

# GIẢI ĐỊNH VÀ PHÂN TÍCH PHẢ HỆ VIRUS VIÊM GAN VỊT A CƯỜNG ĐỘ CHUNG NT (GENOTYPE 3) PHÂN LẬP NĂM 2013 TẠI VIỆT NAM

*Đoàn Thị Thanh Hương<sup>1</sup>, Đỗ Thị Roan<sup>1</sup>, Lê Thị Kim Xuyên<sup>1</sup>,  
Hoàng Thị Minh Châu<sup>1</sup>, Đỗ Văn Khiên<sup>2</sup>, Lê Thanh Hòa<sup>1</sup>*

## TÓM TẮT

Từ các mẫu bệnh phẩm thu thập được từ đàn vịt mắc bệnh viêm gan vịt tại tỉnh Ninh Thuận năm 2013, một chủng virus đã phân lập được và kí hiệu là chủng NT. Toàn bộ mật mã và phân tích chuỗi gen của 2271 nucleotide của tổ hợp gen P2 của chủng NT bao gồm 4 phân đoạn polyprotein 2A1, 2A2, 2B và 2C đã được xác định. Tổ hợp gen P2 của virus viêm gan vịt chủng NT có tỷ lệ tương đồng về nucleotide là 93-98% so với các chủng của DHAV-3, 80% so với các chủng của DHAV-2 và 74-77% so với các chủng của DHAV-1, đặc biệt có mức độ tương đồng đến 98% so với chủng B-N của Trung Quốc (GenBank: JX235698) nhưng chỉ có mức tương đồng là 93% so với chủng DN2 đã phân lập được tại tỉnh Đồng Nai năm 2009. So với chủng vaccin VXXT (thuộc DHAV-1) đang sử dụng tại Việt Nam, tỷ lệ tương đồng của chủng NT chỉ đạt 74% (nucleotide) và 83% (về amino acid). Điều này cảnh báo có sự khác biệt về tương quan kháng nguyên-miễn dịch trong quần thể virus viêm gan vịt ở Việt Nam. Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc cũng khẳng định virus viêm gan vịt, chủng NT của Việt Nam thuộc về genotype 3, cùng với các chủng virus viêm gan vịt của Hàn Quốc và Trung Quốc, đặc biệt có quan hệ gần gũi nhất với chủng B-N của Trung Quốc.

*Từ khóa:* Virus viêm gan vịt, Cường độ, Tỷ lệ tương đồng, Genotype, Phả hệ.

## Identification and phylogenetic analysis of the strain NT of duck hepatitis virus A (genotype 3) isolated in Viet Nam in 2013

*Doan Thi Thanh Huong, Do Thi Roan, Le Thi Kim Xuyen,  
Hoang Thi Minh Chau, Do Van Khiem, Le Thanh Hoa*

## SUMMARY

From the samples collecting from the duck hepatitis virus infected the ducklings in Ninh Thuan province in 2013, a virus strain was isolated and signed as the strain NT. The entire of code and gene sequence analysis of 2271 nucleotides of the gene section P2 consisting of 4 polyproteins, such as: 2A1, 2A2, 2B and 2C was identified. The gene section P2 of the duck hepatitis virus, the strain NT having the similar rate of nucleotide was 93 - 98 % compared to the strains of DHAV-3, 80% compared to the strains of DHAV-2 and 74-77 % compared to the strains of DHAV-1, particularly up to 98% compared to the Chinese strain B-N (GenBank: JX235698) but only 93% compared to the Vietnamese strain DN2 isolated previously in Dong Nai province in 2009 (GenBank: JF914944). In comparison with the vaccine strain VXXT (DHAV-1 genotype) currently used in Viet Nam, the similar rate of the strain NT was only 74% (nucleotide) and 83% (amino acid). It is warned that there is a difference in the antigen - immunity compatibility of the hepatitis virus genotypes A in the duck population in Viet Nam. Results derived from the phylogenetic analysis also confirmed that the strain NT of duck hepatitis virus A in Viet Nam belongs to genotype 3, along with those strains of South Korea and China, especially the strain NT has the closest genetic relationships with the Chinese strain B-N.

*Key words:* Duck hepatitis virus, Virulence, Similar rate, Genotype, Phylogenetic.

<sup>1</sup> Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup> Phân viện thú y miền Trung

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh viêm gan vịt (Duck Hepatitis) được phát hiện lần đầu tiên năm 1945 tại Mỹ, từ đó đến nay, virus viêm gan vịt vẫn tồn tại và gây thiệt hại nặng nề cho ngành chăn nuôi vịt ở nhiều nước trên thế giới cũng như tại Việt Nam. Đặc trưng của bệnh là vịt chết rất nhanh với tỷ lệ chết rất cao (Woolcock, 2003; Nguyễn Văn Cẩm *et al.*, 2001).

Virus viêm gan vịt thuộc họ *Picornaviridae*, có cấu trúc hệ gen là RNA sợi đơn dương, gồm 7600 đến 7700 nucleotide, chứa duy nhất một khung đọc mở gồm 3 tổ hợp gen P1, P2, P3 và hai vùng không mã hóa 5'UTR và 3'UTR. Trong chuỗi polypeptide của virus viêm gan vịt, phần protein đầu tiên là protein dẫn (kí hiệu là L), tiếp theo là 4 loại protein cấu trúc bao gồm VP4, VP2, VP3 và VP1; cuối cùng là 7 protein không cấu trúc là 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C và 3D. Trên thế giới, từ năm 2007 trở lại đây, nhiều nghiên cứu sâu sắc về gen và hệ gen đã cho thấy sự biến đổi mạnh mẽ và đa dạng trong hệ gen của quần thể virus viêm gan vịt (Tseng, Tsai, 2007; Ding, Zhang, 2007; Liu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Theo đó, virus viêm gan vịt được đặt tên là Duck Hepatitis A Virus, bao gồm 3 genotype: DHAV-1, DHAV-2 và DHAV-3 (OIE, 2010), trong đó phổ biến nhất là DHAV-1; DHAV-3 được công bố chủ yếu tại Hàn Quốc và Trung Quốc; DHAV-2 mới chỉ được phát hiện duy nhất tại Đài Loan (Tseng, Tsai, 2007). Một số nghiên cứu mới đây còn chỉ ra hiện tượng lai trộn trong hệ gen giữa genotype 1 và genotype 3 ở một số chủng virus viêm gan vịt tại Trung Quốc (Chen *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2012). Tại Việt Nam, virus viêm gan vịt thuộc genotype 1 và genotype 3 lần đầu tiên được giải mã hệ gen năm 2011 (Đoàn Thị Thanh Hương *et al.*, 2011). Giữa các genotype của virus viêm gan vịt có sự khác biệt hoàn toàn về huyết thanh học cũng như về tính kháng nguyên (Wang *et al.*, 2008). Cho đến nay, trên thế giới cũng như tại Việt Nam, hầu hết các vaccine được sử dụng là thuộc genotype 1. Tuy nhiên, với những hiểu biết mới về sinh học phân tử hệ gen virus viêm gan vịt, một số nước đã

bắt đầu sản xuất thêm loại vaccine mới có nguồn gốc từ genotype 3 để phòng chống bệnh (Kim *et al.*, 2009).

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả giám định phân tử chủng virus viêm gan vịt phân lập năm 2013 tại tỉnh Ninh Thuận bằng chỉ thị gen P2 (tổ hợp gen 2A1, 2A2, 2B và 2C), sử dụng phương pháp so sánh đối chiếu và xây dựng mối liên quan phả hệ với các chủng viêm gan vịt đã được đăng kí trên Ngân hàng gen. Mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định nguồn gốc của chủng virus viêm gan vịt (trong đó có NT) hiện đang gây bệnh tại Việt Nam.

## II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Mẫu bệnh phẩm nghiên cứu

Mẫu bệnh phẩm viêm gan vịt phân lập ở vịt mắc bệnh tại tỉnh Ninh Thuận năm 2013 và được tiếp truyền qua phôi trứng vịt 11 ngày tuổi. Nước trứng vịt chứa virus được sử dụng để tách chiết RNA tổng số.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### *Tách chiết RNA tổng số*

RNA tổng số bao gồm cả RNA hệ gen của virus được tách chiết bằng bộ sinh phẩm RNeasy Mini Kit (Qiagen) từ mẫu bệnh phẩm theo hướng dẫn của nhà sản xuất, được kí hiệu là NT và bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$  cho đến khi sử dụng.

#### *Chuyển đổi cDNA*

DNA bổ sung (cDNA) được tổng hợp theo phương pháp chuyển đổi từ RNA hệ gen của virus bằng môi xác suất (hexamer primers), sử dụng bộ kit chuyển đổi của hãng Fermentas, theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thành phần phản ứng với tổng dung tích 20  $\mu\text{l}$  gồm có: 2  $\mu\text{l}$  (100 ng/ $\mu\text{l}$ ) RNA tổng số; 1  $\mu\text{l}$  (100 picomol/ $\mu\text{l}$ ) môi hexamer; 1  $\mu\text{l}$  dNTP (10 mM); 8.5  $\mu\text{l}$  nước khử ion DEPC; 4  $\mu\text{l}$  đệm 5X buffer; 1  $\mu\text{l}$  Maxima<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (20  $\mu\text{U}/\mu\text{l}$ ) và 0.5  $\mu\text{l}$  RiboLock<sup>TM</sup> RNase Inhibitor (20  $\mu\text{U}/\mu\text{l}$ ).

Phản ứng chuyển đổi được thực hiện: 50°C/60 phút và 85°C/5 phút. Sản phẩm cDNA được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng để thực hiện phản ứng PCR.

#### *Giám định mẫu nghiên cứu bằng chỉ thị phân tử gen VP1*

Trước tiên, để xác định genotype của mẫu virus nghiên cứu, chúng tôi đã kiểm tra bằng cách thực hiện các phản ứng PCR với ba cặp mồi đặc hiệu của ba genotype 1, 2 và 3. Để thu nhận gen VP1 của các chủng virus viêm gan vịt thuộc: Genotype 1 (DHAV-1) bằng cặp mồi DH3F/DH3R ; ii) Genotype 2 (DHAV-2) bằng cặp mồi DHAV2F/DHAV2R; iii) Genotype 3 (DHAV-3) bằng cặp mồi DHAV3F/DHAV3R. Kết quả thu được cho biết mẫu NT trong nghiên cứu này được xác định thuộc genotype 3.

#### *Thiết kế mồi, thực hiện PCR thu nhận tổ hợp gen P2*

Để thu được toàn bộ tổ hợp gen P2 của mẫu virus nghiên cứu, hai cặp mồi được thiết kế dựa trên so sánh trình tự tương đồng chuỗi nucleotide của tất cả các chủng DHAV-3 hiện có trên Ngân hàng gen.

- Cặp mồi thứ nhất dùng để khuếch đại đoạn gen kí hiệu D2, có độ dài khoảng 1.74 kb:

Mồi xuôi DK2F:

5'- GTGGGTGATTTTCAGTGGGC -3'

Mồi ngược DK2R:

5'- AACCAACCTCGGTAAGTGAGCAGC -3'

- Cặp mồi thứ hai dùng để khuếch đại đoạn gen kí hiệu Đ3, có độ dài khoảng 1.7 kb:

Mồi xuôi DK3F

5'- TGGAATCACTTGTTCTGTGCC -3'

Mồi ngược DK3R:

5'- AGACTGCCATCCCTCATTGC -3'

Hai cặp mồi trên được thiết kế để các đoạn DNA có trình tự lồng vào nhau khoảng 100 nucleotide ở các đầu 5' và 3'. Từ đó có thể thu

nhận được toàn bộ tổ hợp gen P2 (D2-D3, giữa mồi DK2F và DK3R), có độ dài 2271 nucleotide.

Phản ứng PCR được thực hiện với dung tích là 50 µl, sử dụng kit AccuTaqPCR premix (96 giếng) (Bioneer, Hàn Quốc), bổ sung 2 µl (10 pmol/µl) mỗi loại mồi, 2 µl khuôn cDNA (50 ng/µl), 1 µl DMSO (dimethyl sulfoxide), thêm 43 µl nước khử ion DEPC để đạt dung tích 50 µl.

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy MJ PTC-100 (USA): 1 chu kỳ ở 94°C/5 phút, 35 chu kỳ [94°C/1 phút, 55°C/30 giây; 68°C/6 phút], chu kỳ cuối ở 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên thạch agarose 1%, nhuộm Ethidium Bromide và quan sát trên máy soi gel dưới ánh sáng tia cực tím (Wealtech, Mỹ)

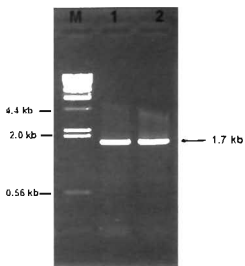
#### *Phân tích xử lý số liệu*

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit Accuprep Gel Purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc) và gửi đi giải trình tự trực tiếp (Macrogen, Hàn Quốc). Chuỗi nucleotide được xử lý bằng chương trình Seqed1.3, so sánh bằng chương trình AssemblyLIGN1.9 và MacVector8.2 (Accelrys Inc.) trên máy tính Macintosh. Các trình tự tương ứng với tổ hợp gen P2 của virus viêm gan vịt đăng ký tại Ngân hàng gen, được sử dụng để so sánh đối chiếu với chuỗi gen nghiên cứu, sử dụng chương trình GENEDOC2.7 (<http://www.nrbcs.org/gfx/genedoc/>). Phân tích phá hệ bằng chương trình MEGA5.2 với hệ số tin cậy 1000 bootstrap (Tamura et al., 2011)

### **III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

#### **3.1. Thu nhận tổ hợp gen P2 của mẫu nghiên cứu**

Sử dụng hai cặp mồi DK2F-DK2R và DK3F-DK3R, chúng tôi đã thu được hai sản phẩm PCR có kích thước lần lượt là: D1~1,74 kb, D2~1,7 kb (Hình 1) Sản phẩm PCR thu được là một băng đơn nhất, có chất lượng tốt và được tinh sạch để giải trình tự trực tiếp



**Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR hai phân đoạn gen D1 và D2 của hệ gen virus viêm gan vịt cường độc chủng NT**

*Ghi chú: A: giếng M: thang DNA chuẩn (DNA của thực khuẩn thể λ được cắt bằng enzyme HindIII); giếng 1: cặp mồi DK2F-DK2R nhân đoạn gen dài 1,74kb; giếng 2: cặp mồi DK3F-DK3R nhân đoạn gen dài 1,7 kb*

Từ kết quả giai trình trình tự, chúng tôi đã thu được toàn bộ hai đoạn gen D2 và D3 với độ dài đúng như dự kiến ban đầu. Sau khi phân tích và ghép hai chuỗi nucleotide của hai đoạn gen, chúng tôi đã thu được hoàn chỉnh tổ hợp gen P2 gồm 2271 nucleotide, mã hóa cho 753 amino acid.

### 3.2. So sánh thành phần nucleotide tổ hợp gen P2 giữa các chủng virus viêm gan vịt

Trật tự sắp xếp các gen trong tổ hợp gen P2 của chủng virus NT tuân theo đúng trật tự sắp xếp chung của virus viêm gan vịt cũng như các virus khác trong họ *Picornaviridae*, bao gồm các gen 2A1, 2A2, 2B và 2C. Kích thước của mỗi gen trong tổ hợp gen P2 như sau: gen 2A1 có kích thước 60 nucleotide, mã hóa cho 20 amino acid, gen 2A2 có kích thước 855 nucleotide, mã hóa cho 285 amino acid; gen 2B có kích thước 357 nucleotide, mã hóa cho 119 amino acid; và gen 2C có kích thước 999 nucleotide, mã hóa cho 333 amino acid. Không có hiện tượng đột biến dẫn đến làm thay đổi số lượng nucleotide trong mỗi gen

Toàn bộ chuỗi nucleotide (2271 bp) của tổ hợp gen P2 của virus viêm gan vịt chủng NT được truy cập vào Ngân hàng gen sử dụng chương trình BLAST. Kết quả cho thấy, chủng NT thuộc về genotype 3, với hệ số tương đồng đạt từ 93 -98% với các chủng DHAV-3 hiện có trong Ngân hàng gen. Điều đáng chú ý là chủng NT mới phân lập tại Việt Nam có tỷ lệ đồng nhất về nucleotide thấp (93%) với chủng DN2 đã phân lập tại Đồng Nai năm 2009 (Đoàn Thị Thanh Hương và cs, 2011); trong khi có tỷ lệ đồng nhất cao (98%) với chủng B-N của Trung Quốc (GenBank: JX235698), công bố năm 2013. Bằng chương trình GENEDOC2.7, chúng tôi đã xác định được tỷ lệ đồng nhất về nucleotide giữa chủng NT Việt Nam với các chủng viêm gan vịt thuộc genotype 1 là từ 74 -77%; với hai chủng 04G và 90D thuộc genotype 2 là 80%. So sánh với chủng vaccine VXXT đang sử dụng tại Việt Nam, chủng NT có tỷ lệ đồng nhất về nucleotide là 74% và tỷ lệ tương đồng về amino acid là 83%. Sự sai khác lớn này là nguyên nhân dẫn đến sự sai khác về kháng nguyên và miễn dịch, làm chệch khả năng bảo hộ của chủng vaccine VXXT đối với các chủng virus cường độc đương nhiên thuộc genotype 3 như NT bị hạn chế.

Tại Việt Nam, virus viêm gan vịt DHAV-1 được phát hiện từ năm 1983, và được ghi nhận từ đó đến nay. Tuy nhiên, trên thực tế, các chủng virus được phân lập tại các ổ dịch gần đây, qua phân tích sinh học phân tử hệ gen virus đã cho thấy phần lớn thuộc về genotype 3, đặc biệt là tại các ổ dịch ở miền Nam Việt Nam (Đoàn Thị Thanh Hương *et al.*, 2010, 2011). Chính vì vậy, việc phát hiện và giám định phân tử các chủng virus viêm gan vịt thuộc genotype 1 đang gây bệnh tại Việt Nam là điều cần thiết. Ngoài ra, với việc phát hiện thêm các chủng virus viêm gan vịt DHAV-3 đang lưu hành tại Việt Nam, thì việc sản xuất vaccine genotype 3 là điều cấp thiết hiện nay. Trên thế giới, nhiều nước đã tiến hành sản xuất vaccine DHAV-3 phòng bệnh viêm gan vịt (Kim *et al.*, 2009).

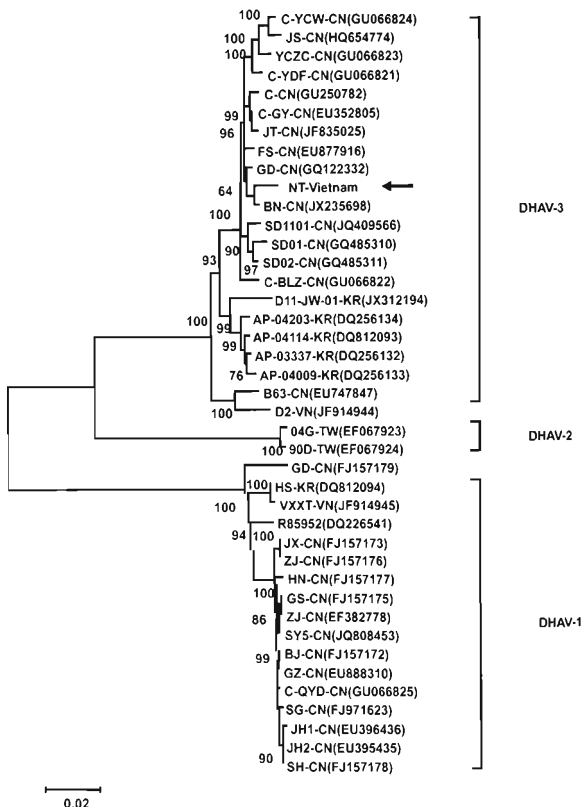
### 3.3. Phân tích mối quan hệ nguồn gốc phả hệ

Chuỗi gen P2 (227) nucleotide của virus viêm gan vịt chủng NT được so sánh với các chủng virus viêm gan vịt của Việt Nam và thế giới bằng chương trình MEGA5.2 (Hình 2). Kết quả phân tích phả hệ trình bày ở Hình 2 cho thấy, các chủng thuộc về 3 genotype tập hợp riêng biệt thành 3 nhóm chính. Trong đó, các chủng viêm gan vịt thuộc genotype 1 có nguồn gốc từ nhiều nước bao gồm: Mỹ, Anh, Trung Quốc, Hàn Quốc, Đài Loan và chủng vaccine đang sử dụng tại Việt Nam. Virus viêm gan vịt genotype 2 chỉ bao gồm duy nhất hai chủng của Đài Loan. Còn lại, các chủng viêm gan vịt thuộc genotype 3 bao gồm các chủng của Hàn Quốc, Trung Quốc và Việt Nam. Trong nhóm genotype 3, các chủng virus viêm gan vịt

lại chia thành 5 phân nhóm, trong đó chủng NT của Việt Nam nằm trong cùng một nhóm riêng với chủng B-N (GenBank: JX235698) của Trung Quốc; và thuộc một nhóm tách biệt đối với chủng DN2 đã phân lập tại Việt Nam năm 2009. Theo công bố của Wei *et al.* (2012), virus viêm gan vịt chủng B-N có hiện tượng lai trộn giữa genotype 1 và 3. Trong nghiên cứu này, bằng chỉ thị gen P2 cho thấy chủng NT của Việt Nam có mối quan hệ rất gần gũi với chủng B-N của Trung Quốc. Chính vì vậy, việc giải mã và phân tích toàn bộ hệ gen hoàn chỉnh của chủng NT (thêm các tổ hợp gen P1 và P3) là điều cần thiết ở các nghiên cứu tiếp theo để làm sáng tỏ vấn đề trên.

## IV. KẾT LUẬN

Mẫu virus viêm gan vịt NT phân lập tại Ninh Thuận của Việt Nam năm 2013, được xác định thuộc genotype 3 bằng phân tích chỉ thị di truyền tổ hợp gen P2. Chủng NT của Việt Nam có tỷ lệ đồng nhất cao về nucleotide với chủng B-N của Trung Quốc và có tỷ lệ đồng nhất thấp với chủng DN2 phân lập tại Đồng Nai của Việt Nam năm 2009. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy có sự tồn tại của các chủng virus viêm gan vịt genotype 3 tại Việt Nam cho đến nay. Hơn thế nữa, giữa các chủng virus DHAV-3 gây bệnh tại Việt Nam lại có sự biến đổi mạnh mẽ trong hệ gen, làm phức tạp hơn cho công tác sản xuất và sử dụng vaccine phòng bệnh. Giữa các chủng virus genotype 3 có sự sai khác lớn về nucleotide và amino acid với các chủng virus vaccine genotype 1 đang sử dụng hiện nay



Hình 2. Mối quan hệ phân hệ của chủng cường độc viêm gan vịt NT của Việt Nam và thế giới trên cơ sở phân tích toàn bộ tổ hợp gen P2 (2271 nucleotide), bằng chương trình MEGA5.2 (phương pháp kết nối liền kề NJ, Neighbour-joining, sử dụng độ tin cậy 100% bootstrap). Mũi tên là chỉ chủng NT phân lập năm 2013 của Việt Nam sử dụng trong nghiên cứu

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen LL, Xu Q, Zhang RH, Yang L, Li JX, Xie ZJ, Zhu YL, Jiang SJ, Si XK (2013). Improved duplex RT-PCR assay for differential diagnosis of mixed infection of duck hepatitis A virus type 1 and type 3 in ducklings. *Journal of Virological Methods* 192:12-17.
2. Ding C, Zhang D (2007). Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1. *Virol* 361: 9-17.
3. Đoàn Thị Thanh Hương, Nguyễn Bá Hiên, Trần Xuân Hạnh, Lê Thanh Hòa (2010). Phát hiện lần đầu tiên genotype III (DHAV-3) virus gây bệnh viêm gan vịt tại Việt Nam bằng phương pháp giám định phân tử. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 8(2): 145-152.
4. Đoàn Thị Thanh Hương, Nguyễn Bá Hiên, Trần Xuân Hạnh, Lê Thanh Hòa (2011). Giải mã toàn bộ hệ gen và phân tích xác định vị trí phân loại của chủng virus viêm gan vịt cường độc DN2 thuộc genotype III (DHAV-3) lần đầu tiên phát hiện tại Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 9(1): 37-45.
5. Kim MC, Kim MJ, Kwon YK, Lindberg AM, Joh SJ, Kwon HM, Lee YJ, Kwon JH (2009). Development of duck hepatitis A virus type 3 vaccine and its use to protect ducklings against infections. *Vaccine* 27 6688 -6694.
6. Liu G, Wang F, Ni Z, Yun T, Yu B, Huang J, Chen J (2008). Genetic diversity of the VP1 gene of duck hepatitis virus type I (DHV-1) isolates from southeast China is related to isolate attenuation. *Virus Res* 137: 137-141.
7. Nguyễn Văn Cẩm, Nguyễn Thị Thu Hà, Nguyễn Khánh Ly (2001). Nghiên cứu biến đổi bệnh lý bệnh viêm gan virus vịt. *Tạp chí Khoa học và kỹ thuật thú y* 4: 48-51
8. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
9. Tseng CH, Knowles NJ, Tsai HJ (2007). Molecular analysis of duck hepatitis virus type I indicates that it should be assigned to a new genus. *Virus Res* 123: 190-203.
10. OIE Terrestrial Manual 2010. Duck Virus Hepatitis Chapter 2.3.8.
11. Wang L, Pan M, Fu Y, Zhang D (2008). Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis. *Virus Genes* 37: 52-59.
12. Wei CY, Su S, Huang Z, Zhu WJ, Chen JD, Zhao FR, Wang YJ, Xie JX, Wang H, Zhang G (2012) Complete genome sequence of a novel duck hepatitis A virus discovered in Southern China. *Journal of Virology* 86:10247.

Nhận ngày: 9.12.2013

Phan biện: 20.3.2014