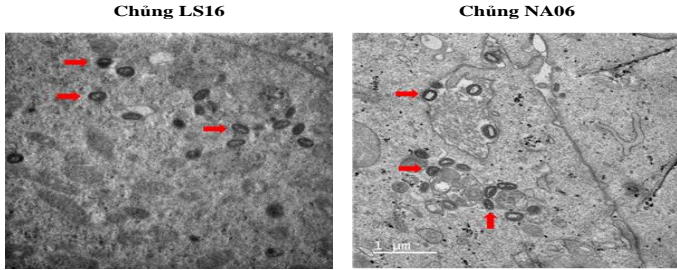
Kết quả cho thấy chủng vi rút LSD nhân lên trên tế bào MDBK và tăng nhanh đáng kể đạt tốc độ tăng trưởng $3\log_{10}$ sau 24 giờ gây nhiễm, trên $5\log_{10}$ sau 3 ngày gây nhiễm và xấp xỉ $7\log_{10}$ sau 5 ngày gây nhiễm.

Dựa trên kết quả đánh giá khả năng nhân lên của vi rút và hình ảnh bệnh tích của tế bào MDBK cho thấy ở nồng độ 0.01 MOI vi rút có khả năng sinh trưởng, nhân lên và biểu hiện bệnh tích rõ ràng nhất. Trong khi đó ở nồng độ 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.



Hình 4.7. Đường cong tăng trưởng của các chủng vi rút gây bệnh VDNC trên tế bào MDBK ở nồng độ gây nhiễm 0.01MOI

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 có kích thước lớn, hình trứng với các đầu tròn, hình dạng quả bóng len đặc trưng. Hình dạng của vi rút LSD được phân lập ở 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 4.8).

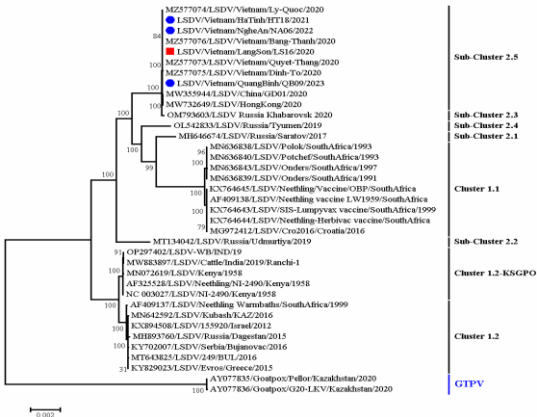


Hình 4.8. Hình ảnh của vi rút LSD qua kính hiển vi điện tử (tỷ lệ:1μm)
(Ghi chú: Chủng LS16: Chủng đối chứng dương)

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

Kết quả phân tích toàn bộ genome vi rút LSD đang lưu hành tại 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 đã được đăng tải trên ngân hàng dữ liệu GenBank thế giới với mã số đăng ký là từ PQ859562-PQ859564

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 4.9. 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

Ba 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, LSDV/China/XJ201901 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.

4.3.5. Tính ổn định di truyền của 03 chủng vi rút LSD gây bệnh VDNC qua các đời cấy chuyển trên tế bào dòng MDBK.

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 cho thấy cả ba chủng đều có độ tương đồng gen P32 đạt 100% so với nhau và so với chủng Tân Cương Trung Quốc 2019, không có sự sai khác hay thay đổi về vật chất di truyền sau 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 tại Việt Nam.

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

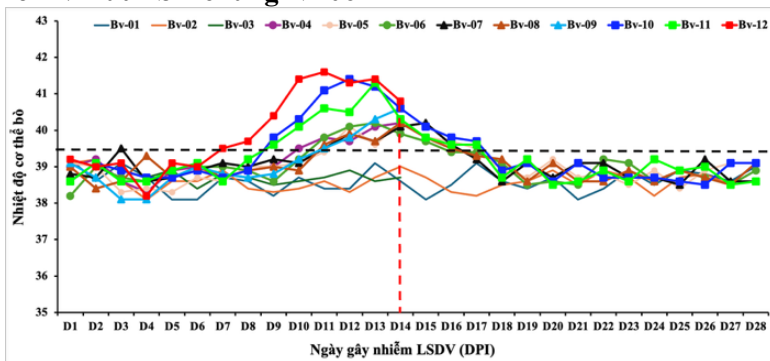
Sử dụng 2 phương pháp ELISA và realtime PCR để kiểm tra sự có mặt của kháng thể và vi rút LSD đối với các bê thí nghiệm. Kết cho thấy toàn bộ bê thí nghiệm đều cho kết quả âm tính với vi rút LSD và không phát hiện thấy kháng thể kháng vi rút gây bệnh VDNC. Sau khi tiến hành gây nhiễm, bê được lấy máu 2 ngày/lần để kiểm tra sự xuất hiện của vi rút LSD, kết quả trình bày tại bảng 4.5. cho thấy vi rút LSD đã được phát hiện trong mẫu máu của bò thí nghiệm sau khi gây nhiễm với các liều khác nhau. Cụ thể, ở lô 3, bê được gây nhiễm với liều 2×10^7 TCID₅₀/mL, vi rút được phát hiện sớm nhất vào ngày thứ 3 sau khi 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 bò trong ba lô gây nhiễm đều cho kết quả dương tính với vi rút LSD qua xét nghiệm real-time PCR.

Bảng 4.5. Kết quả kiểm tra sự xuất hiện của vi rút LSD trong máu bò thí nghiệm bằng phương pháp Real time PCR

TT	Mã	Nhóm	Liều vi rút gây nhiễm	Kết quả Realtime 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	$2 \times 10^{6,5}$	-	-	-	35,9
8	Bv-08		$2 \times 10^{6,5}$	-	-	37	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

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



Hình 4.10. Kết quả kiểm tra thân nhiệt của bê sau khi gây nhiễm vi rút LSD

Sự gia tăng thân nhiệt 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 đôi chứng duy trì thân nhiệt ổn định trong khoảng 38,3 – 39,2°C, sức khỏe bình thường.

Bảng 4.6. 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	-	-	-	++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6	Nốt sần tiến triển thành mụn nước hoặc mụn mù, có thể gây lở loét.	-	-	-	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
7	Hình thành vảy dày và dễ bong tróc trên vùng da bệnh	-	-	-	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
8	Loét niêm mạc miệng, mũi; có thể gây khó thở, ho.	-	-	-	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
9	Hạch ben, 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)

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 vi rút gây nhiễm. Ở lô thí nghiệm 3 (2×10^7 TCID₅₀/ml), toàn bộ bê thí nghiệm biểu hiện sốt với các triệu chứng nghiêm trọng, trong đó cá thể BV-12 đạt điểm lâm sàng cao nhất (13 điểm). Lô 2 ($2 \times 10^{6,5}$ TCID₅₀/ml) ghi nhận mức độ lâm sàng trung bình, với BV-08 đạt điểm tối đa là 10. Lô 1 (2×10^6 TCID₅₀/ml) biểu hiện triệu chứng nhẹ đến trung bình và phục hồi hoàn toàn sau 21 ngày sau gây nhiễm.

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

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... Biểu hiện bệnh tích của bê gây nhiễm chủng vi rút NA06 hoàn toàn giống với bệnh tích của các chủng vi rút LSD gây bệnh tại thực địa.

Bảng 4.7. 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 lưỡi, loét trợt, 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 có tổn thương

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 4.9 và bảng 4.10. Cụ thể, ở nhóm bò được gây nhiễm với liều 2×10^7 , 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 $2 \times 10^{6.5}$ và 2×10^6 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 20,3–25,3

Bảng 4.8. Kết quả xác định sự nhân lên của vi rút LSD trong mẫu máu toàn phần của bò sau gây nhiễm

TT	Mã	Lô Thí Nghiệm	Liều vi rút gây nhiễm	Kết quả Realtime 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	no Ct	
6	Bv-06		2×10^6	-	-	-	36,8	30,3	25,3	21,8	26,3	32,7	35,9	no 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	no 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 bò đã mổ khám

Kết quả bảng 4.10 cho thấy đã xuất hiện vi rút sau 5 ngày gây nhiễm khi kiểm tra dịch ngoáy mũi, miệng của bò ở lô 3, lô 2 lần lượt với nồng độ 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.

Bảng 4.9. Kết quả xác định sự có mặt vi rút LSD trong mẫu dịch hầu họng, mũi của bò sau gây nhiễm

TT	Mã	Lô Thí Nghiệm	Liều vi rút gây nhiễm rút	Kết quả Realtime 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	$2 \times 10^{6,5}$	-	-	-	36,2	33,2	28,6	27,1	32	35,8	-	-	

TT	Mã	Lô Thí Nghiệm	Liều vi rút gây nhiễm rút	Kết quả Realtime PCR (giá trị Ct)											
				D1	D3	D5	D7	D10	D12	D14	D16	D18	D21	D28	
		nhiễm 02										3			
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 bộ đã mở khám

Sau 28 ngày gây nhiễm, tải lượng vi rút ở các cơ quản phủ tạng gần như không có ở tất cả các lô thí nghiệm (Ct >39).

4.3.7. Bước đầu đánh giá tính sinh miễn dịch của các chủng vi rút gây bệnh VDNC phân lập tại thực địa bằng phương pháp trung hòa vi rút

Kết quả phân tích hiệu giá kháng thể kháng vi rút LSD được trình bày trong bảng 4.11.

Bảng 4.10. Bảng kết quả VNT đánh giá khả năng sản sinh kháng thể của bò sau tiêm vi rút LSD bất hoạt

TT	Code	Lô thí nghiệm	Liều 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	2	16	32	64	128	128	256	256
14	B-14		xuất hướng	4	16	64	128	256	256	512	512
15	B-15		dẫn	0	16	64	64	128	256	256	512

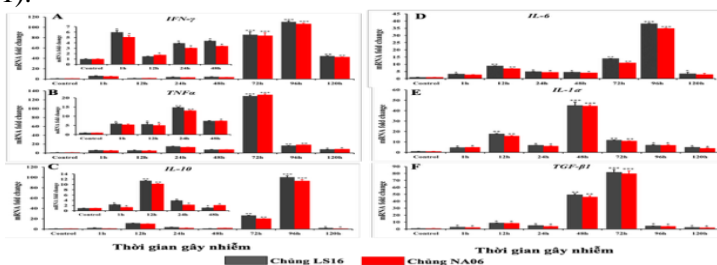
Ghi chú: D (ngày); Chỉ số VNT ≥ 32 được coi là dương tính

Kết quả chỉ ra rằng lô 2 (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 (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. Nhóm 3 (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 với mức 1/256–1/512 ở D42–D49. 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 lô 4.

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

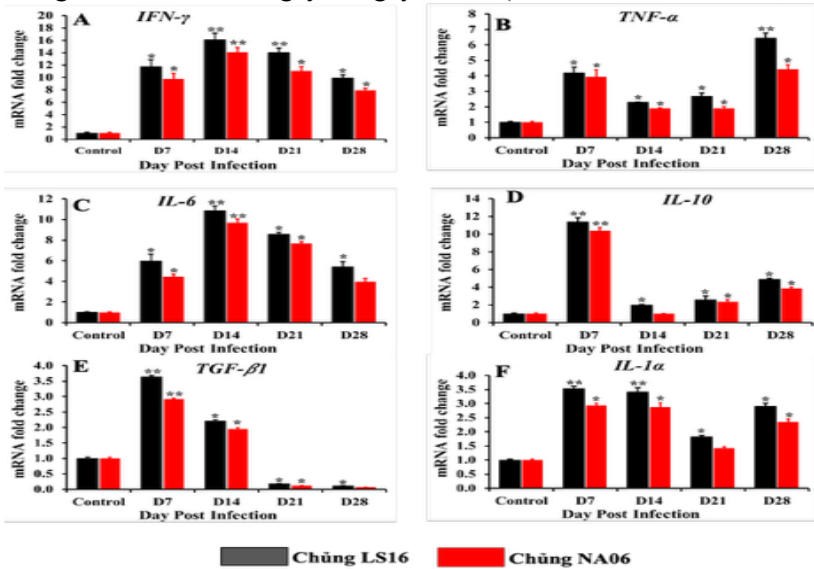
Trong giai đoạn đầu, nồng độ của các cytokine được kiểm tra đã tăng đáng kể vào lúc 6 giờ ($p < 0,05$) và trong giai đoạn sau, nồng độ cao nhất của các cytokine được ghi nhận trong khoảng từ 72 đến 96 giờ sau gây nhiễm khi so sánh với đối chứng, ngoại trừ cytokine IL1 α (Hình 4.12). Nồng độ IFN γ từ 1 đến 6 giờ sau gây nhiễm (từ 5,2 đến 11,5 lần). 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 4.11. Sự điều chỉnh đáp ứng Cytokine trên tế bào MDBK sau gây nhiễm vi rút LSD (LS16: chủng đối chứng dương)

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

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 $TNF\alpha$, 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 4.12 A, B, D và F).



Hình 4.12. Sự điều chỉnh đáp ứng Cytokine trong máu của bò sau gây nhiễm vi rút gây bệnh VDNC chủng thực địa.

Mức độ đáp ứng sản sinh $TNF\alpha$, IL-1 α và IL-10 trong máu gia súc liên tục được tăng lên đến ngày thứ 28 sau gây nhiễm (Hình 4.13). 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 $TNF\alpha$ và IL-1 α cao nhất được ghi nhận tại thời điểm 28 ngày sau gây nhiễm ($p < 0,05$).

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

Bảng 4.11. Kết quả chuẩn độ vi rút LSD sau khi xử lý bằng một số chất sát trùng theo khuyến cáo của WOAH bằng phương pháp TCID₅₀/ml

Chất sát trùng	Thời gian	Giá trị trung bình của TCID ₅₀ /ml	Thời gian	Giá trị trung bình của TCID ₅₀ /ml	Thời gian	Giá trị trung bình của TCID ₅₀ /ml
Đối chứng dương	30 phút	10 ^{5.9}	60 phút	10 ^{5.9}	180 phút	10 ^{5.9}
Sodium dodecyl sulfate 0.8%	30 phút	10 ^{2.6}	60 phút	0	180 phút	0
Iodine 3%	30 phút	10 ^{2.8}	60 phút	0	180 phút	0
Formandehyde 1%	30 phút	10 ^{2.5}	60 phút	0	180 phút	0
Chloroform 5%	30 phút	10 ^{2.6}	60 phút	0	180 phút	0
Ether 20%	30 phút	10 ^{1.6}	60 phút	0	180 phút	0
Phenol 2%	30 phút	10 ^{2.5}	60 phút	0	180 phút	0
NaOH 3%	30 phút	10 ^{2.6}	60 phút	0	180 phút	0
Amonium 0.5%	30 phút	10 ^{1.6}	60 phút	0	180 phút	0
Virkon S 2%	30 phút	10 ^{2.5}	60 phút	0	180 phút	0
Đối chứng âm	30 phút	0	60 phút	0	180 phút	0

Theo kết quả ở bảng 4.12 các mẫu nhiễm vi rút được xử lý bằng 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%, đều cho thấy khả năng 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.

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 WAOH. Trong đó, mẫu vẩy 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 ($IFN\gamma$, 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 WOA. 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

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 CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Trần Anh Tuấn, Đinh Văn Tài, Đặng Văn Hiệp, Phan Lanh, Nguyễn Thị Huyền, Chu Thị Như, Nguyễn Thanh Thùy, Trương Anh Đức, Trần Thị Thanh Hà, Đặng Vũ Hoàng. ***Ứng dụng các phương pháp chẩn đoán phát hiện virus gây bệnh VCND từ mẫu bệnh phẩm thực địa.*** Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y, Số 5-2023, Trang 5-14

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. Tran AT, Tran HTT, Truong AD, Dinh VT, Dang AK, Chu NT, Phan L, Phan HT, Nguyen HT, To NBT, Dang HV. ***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.