

GIÁM SÁT PHÂN TỬ VÀ NGUYÊN NHÂN DIỄN BIẾN PHỨC TẠP CỦA DỊCH LỞ MỒM LONG MÓNG

*Tạ Hoàng Long¹, Nguyễn Văn Hưng², Trịnh Quang Đại³,
Trương Anh Đức³, Nguyễn Thị Hồng Thắm¹ và Nguyễn Việt Không³*

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định typ tại 16 ổ dịch và subtype của 4 chủng đại diện, hồi cứu kết quả định typ ở 49 ổ dịch khác để tìm hiểu nguyên nhân diễn biến phức tạp của dịch LMLM tại một khu vực (Duyên hải miền Trung). Trong thời gian từ 2003 đến 2010, diễn biến dịch tại khu vực này không theo quy luật kinh điển 2-3 năm một lần mà xảy ra hàng năm với tần xuất 0,78 ổ dịch/tỉnh/năm. Diễn biến dịch ngày càng phức tạp do ba nguyên nhân chính (i) do sự xuất hiện của typ và subtype mới: typ A xâm nhập 2 lần độc lập, 2 subtype Asia 1 cũng xuất hiện vào 2 thời điểm khác nhau, (ii) các typ/subtyp mới xâm nhập có khuynh hướng ngày càng lan rộng (sau 8 năm, typ A đã lan ra 10 tỉnh và sau 6 năm typ Asia 1 đã có mặt ở 4 tỉnh) gây ra hiện tượng đa nhiễm trong cùng một ổ dịch và (iii) tại một tỉnh/địa phương có sự lưu hành đồng thời của nhiều typ virut. Các typ/subtyp mới xuất hiện đều có quan hệ họ hàng gần gũi với các typ lưu hành tại các nước lân cận. Những thông tin này đánh dấu một bước phát triển phức tạp mới của dịch LMLM, và sự cần thiết sử dụng vacxin LMLM đa giá có khả năng bảo hộ đối với các typ/subtyp virut LMLM phát hiện trong nghiên cứu này. Việc giám sát dịch tễ học phân tử của bệnh LMLM, xác định typ/subtyp lưu hành và phát hiện typ/subtyp mới cần được ưu tiên hàng đầu để nâng cao hiệu quả sử dụng vacxin.

Từ khóa: Lở mồm long móng, VP1, Giám sát phân tử, Phả hệ,

Molecular surveillance and the roots of complex situation of FMD

*Tạ Hoàng Long, Nguyễn Văn Hưng, Trịnh Quang Đại,
Trương Anh Đức, Nguyễn Thị Hồng Thắm, Nguyễn Việt Không*

Summary

In this study, we have retrospectively recovered the serotypes of FMDV in 49 outbreaks, newly determined the serotypes in 16 outbreaks and the subtypes of 4 representative isolates to gain insight into the causes of complicated FMD situation at an epidemiological region (Vietnam's Central Coast area). During the period 2003-2010, the FMD occurrence at CACV was no longer following the typical paradigm of outbreak is periodically re-emerge in 2-3 years, but occurred every year with the incidence of 0.78 outbreak/province/year. The root includes 3 major elements: (i) the introduction of new type and subtype: type A with twice independently emerged, 2 subtype Asia 1 was introduced at 2 different times, (ii) newly introduced type/subtypes have tendency to spread over (after 8 year, type A has spread over 10 provinces and after 6 year, type Asia 1 has covered 4 provinces), resulted in the mix infections within an outbreak (iii) at a local area/province, different type co-circulated. The newly emerged strains are closely related to those that are circulating in the neighbour countries. These facts indicate a new stage of intricate progress in FMD situation, where one should use multivalent vaccine of sufficient efficacy to protect at least the strains with different type and subtype found in this study. Molecular surveillance of FMD outbreaks, the determination of circulating strains, revealing the new type/subtype should be in the top priority to improve the efficiency of vaccination.

Key words: FMD, VP1, Molecular surveillance, Phylogeny

-
1. Trung tâm kiểm nghiệm thuốc thú y trung ương I
 2. Chi cục thú y Thừa Thiên- Huế
 3. Viện thú y

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh do virus lở mồm long móng (LMLM) thuộc họ *Picornaviridae*, giống *Aphthovirus* gây ra. Virus LMLM là loại virus RNA nhỏ nhất trong các virus qua lọc [3, 21], có 2 đặc tính quan trọng là tính đa typ, và tính dễ biến đổi kháng nguyên. Các typ virus tuy gây ra triệu chứng giống nhau, nhưng không gây miễn dịch chéo với nhau [4, 6]. Bệnh có thể lây lan trong phạm vi một nước hoặc nhiều nước và gây thành đại dịch.

Thành phần hệ gen của virus LMLM (ngay trong cùng một serotyp) luôn luôn biến đổi; sự đa dạng về di truyền rộng hơn sự biến dị về tính kháng nguyên của serotyp, cho phép phân loại virus dựa vào trình tự VP1 thành những dòng (lineage) riêng biệt [25, 26]. Hiện có 7 typ và hơn 70 subtyp virus LMLM. Trong mỗi typ, tính kháng nguyên của các subtyp không đồng nhất, có thể có miễn dịch chéo giữa một số subtyp [8]; thí dụ, có ít nhất 11 subtyp [12, 24] có tính kháng nguyên khác nhau [10, 11]. Ngoài ra, trình tự nucleotide và axit amin cũng khác nhau giữa các chủng phân lập ở các vùng địa lý khác nhau [13], và trong một ổ dịch có thể đồng thời xuất hiện nhiều typ, nhưng thông thường chỉ một typ chiếm ưu thế [21].

Tại Đông Nam Á và vùng Viễn Đông, dịch bệnh do virus LMLM typ O xảy ra ở Hồng Kông và tất cả các quốc gia thành viên SEAFMD (ngoại trừ Indonesia). Typ A có mặt ở Malaysia, Thái Lan, Lào và Việt Nam [7]. Và typ Asia1 phổ biến vào năm 2004-2005. Ở Việt Nam, bệnh được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1898 tại Nha Trang [6], sau đó dịch lan ra cả nước. Từ trước năm 2003 chỉ có virus LMLM typ O các topotyp O1 Manisa, ME-SA (Pan-Asia) hoặc Cathay ở lợn, sau đó virus typ A và Asia 1 lần lượt xuất hiện [2].

Do tính đa typ và không có miễn dịch bảo hộ chéo giữa các typ, việc xác định typ virus lưu hành tại vùng có dịch là tối cần thiết trong việc lựa chọn vacxin có chủng phù hợp để nâng cao hiệu quả phòng bệnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định typ/subtyp một số chủng phân lập, thu thập thông tin định typ virus từ năm 2003 đến 2010 để phân tích diễn biến tình hình dịch LMLM tại một vùng dịch tễ.

II. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu:

Bệnh phẩm là biểu mô, mụn nước thu thập tại ổ dịch tại các tỉnh thuộc Duyên hải miền Trung (DHMT) theo hướng dẫn tại TCVN 8400 [5]. Tài liệu liên quan đến bệnh LMLM (các báo cáo dịch LMLM và số liệu ổ dịch; số liệu về dịch tễ bệnh LMLM và kết quả định typ virus LMLM; báo cáo kết quả tiêm phòng bệnh LMLM) do Chi cục Thú y các tỉnh, Cơ quan Thú y các vùng III, IV và VI cung cấp, và thông tin từ trang Web của Cục Thú y [1].

2.2- Phương pháp nghiên cứu:

Phương pháp LPBE phát hiện kháng nguyên virus LMLM theo hướng dẫn của nhà cung cấp Kit (Pirbright Code-R5108); phương pháp LPBE xác định hiệu giá kháng thể kháng LMLM (Pirbright Code-R5109); phương pháp RT-PCR như thường quy. Gen VP1 được giải trình tự trên máy tự động ABI 3100 Avant Genetic Analyzer; xây dựng cây tiến hóa dựa vào chương trình MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis v4.2) theo thông số Neighbor-Joining (NJ), Bootstrap với 1000 lần lặp lại (1000 replicates) [9].

III. Kết quả và thảo luận

Tình hình dịch LMLM và typ virus lưu hành tại DHMT

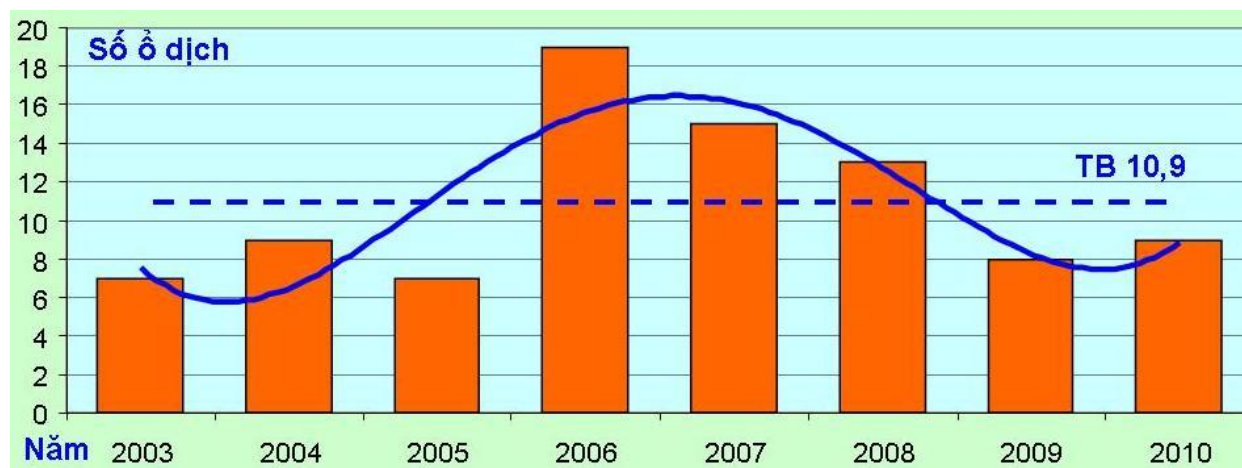
3.1.1 Tình hình dịch LMLM ở DHMT từ 2003 đến 2010

Trong 8 năm từ 2003 đến 2010, tại 14 tỉnh DHMT đã xảy ra 87 ổ dịch LMLM, nghĩa là tần xuất dịch ở mỗi tỉnh là 0,78 ổ dịch/năm ($87/14 \text{ tỉnh}/8 \text{ năm} = 0,78$), hay nói cách khác trung bình

khoảng 15,5 tháng mỗi tỉnh có dịch 1 lần. Số ổ dịch LMLM dao động tùy theo địa phương, cao nhất là Hà Tĩnh và thấp nhất là Đà Nẵng (bảng 1). Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng khái niệm ổ dịch theo nghĩa rộng, một ổ dịch sau khi bùng phát ở một địa điểm với số bệnh súc tăng và vùng địa lý mở rộng, kéo dài đến khi con bệnh cuối cùng chết hoặc lành bệnh sau 21 ngày; thí dụ dịch ở tỉnh Quảng Trị năm 2008, kéo dài gần 3 tháng trên 6 huyện/thị chỉ tính là 1 ổ dịch; ngược lại tại 1 địa phương nếu dịch phát ra vào các thời điểm khác nhau và/hoặc có nguồn gốc khác nhau sẽ được tính có trên 1 ổ dịch/năm. Do vậy số liệu về ổ dịch có thể khác với những công bố trước đây.

Bảng 1. Tổng hợp số ổ dịch LMLM ở 14 tỉnh DHMT từ 2003-2010

TT	Tỉnh	Số ổ dịch								Tổng
		2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	
1	Thanh Hóa				1	1	2		1	5
2	Nghệ An	2			2	1	3	1	2	11
3	Hà Tĩnh	2	1		2	3	5	1	1	15
4	Quảng Bình			1		1	1	1	1	5
5	Quảng Trị	2	1		1	2	1	1		8
6	Thừa Thiên Huế		1		2	2	1	1		7
7	Đà Nẵng				1					1
8	Quảng Nam				1	1		1		3
9	Quảng Ngãi		1	2	2	1		1	2	9
10	Bình Định		2	2		1				5
11	Phú Yên	1	1		3	1		1	1	8
12	Khánh Hòa		1	1	3	1			1	7
13	Ninh Thuận		1	1	1					3
14	Bình Thuận									0
	Tổng	7	9	7	19	15	13	8	9	87



Hình 1. Biến động số ổ dịch LMLM theo thời gian từ 2003 đến 2010

Tuy biến động của số ổ dịch theo năm vẫn có dao động hình sin (hình 1), nhưng không còn rõ nét do dịch xảy ra hàng năm. Trong giai đoạn từ năm 2003 đến 2006, dịch chủ yếu xảy ra ở các tỉnh Nam trung Bộ (bảng 1, hình 2), ngược lại, từ 2007 đến 2010, dịch chủ yếu ở thuộc các tỉnh Bắc trung Bộ và Khu 4 cũ. Tại 1 tỉnh, dịch có thể xảy ra 3-5 năm liên tục; các tỉnh khu 4 cũ (từ Thanh Hóa đến Thừa Thiên Huế) liên tục 5 năm có dịch (từ 2006 đến nay, bảng 1). Diễn biến dịch LMLM không còn mang tính chất chu kỳ kinh điển (2-3 năm/1 đợt dịch) mà có thể kéo dài liên tục nhiều năm trong cả vùng hoặc ở 1 tỉnh, đánh dấu một bước diễn biến mới ngày càng phức tạp của dịch LMLM tại DHMT.

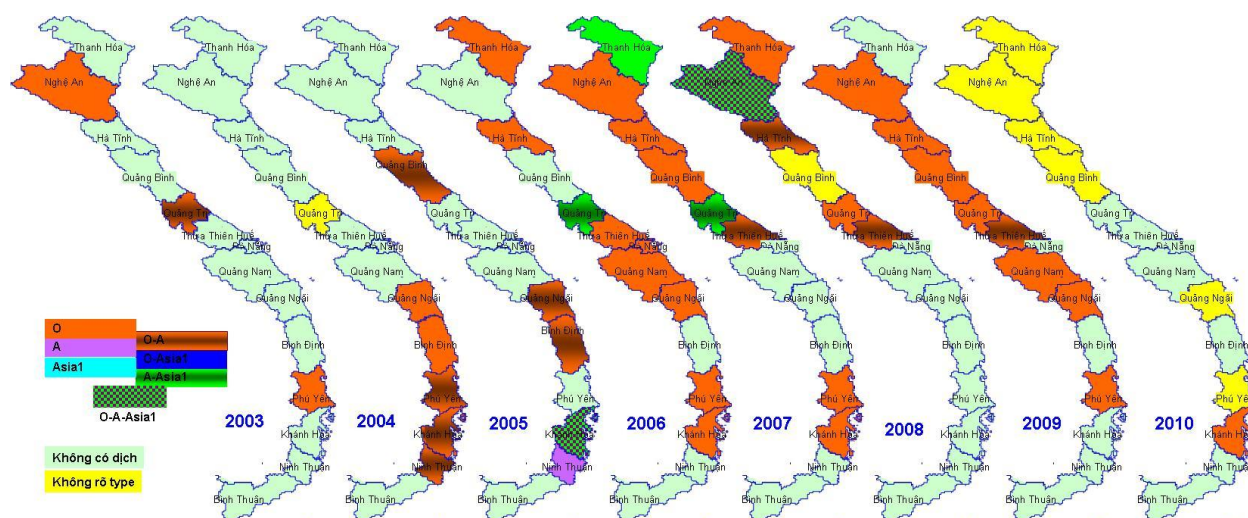
3.1.2 Diễn biến phân bố typ virus LMLM tại DHMT từ 2003-2010

Số liệu thống kê typ virus LMLM ở 65 ổ dịch (bảng 2, hình 2) cho biết có 3 typ virus O, A và Asia 1 đang lưu hành tại khu vực DHMT trong đó typ O là phổ biến và xuất hiện liên tục trong 8 năm, số ổ dịch do typ A và Asia 1 ít gặp hơn.

Bảng 2. Tổng hợp typ virus lưu hành tại DHMT từ 2003 đến 2010

TT	Tỉnh	O								A								As										
		2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009		2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009		2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009		O	A	As
1	Thanh Hóa				1		2															1				3		1
2	Nghệ An	1				1	2	1						1									1			5	1	1
3	Hà Tĩnh				2	1	3	1						1												7	1	
4	Quảng Bình			1		1		1				1														3	1	
5	Quảng Trị	1			1	1	1	1		1											1	1				5	1	2
6	T.T. Huế				1	2	1	1					1		1											5	2	
7	Đà Nẵng				1																					1		
8	Quảng Nam				1				1																	2		
9	Quảng Ngãi		1	2	1							1														5	1	
10	Bình Định		1	1								1														2	1	
11	Phú Yên	1	1		1	1		1																		5	1	
12	Khánh Hòa		1	1	3	1				1	1									1						6	2	1
13	Ninh Thuận		1							1	1															1	2	
14	Bình Thuận																									0	0	0
	Tổng	3	5	5	12	8	9	8		1	3	5	0	1	2	1		0	0	1	1	2	1	0		50	13	5

Thông tin về định typ virus LMLM được thu thập từ các nguồn: (1) Viện thú y (2) Cục Thú y bao gồm (i) Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương, (ii) Phòng Dịch tễ, (iii) Cơ quan Thú y vùng VI; (3) Báo cáo của Chi cục Thú y 14 tỉnh DHMT (phiếu trả lời kết quả xét nghiệm có thông tin xác định typ) và (4) kết quả nghiên cứu này (16 ổ dịch 2006-2007).

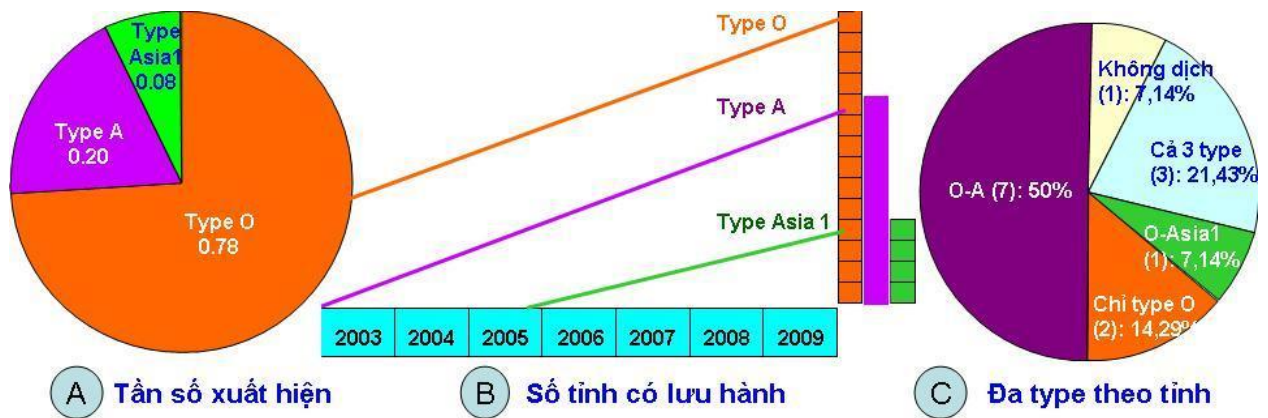


Hình 2. Phân bố typ virus LMLM tại DHMT năm 2003-2010

Diễn biến tình hình dịch LMLM có 3 đặc điểm chính

- Sự xuất hiện của typ mới: Song song với diễn biến phức tạp của dịch LMLM là sự xuất hiện của các typ virus mới. trên nền của typ O, năm 2003 có sự xuất hiện Typ A tại Ninh Thuận năm 2005, có sự xuất hiện của typ Asia1 tại Khánh Hòa (bảng 2, hình 2). Tần xuất xuất hiện typ O là 0.72 (phổ biến nhất), typ A là 0.2 và typ Asia 1 là 0.08 (hình 3).

- Hiện tượng nhiễm đa typ tại một ổ dịch như đã mô tả trước đây xảy ra tại Khánh Hòa, 2005, nay lập lại ở Quảng Trị (typ Asia 1 xuất hiện tại ổ dịch QT-06 ngày 23/5/2007 trên nền virus LMLM typ O đang lưu hành; tương tự, tại Thừa Thiên Huế, typ A xuất hiện ở nơi đang có lưu hành typ O năm 2007, chứng tỏ diễn biến dịch ngày càng phức tạp.



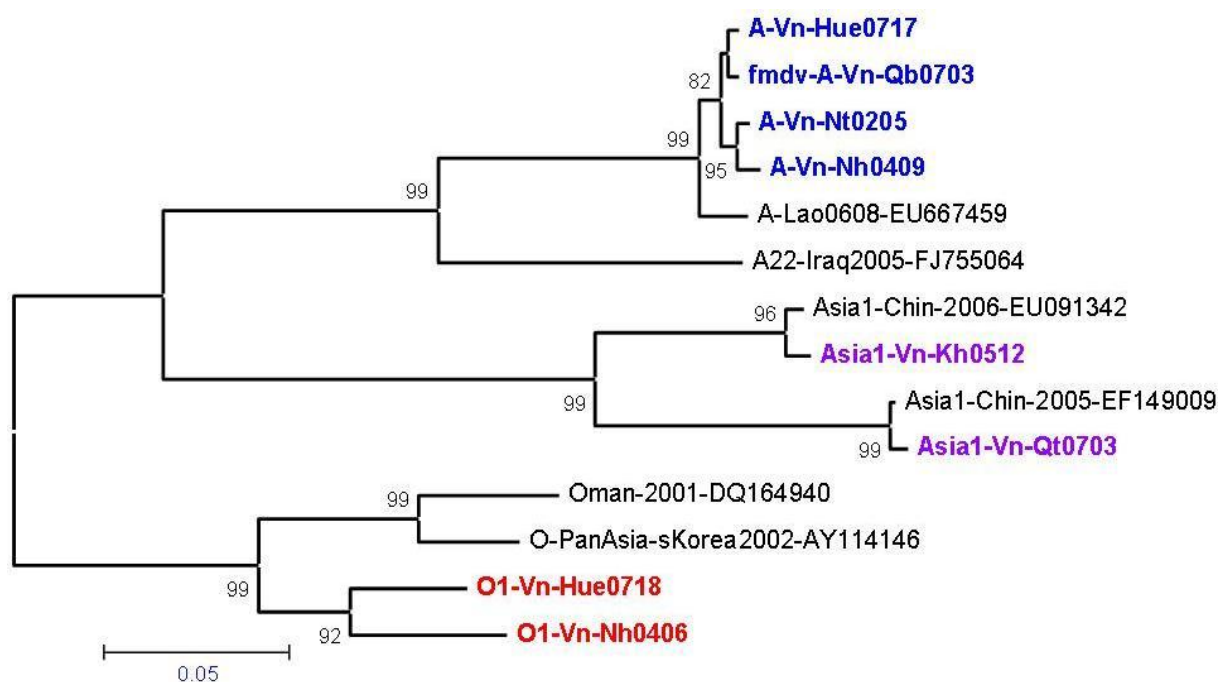
Hình 3. Virut LMLM tại DHMT: typ và tần số xuất hiện (2003-2010)

- Sự lưu hành đồng thời nhiều typ ở một địa phương ngày càng phổ biến (hình 3) sau 8 năm từ khi xuất hiện typ A đã lan ra 10 tỉnh và sau 6 năm typ Asia 1 đã lan ra ít nhất 4 tỉnh. Theo số liệu đến thời điểm hiện tại, trong số 14 tỉnh DHMT, chỉ còn 2 tỉnh (14,29%, Đà Nẵng, Quảng Nam) đang có đơn typ O lưu hành; số còn lại có ít nhất 2 typ virut: 1 tỉnh (7,14%, Thanh Hóa) có 2 typ O và Asia 1, 7 tỉnh (50% Hà Tĩnh, Quảng Bình, Thừa Thiên Huế, Quảng Ngãi, Bình Định, Phú Yên và Ninh Thuận) có 2 typ O và A; và ở 3 tỉnh (21,43%: Nghệ An, Quảng Trị và Khánh Hòa) đã xác định sự có mặt của cả 3 typ O, A và Asia 1. Minh họa ở hình 3b cũng cho thấy, theo thời gian, các typ O, A và Asia 1 có khuynh hướng phủ khắp khu vực.

Trình tự gen virut LMLM và subtype

Để xác định subtype virut lưu hành, chúng tôi đã tiến hành giải trình tự gene 1d mã hóa cho virion protein VP1 của 4 chủng virut LMLM phân lập từ bò tại khu vực DHMT năm 2007: Hue07.18 (typ O), Hue07.17 và Qb07.03 (typ A) và Qt07.03 (typ Asia 1). Giữa 2 chủng của cùng typ A, độ tương đồng nucleotid và amino acid đều là 99% được coi như có cùng nguồn gốc; vùng VP1 của các chủng typ A có độ tương đồng với typ Asia 1 về nucleotid là 64% và về amino acid là 65%; với chủng của typ O là 68% (nucleotid) và 72% (amino acid); tương tự, độ tương đồng giữa 2 chủng (typ Asia 1 và O) là 64% về nucleotide và 70 % về amino acid. Về đặc tính di truyền, sự khác biệt giữa các serotyp ở vùng 1d khoảng trên 30%, phù hợp với kết quả định typ và các kết quả nghiên cứu ngoài nước [20, 25], trong đó giữa các typ sự tương đồng trình tự nucleotid ở gene 1d chỉ đạt dưới mức 70%.

Kết quả so sánh trình tự nucleotide với dữ liệu ở genbank Quốc tế cho biết chủng -Qt07.03 (Asia 1) có mức tương đồng 99% với gần nhất với typ Asia 1 phân lập tại Giang Tô, Trung Quốc năm 2005 (Ac. EF149009 [19]), được phân loại là có serotyp Asia 1, nhóm chủng “mới” Jiangsu-Wusi; hai chủng Qb07.03 và Hue07.17 (typ A) có quan hệ gần gũi nhất (99% tương đồng) với chủng A/Lao/1/2006 (EU667456 [14]) và O1-Hue07.18 với Chủng O/Lao/7/2003 (94%, EU667448, [14]).



Hình 4. Phả hệ của virus phân lập dựa vào trình tự nucleotid của gene 1d

(ClustalW, Neighbour-joining, Unrooted tree, bootstrap 1000 replicates)

Trình tự 639 bp gene 1d, mã hóa cho VP1 đã sử dụng: O/Vn/Hue07.18, A/Vn/Hue07.17, A/Vn/Qb07.03 và Asia1/Vn/Qt07.03 (nghiên cứu này); các chủng Kh05.12 (typ Asia1) phân lập tại Khánh Hòa năm 2005; Nt02.05 (typ A)-Ninh Thuận 2002; chủng Nh04.09 (typ A)-Khánh Hòa 2004, và chủng Nh04.06 (typ O)- Khánh Hòa 2004 [để tài trọng điểm cấp Bộ của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Viện thú y]; trình tự từ genbank: 2 chủng Asia 1: chủng Jiangsu-Wusi 2005 (Acc. EF149009) [19], chủng AS1/BR001/2006 (EU091342) được phân lập ở Trung Quốc năm 2006 và đã phân loại thuộc typ Asia 1 topo Myanmar; Hai chủng typ A: A22 Iraq (Shamir, FJ755064 [16]) và chủng thuộc typ A của Lào (EU667559) [15]; hai chủng thuộc typ O Manisa (Oman 2001, DQ164940 [17, 18]) và O-PanAsia (có nguồn gốc từ Hàn Quốc 2002, AY114146 [22, 23]).

Phả hệ dựa vào trình tự gen 1d (hình 4) cho biết

- Subtyp O: Hai chủng Nh04.06 và Hue07.18 nhóm cùng cành với O-Manisa 2001 và O-PanAsia 2002, tuy nhiên không tách hẳn về topotyp O-Manisa hay về nhánh PanAsia. Trong một phân tích khác hai trình tự này ngã về các trình tự thuộc topo O-Manisa (không trích dẫn phả hệ).

- Subtyp A: Các trình tự gene của 4 phân lập tại Việt Nam đều thuộc về 1 nhóm, có cùng nguồn gốc với typ A của Cộng hòa Dân chủ Nhân dân Lào, nhưng khác với nhóm A22. Theo hệ thống phân loại chúng cùng nhóm với A Malaysia 1997. Hai nhánh của typ A thuộc về 2 vùng địa lý khác nhau bắc và nam Trung Bộ. Tính chất phân nhóm tộc theo đặc điểm vùng địa lý đặc thù có thể do chúng đã được nhập vào Việt Nam bằng 2 con đường khác nhau.

- Subtyp Asia 1: Các typ Asia 1 chủng Kh05.12 và Qt07.03 tách thành 2 nhánh khác nhau: Virus LMLM chủng Kh05.12 xuất hiện ở Khánh Hòa tháng 10 năm 2005 [2], có tính tương đồng cao với chủng AS1/BR001/2006 (EU091342) được công bố ở Trung Quốc năm 2006 và đã phân loại thuộc typ Asia 1-Myanmar; ngược lại, chủng Qt07.03 tìm thấy vào tháng 6/2007 lại có trình tự giống với chủng QH/2005 (Jiangsu-Wusi) lưu hành tại Trung Quốc [19]; Tại Trung Quốc, các nhà khoa học đã phân 2 chủng này vào 2 subtyp khác nhau (Myanmar/Bắc Kinh và Jiangsu/QH/2005). Như vậy, ngoài typ mới xuất hiện, trong mỗi typ, các subtyp lưu hành trong khu vực cũng lần lượt xuất hiện.

IV. Kết luận và kiến nghị

Kết luận: Hiện có 3 typ virus LMLM: O, A và Asia 1 đồng lưu hành tại khu vực DHMT.

Ngoài typ O-manisa kinh điển các typ virus mới đã xuất hiện trong 8 năm qua: virus LMLM typ A (chủng Hue07.17 và Qb07.03, thuộc nhóm subtype A Malaysia 1997) có quan hệ gần gũi với các chủng typ A lưu hành tại Lào; sự xâm nhập của typ A có thể theo các đường khác nhau. Virus LMLM typ Asia 1 chủng Qt07.03, xuất hiện ở Quảng Trị tháng 6/2007 cùng nguồn gốc với chủng lưu hành ở Giang Tô, Trung Quốc từ 2005 và chủng KH1.2 xuất hiện tại Khánh Hòa năm 2005 thuộc nhóm chủng Myanmar lưu hành ở Ấn Độ và Trung Quốc; sự xuất hiện của 2 subtype Asia 1 tại Khánh Hòa và Quảng Trị vào hai thời điểm khác nhau. Các typ và subtype virus xuất hiện lần đầu tại DHMT đều có quan hệ họ hàng với các virus LMLM lưu hành trong khu vực.

Diễn biến tình hình dịch LMLM tại một khu vực, trong nghiên cứu này là tại khu vực DHMT, cho thấy diễn biến dịch không còn quy luật kinh điển 2-3 năm một lần mà xảy ra hàng năm với tần xuất 0,78 ổ dịch/tỉnh/năm. Dịch LMLM tại khu vực DHMT diễn biến ngày càng phức tạp do ba nguyên nhân chính (i) do sự xuất hiện của typ và subtype mới, (ii) các typ/subtyp mới xâm nhập có khuynh hướng ngày càng lan rộng gây ra hiện tượng đa nhiễm trong cùng một ổ dịch và (iii) tại một tỉnh/địa phương có sự lưu hành của nhiều typ virus.

Kiến nghị: Tại một vùng dịch tễ bệnh LMLM, do có các typ mới xuất hiện, các typ vaccine đã và đang sử dụng theo lộ trình tiêm phòng bệnh LMLM ở các tỉnh DHMT hiện chưa hoàn toàn phù hợp, cần thiết sử dụng vaccine đa giá có khả năng bảo hộ ít nhất các typ virus lưu hành tại khu vực như đã trình bày ở nghiên cứu này. Thông tin về giám sát dịch tễ học phân tử của bệnh LMLM, xác định typ/subtyp lưu hành và phát hiện typ/subtyp mới là quan trọng đối với mỗi địa phương có dịch và cần được ưu tiên hàng đầu trong chiến lược sử dụng vaccine.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cục thú y. <http://www.cucthuy.gov.vn>, (2010).
2. Nguyễn Viết Không, Nguyễn Văn Hưng, Lê Thắng, Trương Văn Dung, Trần Thị Thanh Hà, Trương Quang Lâm và Trịnh Quang Đại. Phát hiện typ Asia 1 virus LMLM lần đầu tiên tại Khánh Hòa bằng kỹ thuật RT-PCR. *Tạp chí KHKT thú y số 4*, 96-97, (2006).
3. TCVN. Tiêu chuẩn Việt Nam: Chẩn đoán bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán bệnh lở mồm long móng. *TCVN-8400:2010*, Hà Nội, 1-17, (2009).
4. Brocchi, E., De Diego, M. I., Berlinzani, A., Gamba, D., & De Simone, F. Diagnostic potential of Mab-based ELISAs for antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus to differentiate infection from vaccination. *Vet Q.* **20 Suppl 2**, S20-S24 (1998).
5. Callens, M. & De Clercq, K. Differentiation of the seven serotypes of foot-and-mouth disease virus by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Virol Methods* **67**, 35-44 (1997).
6. Davies J. A complement fixation technique for the quantitative measurement of antigenic differences between strains of foot and mouth disease virus. *J.Hyg.Camb* **62**, 407-411 (1964).
7. Feng, Q. *et al.* Serotyp and VP1 gene sequence of a foot-and-mouth disease virus from Hong Kong (2002). *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 715-721 (2003).
8. Feng, Q. *et al.* Genome comparison of a novel foot-and-mouth disease virus with other FMDV strains. *Biochem Biophys Res Commun* **323**, 254-263 (2004).
9. Khounsy, S. *et al.* Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease viruses from South East Asia 1998-2006: the Lao perspective. *Vet Microbiol* **137**, 178-183 (2009).
10. Khounsy, S. *et al.* Foot and mouth disease in the Lao People's Democratic Republic: I. A review of recent outbreaks and lessons from control programmes. *Rev Sci Tech* **27**, 839-849 (2008).

15. Knowles, N. J. *et al.* Recent spread of a new strain (A-Iran-05) of foot-and-mouth disease virus typ A in the Middle East. *Transbound Emerg Dis* **56**, 157-169 (2009).
16. Knowles, N. J. & Samuel, A. R. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* **91**, 65-80 (2003).
17. Knowles, N. J., Samuel, A. R., Davies, P. R., Midgley, R. J., & Valarcher, J. F. Pandemic strain of foot-and-mouth disease virus serotyp O. *Emerg Infect Dis* **11**, 1887-1893 (2005).
18. Li, D., Shang, Y. J., Liu, Z. X., Liu, X. T., & Cai, X. P. Comparisons of the complete genomes of two Chinese isolates of a recent foot-and-mouth disease typ Asia 1 virus. *Arch Virol* **152**, 1699-1708 (2007).
19. Martinez, M. A. *et al.* Evolution of the capsid protein genes of foot-and-mouth disease virus: antigenic variation without accumulation of amino acid substitutions over six decades. *J Virol* **66**, 3557-3565 (1992).
20. Merchant I.A. and Barner R.D. Foot and mouth disease. *Infectious disease of domestic animals. Third edition, Iowa State University press. Iowa, USA* 199-205 (1981).
21. Oem, J. K. *et al.* Identification and antigenic site analysis of foot-and-mouth disease virus from pigs and cattle in Korea. *J Vet Sci* **6**, 117-124 (2005).
22. Oem, J. K. *et al.* Pathogenic characteristics of the Korean 2002 isolate of foot-and-mouth disease virus serotyp O in pigs and cattle. *J Comp Pathol* **138**, 204-214 (2008).
23. OIE. Manual diagnosis test and vaccin for terrestrial animals. Chapter 2.1.1. Foot and Mouth disease. 77-92. 2000. OIE.
24. Reid, S. M. *et al.* Detection of all seven serotyps of foot-and-mouth disease virus by real-time, fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* **105**, 67-80 (2002).
25. Samuel, A. R. & Knowles, N. J. Foot-and-mouth disease typ O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotyps). *J Gen Virol* **82**, 609-621 (2001).
26. Samuel, A. R. & Knowles, N. J. Foot-and-mouth disease virus: cause of the recent crisis for the UK livestock industry. *Trends Genet* **17**, 421-424 (2001).