

ĐÁNH GIÁ VÀ LỰA CHỌN BỘ MỒI RT-PCR PHÙ HỢP CHO PHÁT HIỆN WATERFOWL REOVIRUS

Vũ Thị Ngọc, Huỳnh Thị Mỹ Lệ*

Khoa Thú y, Học viện Nông Nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: huynhhtml@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 03.03.2026

Ngày chấp nhận đăng: 05.05.2026

TÓM TẮT

Trong xét nghiệm sinh học phân tử, đặc tính của mỗi bộ, bao gồm mức phù hợp với trình tự đích và xu hướng hình thành cấu trúc thứ cấp, ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả PCR. Tuy nhiên, trong xét nghiệm waterfowl reovirus (WRV), những yếu tố này hiện ít được quan tâm. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá chất lượng hai cặp mồi RT-PCR DRV.320F/320R và DRV.368F/368R thông qua công cụ tin sinh học và thực nghiệm. Kết quả cho thấy DRV.368 có mức độ phù hợp trình tự cao hơn tại vùng 3' và xu hướng hình thành cấu trúc thứ cấp thấp hơn so với DRV.320, đặc biệt ở môi ngược. Phù hợp với các đặc điểm này, DRV.368F/368R duy trì khả năng khuếch đại ổn định trên dải điều kiện khảo sát rộng hơn và cho tỷ lệ phát hiện mẫu dương tính cao hơn khi xét nghiệm với 56 mẫu bệnh phẩm. Tính đặc hiệu của cả hai cặp mồi được xác nhận ở mức thiết kế và giải trình tự sản phẩm. Tổng hợp các kết quả cho thấy DRV.368F/368R là cặp mồi phù hợp hơn cho phát hiện WRV bằng RT-PCR trong điều kiện nghiên cứu hiện tại.

Từ khóa: Waterfowl reovirus, mồi, đánh giá, lựa chọn, RT-PCR.

Evaluation and Selection of RT-PCR Primers for Detection of Waterfowl Reovirus (WRV)

ABSTRACT

In molecular assays, primer characteristics, including target sequence complementarity and the tendency to form secondary structures, directly affect PCR efficiency. However, in waterfowl reovirus (WRV) testing, these factors currently receive little attention. This study was conducted to evaluate the quality of two RT-PCR primer pairs, DRV.320F/320R and DRV.368F/368R, using bioinformatics tools and experimental assays. The results showed that DRV.368 had higher sequence complementarity at the 3' region and a lower tendency to form secondary structures compared to DRV.320, especially in the reverse primer. Consistent with these characteristics, DRV.368F/368R maintained stable amplification across a wider range of tested conditions and yielded a higher positive detection rate when testing 56 clinical samples. The specificity of both primer pairs was confirmed at the in silico design level and through amplicon sequencing. Overall, the results indicate that DRV.368F/368R is a more suitable primer pair for detecting WRV by RT-PCR under the current study conditions.

Keywords: Waterfowl reovirus, primer, evaluation, selection, RT-PCR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khoảng 10 năm trở lại đây, cùng với sự phát triển của mô hình chăn nuôi vịt - ngan siêu thịt ở nước ta, ngoài các virus gây bệnh phổ biến như cúm gia cầm, dịch tả vịt và viêm gan vịt, nhiều virus mới ở thủy cầm đã liên tiếp được phát hiện. Ví dụ như waterfowl parvovirus (Nguyễn Văn Giáp & cs., 2019), duck tembusu virus (Đặng

Hữu Anh & cs., 2020), duck circovirus (Tran & cs., 2022) và waterfowl reovirus (reovirus ở thủy cầm) (Nhan & cs., 2025; Vu & cs., 2025).

Waterfowl reovirus (WRV) thuộc loài *Avian orthoreovirus*, giống *Orthoreovirus*, họ *Spinareoviridae* (Matthijnsens & cs., 2022). Các chủng WRV, bất kể phát hiện ở loài thủy cầm nào, đều có thể được phân vào ba genogroup: cổ điển (classical), mới (novel) và

mới nổi (newly emerging, còn gọi là *Avian orthoreovirus B*) (Wang & cs., 2013; Cao & cs., 2019; Varga-Kugler & cs., 2022). Tất cả WRV có cấu trúc di truyền tương tự nhau, với bộ gen gồm 10 đoạn RNA sợi đôi, được phân theo kích thước thành ba nhóm: lớn (L1-L3), trung bình (M1-M3) và nhỏ (S1-S4) (Heffels-Redmann & cs., 1992; Day, 2009; Wang & cs., 2013; Yun & cs., 2014; Varga-Kugler & cs., 2022). Trong số này, đoạn gen mã hóa protein sigma C là biến đổi nhất (Liu & cs., 2003), dẫn tới sự đa dạng cao về mặt di truyền và kháng nguyên giữa các loại reovirus (Vasserman & cs., 2004).

Để phát hiện reovirus ở thủy cầm, hiện nay, các phương pháp dựa trên sinh học phân tử được sử dụng phổ biến và chiếm ưu thế so với phân lập virus và huyết thanh học (Huang & cs., 2026). Các xét nghiệm này đã được phát triển dưới nhiều định dạng như RT-PCR thường, real-time RT-PCR (SYBR Green hoặc TaqMan probe), RT- LAMP, digital PCR và CRISPR/Cas-based assay (Huang & cs., 2026). Trong đó, đích phát hiện chủ yếu là các đoạn gen S mã hóa protein sigma A (Zhang & cs., 2006), sigma B và sigma C (Huang & cs., 2026). Một số nghiên cứu cho thấy gen sigma C có tính lưỡng dụng khi được sử dụng làm đích phát hiện, do vừa giúp tăng độ đặc hiệu (Jiang & cs., 2025), vừa có thể phục vụ phân tích dịch tễ học phân tử (Qiu & cs., 2025).

Trong các xét nghiệm sinh học phân tử, đặc tính của môi, bao gồm mức độ bổ sung với trình tự đích và xu hướng hình thành cấu trúc thứ cấp, có ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả khuếch đại (Stadhouders & cs., 2010; Meagher & cs., 2018; Huang & cs., 2024). Sai khác trình tự giữa môi và gen đích, đặc biệt tại đầu 3', cũng

như sự hình thành dimer của môi, có thể dẫn đến khuếch đại không đặc hiệu và làm giảm độ nhạy phản ứng. Tuy nhiên, trong phát hiện WRV, các công bố hiện nay chủ yếu tập trung vào độ đặc hiệu và giới hạn phát hiện của phản ứng, trong khi đánh giá về đặc tính của cặp môi sử dụng rất hiếm được đề cập (Zhang & cs., 2006; Qiu & cs., 2025). Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm (i) đánh giá chất lượng nội tại các cặp môi RT-PCR nhắm vào gen sigma C, bao gồm phân tích sự phù hợp trình tự và cấu trúc thứ cấp; (ii) xác định một số điều kiện tối ưu của phản ứng (nồng độ môi và nhiệt độ bắt cặp). Các kết quả thu được là cơ sở lựa chọn bộ môi phù hợp nhất cho phát hiện WRV.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu bệnh phẩm: 56 mẫu gộp phủ tạng của vịt bệnh thu thập ở trang trại/hộ chăn nuôi tại một số tỉnh miền Bắc trong năm 2024.

Kit tách chiết ADN/ARN (WizPrep viral DNA/RNA mini kit, Wizbiosolution, W73052).

Kit tổng hợp cDNA (Maxime RT premix kit, iNtRON, 25082).

Kit PCR (GoTaq green master mix, Promega, M7122).

Hóa chất, sinh phẩm dùng phân tích kết quả của phản ứng PCR: đệm TAE buffer 50X (Công ty TNHH giải pháp y sinh ABT, DD-035); UltraPure agarose (Invitrogen, 16500500); 100bp DNA ladder (Invitrogen, 15628019); RedSafe nucleic acid staining solution (iNtRON, 21141).

Cặp môi đặc hiệu phát hiện gen sigma C của WRV (Bảng 1).

Bảng 1. Trình tự môi phát hiện WRV dùng trong nghiên cứu

Gen đích	Tên môi*	Trình tự môi (5'-3')	Kích thước (bp)	Nguồn gốc
Sigma C	DRV.320F	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	320	Huang & cs. (2023)
	DRV.320R	GAGGATAGCTCGGACCGGACAT		
Sigma C	DRV.368F	TGAGACGCCTGACTACGATT	368**	Niu & cs. (2017)
	DRV.368R	ATGCTTGAGTGAGACGACT		

Ghi chú: *: Tên môi được đặt lại trong nghiên cứu này; **: Kích thước được tính lại theo trình tự tham chiếu KF154116 là 368bp, không phải là 380bp như công bố.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân tích sự phù hợp vị trí gắn mồi

Thu thập trình tự gen mã hóa protein sigma C của WRV từ GenBank (truy cập 02/2026). Các trình tự nucleotide được căn chỉnh riêng rẽ với trình tự mồi xuôi và mồi ngược của từng cặp mồi (Bảng 1) bằng MAFFT (Kato & cs., 2019). Do dữ liệu gen sigma C trên GenBank bao gồm cả trình tự đầy đủ và trình tự khuyết thiếu ở đầu 5' hoặc 3', chỉ các trình tự chứa đầy đủ vùng gắn của cả mồi xuôi và mồi ngược mới được giữ lại cho các phân tích tiếp theo. Theo đó, số trình tự đủ điều kiện là 145 đối với cặp mồi DRV.320F/320R và 157 đối với cặp mồi DRV.368F/368R.

2.2.2. Phân tích cấu trúc thứ cấp của mồi

Cấu trúc thứ cấp của mồi, bao gồm tự bắt cặp (homodimer) và bắt cặp giữa hai mồi (heterodimer), được phân tích bằng công cụ OligoAnalyzer (<https://sg.idtdna.com/calc/analyser>). Độ ổn định nhiệt động (thermodynamic stability) của các cấu trúc được đánh giá thông qua năng lượng tự do Gibbs (ΔG), trong đó ΔG càng âm biểu thị cấu trúc càng ổn định. Các cấu trúc dimer có $\Delta G \geq -6$ kcal/mol được xem là chấp nhận được, trong khi ΔG âm hơn ngưỡng này được coi là bất lợi cho phản ứng PCR (https://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html).

2.2.3. Phân tích tính đặc hiệu của mồi

Trình tự mồi (Bảng 1) được đánh giá tính đặc hiệu đối với WRV bằng công cụ Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) trên cơ sở dữ liệu core nucleotide database. Phân tích nhằm xác định khả năng bắt cặp của mồi với trình tự WRV và

phát hiện các sản phẩm khuếch đại dự đoán trên các khuôn ngoài đích tiềm tàng (*products on potentially unintended templates*). Chỉ các cặp mồi không tạo sản phẩm khuếch đại dự đoán ngoài WRV mới được coi là đặc hiệu.

2.2.4. Phân tích tính đặc hiệu của sản phẩm khuếch đại

Để xác nhận tính đặc hiệu của sản phẩm RT-PCR khuếch đại bởi các cặp mồi ở bảng 1, các sản phẩm thu được với mồi DRV.320F/320R và DRV.368F/368R được giải trình tự hai chiều bằng phương pháp Sanger (1st BASE, Malaysia). Lắp ráp trình tự thu được bằng phần mềm BioEdit (Hall, 1999), sau đó so sánh với cơ sở dữ liệu nucleotide bằng BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.2.5. Tối ưu nồng độ mồi của phản ứng RT-PCR

Nồng độ mồi xuôi và mồi ngược được tối ưu theo ma trận kết hợp 4×4 (10; 5; 2,5; 1,25 pmol/ μ l) như trình bày ở bảng 2. Các phản ứng RT-PCR được thực hiện trong cùng điều kiện thành phần và chu trình nhiệt, chỉ khác nồng độ mồi. Sản phẩm được phân tích bằng điện di agarose. Tổ hợp nồng độ cho băng đặc hiệu rõ nét được chọn là tối ưu.

2.2.6. Tối ưu nhiệt độ gắn mồi

Nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho mỗi cặp mồi (Bảng 1) được xác định bằng PCR gradient. Nhiệt độ các bước biến tính và kéo dài được giữ cố định, trong khi nhiệt độ bước gắn mồi được thiết lập dao động trong khoảng 50-60°C trên máy Agilent SureCycler 8800. Nhiệt độ gắn mồi tối ưu được xác định là nhiệt độ tại đó sản phẩm PCR thu được có băng đặc hiệu rõ nét, không hoặc ít xuất hiện sản phẩm phụ.

Bảng 2. Ma trận tối ưu nồng độ mồi (pmol/ μ l)

		Nồng độ mồi ngược			
		10	5	2,5	1,25
Nồng độ mồi xuôi	10	10 : 10	10 : 5	10 : 2,5	10 : 1,25
	5	5 : 10	5 : 5	5 : 2,5	5 : 1,25
	2,5	2,5 : 10	2,5 : 5	2,5 : 2,5	2,5 : 1,25
	1,25	1,25 : 10	1,25 : 5	1,25 : 2,5	1,25 : 1,25

2.2.7. Xác định độ nhạy của phản ứng RT-PCR đối với từng cặp mẫu

Sản phẩm RT-PCR khuếch đại toàn bộ đoạn gen sigma C (1.001bp) được điện di và cắt khỏi gel, sau đó được thu hồi bằng GeneJET gel extraction kit (Thermo Fisher Scientific, K0691). Nồng độ ADN được đo bằng NanoDrop One Spectrophotometer, với lượng xác định được là 0,44 ng/μl; tương ứng với $4,07 \times 10^8$ bản sao/μl (<https://www.technologynetworks.com/tn/tools/copynumbercalculator>). ADN sợi khuôn được pha loãng theo cơ số 10 trong đệm TE (pH 8,0) để tạo dãy pha loãng từ 10^{-1} đến 10^{-10} . Phản ứng PCR được thực hiện với từng cặp mẫu ở nhiệt độ gần môi và nồng độ tối ưu, giữ cố định các thành phần và điều kiện phản ứng, ngoại trừ nồng độ ADN khuôn. Độ nhạy của phản ứng với mỗi cặp mẫu được xác định là độ pha loãng cao nhất của ADN khuôn vẫn cho băng PCR đặc hiệu.

2.2.8. Phương pháp RT-PCR phát hiện WRV ở mẫu bệnh phẩm

ADN/ARN tổng số của mẫu bệnh phẩm được tách chiết bằng kit WizPrep viral DNA/RNA mini kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chuyển ARN thành cDNA bằng kit Maxime RT premix với thành phần và chương trình nhiệt theo hướng dẫn. Phản ứng PCR được thực hiện bằng kit GoTaq green master mix, sử dụng cặp mẫu ở bảng 1 ở nồng độ tối ưu. Các thành phần khác và thể tích của phản ứng được thực hiện theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Chu trình nhiệt của phản ứng được thiết lập như sau: 95°C/2 phút, 40 chu kỳ (95°C/ 30 giây, nhiệt độ gần môi tối ưu/ 30 giây, 72°C/ 60 giây). Sản phẩm PCR được điện di bằng gel agarose 2% trong dung dịch 0,5X TAE ở 100V trong 20 phút. Đọc kết quả điện di bằng thiết bị Amersham ImageQuant 800.

2.2.9. Đánh giá mức độ phù hợp chẩn đoán giữa hai cặp mẫu

Mức độ phù hợp chẩn đoán giữa hai cặp mẫu DRV.320F/320R và DRV.368F/368R được đánh giá bằng bảng 2×2 . Tỷ lệ phù hợp chung và tỷ lệ đồng thuận dương/âm (positive/negative agreement) được tính như sau:

$$\text{Tỷ lệ phù hợp chung} = \frac{a + d}{N}$$

$$\text{Tỷ lệ đồng thuận dương} = \frac{a}{a + b}$$

$$\text{Tỷ lệ đồng thuận âm} = \frac{d}{c + d}$$

Trong đó, a là số mẫu dương tính với cả hai cặp mẫu, b là số mẫu dương với mỗi DRV.320F/320R nhưng âm với mỗi DRV.368F/368R, c là số mẫu âm với mỗi DRV.320F/320R nhưng dương với mỗi DRV.368F/368R, d là số mẫu âm tính với cả hai mẫu và $N = a + b + c + d$ là tổng số mẫu xét nghiệm.

Hệ số Kappa (κ) được sử dụng để định lượng mức độ phù hợp chẩn đoán giữa hai cặp mẫu sau khi hiệu chỉnh ảnh hưởng của sự trùng hợp do ngẫu nhiên, tính theo công thức:

$$\kappa = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e}$$

$$\text{Với: } P_0 = \frac{a + d}{N};$$

$$P_e = \frac{(a + b)(a + c) + (c + d)(b + d)}{N^2}.$$

Giá trị κ được diễn giải theo thang Landis-Koch: < 0,00 (không phù hợp), 0,00-0,20 (phù hợp kém), 0,21-0,40 (phù hợp thấp), 0,41-0,60 (phù hợp trung bình), 0,61-0,80 (phù hợp cao) và 0,81-1,00 (phù hợp rất cao) (Landis & Koch, 1977).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

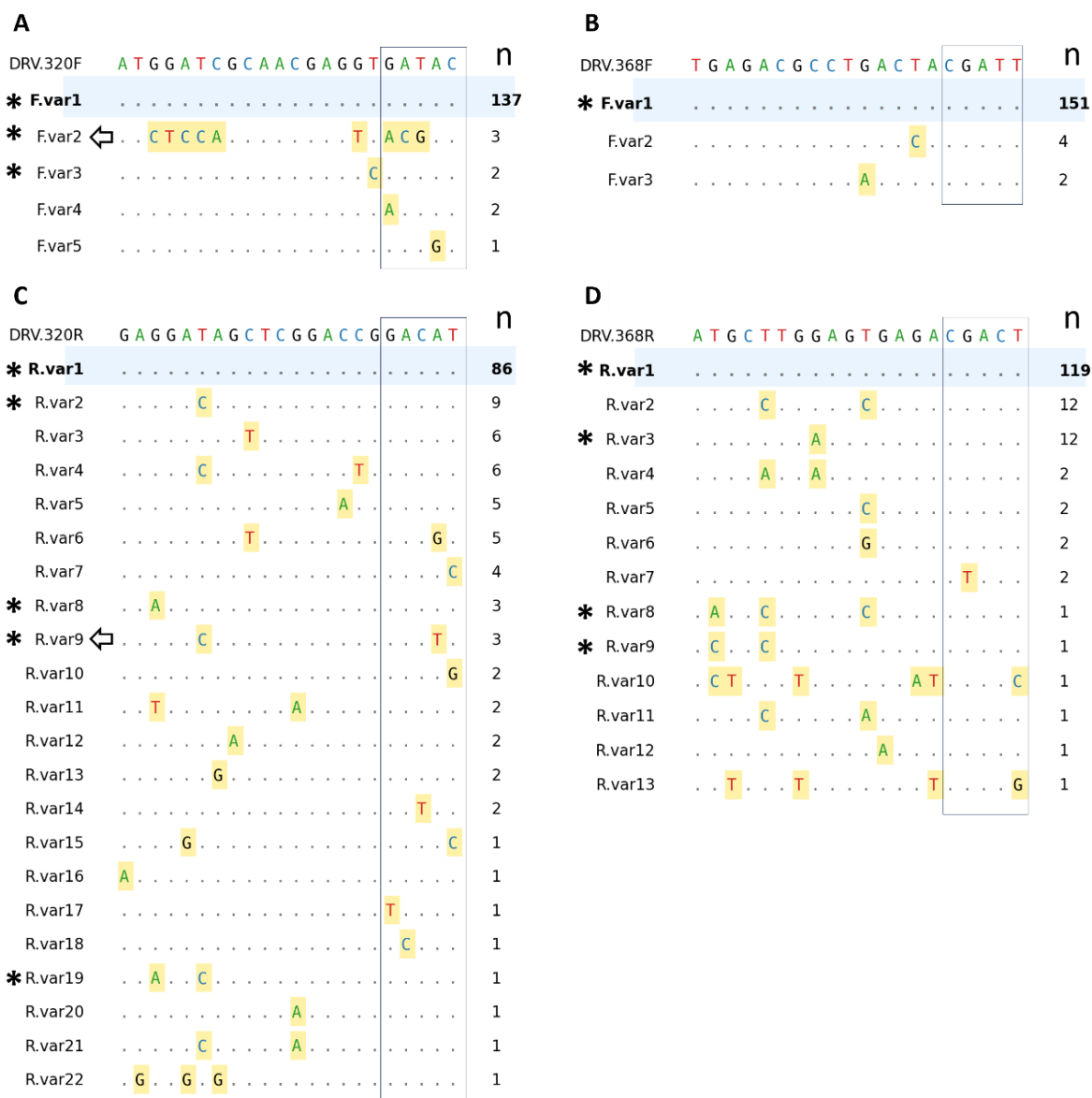
3.1. Kết quả phân tích tin sinh học

3.1.1. Sự phù hợp trình tự môi và gen đích

Kết quả so sánh sự phù hợp với gen đích sigma C lần lượt được trình bày cho các cặp mẫu DRV.320F/320R và DRV.368F/368R (Hình 1). Mỗi DRV.320F phù hợp hoàn toàn với 94,5% (137/145) trình tự gen sigma C. Ngược lại, mỗi DRV.320R chỉ phù hợp hoàn toàn với 59,3%

(86/145) trình tự. Đáng chú ý, các biến thể nằm trong phạm vi 5 nucleotide ở đầu 3' (vùng quyết định hiệu quả khuếch đại) xuất hiện ở 4,1% (6/145) trình tự đối với DRV.320F và 13,1% (19/145) trình tự đối với DRV.320R. Trình tự WRV Việt Nam mang sai khác ở đầu 3' (đánh dấu mũi tên, Hình 1A-1C) ghi nhận có 3/145 trường hợp với mỗi DRV.320F và DRV.320R.

Đối với cặp DRV.368, mỗi DRV.368F cho mức độ bảo tồn cao, phù hợp hoàn toàn với 96,2% (151/157) trình tự gen sigma C. Không có biến thể trong phạm vi 5 nucleotide đầu 3' của mồi này. Mỗi DRV.368R phù hợp hoàn toàn với 75,8% (119/157) trình tự, và chỉ có 2,5% (4/157) trình tự mang biến thể trong vùng 3'-terminal. Riêng các trình tự Việt Nam (đánh dấu *, Hình 1B-1D) không ghi nhận trường hợp nào có sai khác trong khoảng 5 nucleotide của đầu 3'.



Ghi chú: So sánh với cặp mồi DRV.320F/320R (A-C) và DRV.368F/368R (B-D). Ký hiệu “var” biểu thị biến thể so với trình tự mồi. “n” là số lượng trình tự mang biến thể tương ứng. Các biến thể bao gồm trình tự WRV của Việt Nam được đánh dấu *, có sai khác ở đầu 3' được đánh dấu bằng mũi tên. 5 nucleotide ở đầu 3' của mồi được đóng khung. Dấu “.” biểu thị nucleotide giống với trình tự tham chiếu.

Hình 1. Sự phù hợp trình tự giữa mồi với vùng gắn trên gen đích

A: DRV.320F			ΔG	B: DRV.320R			ΔG
Hit				Hit			
1	5'	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	-5.19	1	5'	GAGGATAGCTCGGACCGGACAT	-9.75
		: : :				: :	
	3'	CATAGTGGAGCAACGCTAGGTA			3'	TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	
2	5'	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	-4.62	2	5'	GAGGATAGCTCGGACCGGACAT	-6.68
						: : : :	
	3'	CATAGTGGAGCAACGCTAGGTA			3'	TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	
3	5'	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	-3.61	3	5'	GAGGATAGCTCGGACCGGACAT	-6.34
		: :				: :	
	3'	CATAGTGGAGCAACGCTAGGTA			3'	TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	
4	5'	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	-3.61	4	5'	GAGGATAGCTCGGACCGGACAT	-3.61
		: : : : : : : :				: : : :	
	3'	CATAGTGGAGCAACGCTAGGTA			3'	TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	
5	5'	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	-3.14	5	5'	GAGGATAGCTCGGACCGGACAT	-3.17
		: :				: : :	
	3'	CATAGTGGAGCAACGCTAGGTA			3'	TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	
6	5'	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	-1.95	6	5'	GAGGATAGCTCGGACCGGACAT	-3.07
		: :				: : : :	
	3'	CATAGTGGAGCAACGCTAGGTA			3'	TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	
7	5'	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	-1.95	7	5'	GAGGATAGCTCGGACCGGACAT	-1.57
		: : : : :				: : :	
	3'	CATAGTGGAGCAACGCTAGGTA			3'	TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	
8	5'	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	-1.47	8	5'	GAGGATAGCTCGGACCGGACAT	-1.57
						: : : : : : :	
	3'	CATAGTGGAGCAACGCTAGGTA			3'	TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	
9	5'	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	-1.47	9	5'	GAGGATAGCTCGGACCGGACAT	-1.57
		: :				: : : : :	
	3'	CATAGTGGAGCAACGCTAGGTA			3'	TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	
10	5'	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	-1.47	10	5'	GAGGATAGCTCGGACCGGACAT	-1.47
		: :					
	3'	CATAGTGGAGCAACGCTAGGTA			3'	TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	
11	5'	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	-1.47	11	5'	GAGGATAGCTCGGACCGGACAT	-1.47
						: : : : : :	
	3'	CATAGTGGAGCAACGCTAGGTA			3'	TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	
12	5'	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	-1.34	12	5'	GAGGATAGCTCGGACCGGACAT	-1.47
		: :					
	3'	CATAGTGGAGCAACGCTAGGTA			3'	TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	
13	5'	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	-1.34	13	5'	GAGGATAGCTCGGACCGGACAT	-0.96
		: :				: :	
	3'	CATAGTGGAGCAACGCTAGGTA			3'	TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	
14	5'	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	-0.96				
	3'	CATAGTGGAGCAACGCTAGGTA					

C: DRV.368F			ΔG	D: DRV.368R			ΔG
Hit				Hit			
1	5'	TGAGACGCCTGACTACGATT	-3.61	1	5'	TGAGACGCCTGACTACGATT	-3.61
		: : : : : :				: : : : : :	
	3'	TTAGCATCAGTCCGCAGAGT			3'	TTAGCATCAGTCCGCAGAGT	
2	5'	TGAGACGCCTGACTACGATT	-3.61	2	5'	TGAGACGCCTGACTACGATT	-3.14
		: : : :				: : : :	
	3'	TTAGCATCAGTCCGCAGAGT			3'	TTAGCATCAGTCCGCAGAGT	
3	5'	TGAGACGCCTGACTACGATT	-3.61	3	5'	TGAGACGCCTGACTACGATT	-2.94
	3'	TTAGCATCAGTCCGCAGAGT			3'	TTAGCATCAGTCCGCAGAGT	
4	5'	TGAGACGCCTGACTACGATT	-3.14	4	5'	TGAGACGCCTGACTACGATT	-1.60
		: : : :				: : : :	
	3'	TTAGCATCAGTCCGCAGAGT			3'	TTAGCATCAGTCCGCAGAGT	
5	5'	TGAGACGCCTGACTACGATT	-1.60	5	5'	TGAGACGCCTGACTACGATT	-1.60
		: : : :				: : : :	
	3'	TTAGCATCAGTCCGCAGAGT			3'	TTAGCATCAGTCCGCAGAGT	
6	5'	TGAGACGCCTGACTACGATT	-1.47	6	5'	TGAGACGCCTGACTACGATT	-1.47
	3'	TTAGCATCAGTCCGCAGAGT			3'	TTAGCATCAGTCCGCAGAGT	
7	5'	TGAGACGCCTGACTACGATT	-0.96	7	5'	TGAGACGCCTGACTACGATT	-1.34
	3'	TTAGCATCAGTCCGCAGAGT			3'	TTAGCATCAGTCCGCAGAGT	

Ghi chú: Các cặp base bổ sung được biểu thị bằng ‘|’ (đoạn bổ sung liên tục dài nhất) và ‘:’ (bổ sung phụ). Chỉ các cặp ‘|’ được dùng tính ΔG. Mũi tên chỉ các trường hợp có khả năng kéo dài bởi DNA polymerase từ đầu 3’.

Hình 2. Cấu trúc thứ cấp do tự bắt cặp giữa mỗi xuôi hoặc ngược của cặp mỗi

Tổng thể, ở cả hai cặp môi, mỗi xuôi bảo tồn tốt hơn mỗi ngược, với mức độ chênh lệch đặc biệt rõ ở cặp DRV.320. Cặp DRV.368 có ưu thế về độ phù hợp trình tự ở cả mỗi xuôi và ngược. Phù hợp với nhận định này, 17,2%

(25/145) trình tự được dự đoán có thể bị ảnh hưởng hiệu quả khuếch đại PCR khi sử dụng cặp DRV.320F/320R, trong khi tỷ lệ tương ứng đối với cặp DRV.368F/368R chỉ là 2,5% (4/157).

3.1.2. Sự hình thành cấu trúc thứ cấp của mồi

Hình 2 trình bày kết quả hình thành cấu trúc thứ cấp do tự bắt cặp giữa mồi xuôi hoặc giữa mồi ngược (homo-dimer). Kết quả phân tích homo-dimer cho thấy sự khác biệt rõ giữa các mồi DRV.320 và DRV.368. DRV.320F chỉ tạo các dimer yếu (ΔG -0,96 đến -5,19 kcal/mol). Ngược lại, DRV.320R xuất hiện 3 cấu hình ổn định hơn, vượt ngưỡng bất lợi ($\Delta G < -6$ kcal/mol; hit 1-3). Về nguyên cơ kéo dài bởi DNA polymerase tại đầu 3', ghi nhận một cấu hình có bổ sung 3' ở DRV.320F (hit 13) và hai cấu hình ở DRV.320R (hit 11-12). Ở nhóm DRV.368, cả DRV.368F và DRV.368R đều chỉ tạo homo-dimer yếu ($\Delta G \geq -3,61$ kcal/mol) và không ghi nhận bổ sung tại đầu 3'.

Cấu trúc thứ cấp dạng hetero-dimer giữa mồi xuôi và mồi ngược được trình bày ở hình 3. Kết quả phân tích cho thấy đa số các tương tác bổ sung đều yếu và ngắn. Các cấu hình hetero-dimer chủ yếu gồm các đoạn bổ sung liên tục rất ngắn (2-4bp; ký hiệu |), kèm theo một số bổ sung phụ rải rác (ký hiệu :), với giá trị ΔG dao động từ -1,34 đến -6,78 kcal/mol (với cặp mồi DRV.320F/320R), và từ -1,34 đến -3,61 kcal/mol (với cặp mồi DRV.368F/368R). Cấu hình ổn định nhất quan sát được ở hit 1 của mồi DRV.320: có đoạn bổ sung liên tục 4bp và $\Delta G = -6,78$ kcal/mol. Các cấu hình còn lại đều có $\Delta G \geq -4,41$ kcal/mol, cho thấy xu hướng bắt cặp giữa hai mồi là yếu.

Về nguyên cơ hình thành primer-dimer có khả năng được DNA polymerase kéo dài tại đầu 3', chỉ một số ít cấu hình (hit 14-16 của cặp mồi DRV.320F/320R) tạo được sắp xếp đầu 3'. Tuy nhiên, ngay cả trong các trường hợp này, đoạn bổ sung liên tục tại vùng 3' chỉ gồm 2bp với ΔG khoảng -1,34 đến -1,47 kcal/mol, cho thấy khả năng hình thành primer-dimer có thể kéo dài là rất thấp. Với cặp mồi DRV.368F/368R, không ghi nhận cấu hình nào vừa có đoạn bổ sung liên tục dài vừa neo tại đầu 3', và tất cả các ΔG đều $\geq -3,61$ kcal/mol, củng cố nhận định rằng nguy cơ primer-dimer chức năng là không đáng kể.

So sánh giữa hai cặp mồi cho thấy DRV.320F/320R có xu hướng hình thành dimer

ổn định hơn và xuất hiện các cấu hình bất lợi tiềm năng nhiều hơn so với DRV.368F/368R. Cụ thể, chỉ ở DRV.320F/320R mới ghi nhận cấu hình có $\Delta G < -6$ kcal/mol và các sắp xếp bổ sung tại đầu 3', trong khi DRV.368F/368R không có cấu hình nào vừa có ΔG âm sâu vừa neo 3'.

3.1.3. Tính đặc hiệu của mồi và sản phẩm khuếch đại

Tính đặc hiệu của các cặp mồi và sản phẩm RT-PCR tương ứng được đánh giá ở cả mức thiết kế và thực nghiệm (Hình 4). Phân tích BLASTn của trình tự mồi cho thấy tất cả mồi xuôi và ngược của hai mồi DRV.320 và DRV.368 đều khớp đặc hiệu với các trình tự sigma C của WRV trong cơ sở dữ liệu GenBank, với độ bao phủ truy vấn 100% và độ tương đồng 100% (Hình 4A-4B). Điều này phù hợp với kết quả Primer-BLAST, không ghi nhận sản phẩm khuếch đại dự đoán trên các khuôn ngoài WRV.

Về kết quả phân tích với các sản phẩm khuếch đại, giản đồ giải trình tự thu được thể hiện tín hiệu đỉnh đơn rõ và không có chồng lấp (Hình 4C-4D). Trình tự lắp ráp sau đó cho kết quả BLASTn khớp đặc hiệu với các trình tự WRV sigma C trong GenBank, không ghi nhận tương đồng với các vi sinh vật khác. Những kết quả này xác nhận rằng cả hai cặp mồi DRV.320F/320R và DRV.368F/368R đều khuếch đại đặc hiệu vùng gen sigma C của WRV.

3.2. Kết quả đánh giá thực nghiệm

3.2.1. Điều kiện tối ưu và độ nhạy của phản ứng

Kết quả khảo sát điều kiện làm hoạt động của phản ứng RT-PCR với hai bộ mồi được trình bày ở hình 5. Trong khảo sát ma trận nồng độ mồi 10-1,25 pmol/μl (Hình 5A-5B), cặp DRV.368F/368R duy trì tín hiệu khuếch đại ổn định ở hầu hết các tổ hợp, đặc biệt khi mồi ngược ở mức 5-10 pmol/μl. Ngược lại, cặp DRV.320F/320R cho tín hiệu giảm rõ khi nồng độ mồi xuôi đạt 10 pmol/μl, và chỉ cho khuếch đại rõ khi mồi xuôi trong khoảng 1,25-5 pmol/μl. Trong khảo sát nhiệt độ gắn mồi (T_a) 50-60°C (Hình 5C-5D), DRV.320F/320R biểu hiện sự phụ thuộc vào T_a , với cường độ vạch tăng dần

khi nhiệt độ tăng và mạnh nhất ở khoảng 60°C. Trong khi đó, cặp mỗi DRV.368F/ 368R cho tín hiệu khuếch đại rõ và ổn định trên toàn bộ dải

nhiệt độ. Như vậy, điều kiện tối ưu chung được xác định cho cả hai cặp mỗi là: Ta 60°C và nồng độ mỗi 5 pmol/μl (xuôi và ngược).

DRV.320F/320R			DRV.368F/368R		
Hit		ΔG	Hit		ΔG
1	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-6.78	1	5' TGAGACGCCTGACTACGATT : : : : : : : 3' TCAGCAGAGTGAGGTTTCGTA	-3.61
2	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-4.41	2	5' TGAGACGCCTGACTACGATT : : : 3' TCAGCAGAGTGAGGTTTCGTA	-3.61
3	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-3.61	3	5' TGAGACGCCTGACTACGATT : : : : 3' TCAGCAGAGTGAGGTTTCGTA	-3.14
4	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-3.61	4	5' TGAGACGCCTGACTACGATT : : : : 3' TCAGCAGAGTGAGGTTTCGTA	-3.07
5	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-3.43	5	5' TGAGACGCCTGACTACGATT : : : : 3' TCAGCAGAGTGAGGTTTCGTA	-1.60
6	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-3.14	6	5' TGAGACGCCTGACTACGATT : : : : 3' TCAGCAGAGTGAGGTTTCGTA	-1.60
7	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-3.05	7	5' TGAGACGCCTGACTACGATT : : : : 3' TCAGCAGAGTGAGGTTTCGTA	-1.60
8	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-1.95	8	5' TGAGACGCCTGACTACGATT : : : : 3' TCAGCAGAGTGAGGTTTCGTA	-1.47
9	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-1.57	9	5' TGAGACGCCTGACTACGATT : : : : 3' TCAGCAGAGTGAGGTTTCGTA	-1.34
10	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-1.57			
11	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-1.57			
12	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-1.57			
13	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-1.47			
14	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-1.47			
15	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-1.47			
16	5' ATGGATCGCAACGAGGTGATAC : : : : 3' TACAGGCCAGGCTCGATAGGAG	-1.34			

Ghi chú: Các cặp base bổ sung được biểu thị bằng '|' (đoạn bổ sung liên tục dài nhất) và ':' (bổ sung phụ). Chỉ các cặp '|' được dùng tính ΔG. Mũi tên chỉ các trường hợp có khả năng kéo dài bởi DNA polymerase từ đầu 3'.

Hình 3. Cấu trúc thứ cấp do bắt cặp giữa mỗi xuôi với ngược của cặp mỗi

A

Description	Query Cover	E value	Per. Ident
Duck reovirus strain NDRV-HeB202506 sigma C gene complete cds	100%	0.11	100.00%
Avian orthoreovirus strain ARV-JSJD-2020 sigma C protein gene complete cds	100%	0.11	100.00%
Duck reovirus strain NDRV-AH240605 sigma C gene complete cds	100%	0.11	100.00%
Goose orthoreovirus strain 03G segment S1 complete sequence	100%	0.11	100.00%
Duck reovirus strain NDRV-SD-IN20250805 sigma C gene complete cds	100%	0.11	100.00%
Goose reovirus strain YY10G cell attachment protein sigma C gene complete cds	100%	0.11	100.00%
Duck reovirus strain NDRV-ZSS-FJ20 segment S1 P10, P18, and sigma C genes complete cds	100%	0.11	100.00%
Duck reovirus strain JY13-1 cell attachment protein sigma C gene complete cds	100%	0.11	100.00%
Goose reovirus strain 03G cell attachment protein sigma C gene complete cds	100%	0.11	100.00%

B

Description	Query Cover	E value	Per. Ident
Duck reovirus strain NDRV-HeB202506 sigma C gene complete cds	100%	1.8	100.00%
Avian orthoreovirus strain ARV-JSJD-2020 sigma C protein gene complete cds	100%	1.8	100.00%
Goose orthoreovirus strain 03G segment S1 complete sequence	100%	1.8	100.00%
Duck reovirus strain NDRV-SD-IN20250805 sigma C gene complete cds	100%	1.8	100.00%
Goose reovirus strain YY10G cell attachment protein sigma C gene complete cds	100%	1.8	100.00%
Duck reovirus strain NDRV-ZSS-FJ20 segment S1 P10, P18, and sigma C genes complete cds	100%	1.8	100.00%
Duck reovirus strain JY13-1 cell attachment protein sigma C gene complete cds	100%	1.8	100.00%
Goose reovirus strain 03G cell attachment protein sigma C gene complete cds	100%	1.8	100.00%
Duck reovirus strain NDRV-HD22 segment S1 complete sequence	100%	1.8	100.00%

C

D

Hình 5. Tối ưu điều kiện và xác định độ nhạy của phản ứng RT-PCR

Bảng 3. So sánh kết quả chẩn đoán giữa hai cặp mồi RT-PCR

		Mồi DRV.368F/368R		Tổng
		Dương tính	Âm tính	
Mồi DRV.320F/320R	Dương tính	15	6	21
	Âm tính	16	19	35
Tổng		31	25	56

Với các điều kiện này, kết quả đánh giá độ nhạy (Hình 5E-5F) cho thấy sự khác biệt về giới hạn phát hiện giữa hai cặp mồi. Cặp DRV.368F/DRV.368R phát hiện WRV đến độ pha loãng 10^{-7} ($\approx 4,07 \times 10^1$ bản sao/ μ l). Trong khi cặp DRV.320F/DRV.320R chỉ phát hiện đến 10^{-6} ($\approx 4,07 \times 10^2$ bản sao/ μ l). Như vậy, DRV.368F/368R phát hiện được WRV ở nồng độ thấp hơn một bậc $\log_{10}$ so với DRV.320F/320R.

3.2.2. Mức độ phù hợp chẩn đoán giữa hai cặp mồi

Mức độ phù hợp giữa hai cặp mồi DRV.320F/320R và DRV.368F/368R được đánh giá trên 56 mẫu và được tóm tắt ở bảng 3.

Tỷ lệ phù hợp chung đạt 60,7% (34/56). Trong số các mẫu khảo sát, 31/56 (55,4%) dương tính với mồi DRV.368F/368R, trong khi 21/56 (37,5%) dương tính với mồi DRV.320F/320R. Khi so sánh tương đối với mồi DRV.368F/368R, mồi DRV.320F/320R có tỷ lệ đồng thuận dương 71,4% (15/21) và đồng thuận âm 54,3% (19/35). Tổng cộng có 22/56 (39,3%) trường hợp không phù hợp giữa hai xét nghiệm, chủ yếu theo hướng xét nghiệm bằng DRV.320F/320R âm tính trong khi xét nghiệm bằng DRV.368F/368R dương tính. Hệ số Kappa giữa hai cặp mồi là 0,23, tương ứng mức phù hợp thấp.

4. THẢO LUẬN

Nghiên cứu này nhằm đánh giá toàn diện hai cặp mồi RT-PCR phát hiện gen sigma C của WRV. Các kết quả thu được cho thấy sự khác biệt nhất quán giữa hai cặp mồi DRV.320 và DRV.368 ở cả phân tích tin sinh học và thực nghiệm. Ở mức trình tự, cặp DRV.368 thể hiện mức độ bảo tồn cao hơn so với DRV.320, đặc biệt

tại vùng đầu 3' của mồi (vị trí quyết định hiệu quả kéo dài của DNA polymerase). Mồi DRV.320R ghi nhận tỷ lệ sai khác tại 3'-terminal cao hơn so với DRV.368R, trong khi DRV.368F không ghi nhận sai khác tại vùng 3'. Đáng chú ý, các sai khác của DRV.320R bao gồm cả các trình tự WRV phân lập tại Việt Nam, trong khi các sai khác của DRV.368R trên các trình tự Việt Nam chủ yếu nằm ngoài vùng 3'. Điều này gợi ý cặp DRV.368 có khả năng duy trì hiệu quả khuếch đại trên các biến chủng WRV lưu hành tại Việt Nam tốt hơn so với DRV.320. Nhận định này phù hợp với các nghiên cứu cho thấy sai khác tại đầu 3' của mồi có thể làm giảm hiệu quả khuếch đại PCR (Stadhouders & cs., 2010). Do tần suất sai khác tại đầu 3' được ghi nhận cao ở mồi DRV.320R, bao gồm cả trên các trình tự WRV phân lập tại Việt Nam, việc sử dụng các primer suy biến (degenerate primer) tại các vị trí quan trọng có thể được xem xét nhằm cải thiện khả năng bắt cặp giữa mồi và sợi khuôn.

Phân tích cấu trúc thứ cấp cung cấp cơ sở giải thích ở mức tương tác mồi. Ở mức homo-dimer, DRV.320R xuất hiện các cấu hình ổn định và có bổ sung tại đầu 3', trong khi các mồi DRV.368 không ghi nhận đặc điểm này. Ở mức hetero-dimer, cặp DRV.320F/320R cũng ghi nhận một cấu hình có $\Delta G < -6$ kcal/mol và một số sắp xếp bổ sung tại đầu 3', trong khi DRV.368F/368R không xuất hiện các cấu hình đồng thời có độ ổn định cao và neo tại 3'. Các đặc điểm này cho thấy DRV.320, đặc biệt là mồi ngược, có xu hướng tham gia các tương tác mồi - mồi bất lợi hơn so với DRV.368. Các đặc điểm trình tự và cấu trúc mồi nêu trên phù hợp với kết quả thực nghiệm của phản ứng RT-PCR. Cặp DRV.368F/368R duy trì tín hiệu

khuếch đại rõ và ổn định trên dải nhiệt độ gần môi và nồng độ môi rộng hơn, trong khi DRV.320F/320R phụ thuộc rõ vào điều kiện phản ứng, đặc biệt là nồng độ môi xuôi. Sự giảm tín hiệu khi nồng độ môi xuôi của DRV.320F/320R đạt 10 pmol/μl và chỉ khuếch đại tốt trong khoảng 1,25-5 pmol/μl cho thấy hiệu quả phản ứng dùng môi DRV.320 nhạy với cân bằng nồng độ giữa hai môi. Do DRV.320R có xu hướng tạo cấu trúc thứ cấp bất lợi, tăng nồng độ môi xuôi có thể làm lệch cân bằng tối ưu F:R của phản ứng, dẫn đến giảm hiệu quả khuếch đại. Để khắc phục được.

Sự khác biệt về khả năng phát hiện giữa hai cặp môi phản ánh rõ trong khảo sát mẫu thực địa, khi DRV.368F/368R phát hiện tỷ lệ mẫu dương tính cao hơn và phần lớn trường hợp không phù hợp theo hướng xét nghiệm bằng môi DRV.368 dương tính trong khi DRV.320 âm tính. Trong bối cảnh không có xét nghiệm tham chiếu độc lập, sự bất đồng này nhiều khả năng phản ánh khác biệt về mức độ phù hợp trình tự với các biến chủng WRV lưu hành, phù hợp với phân tích cho thấy DRV.320R có tỷ lệ sai khác 3' cao hơn và bao gồm các trình tự Việt Nam, trong khi sai khác của DRV.368R chủ yếu nằm ngoài vùng 3'. Bên cạnh đó, các đặc điểm cấu trúc thứ cấp bất lợi hơn của DRV.320, đặc biệt ở môi ngược, có thể làm giảm hiệu quả khuếch đại trong điều kiện phản ứng khảo sát. Do tính đặc hiệu của cả hai cặp môi đã được xác nhận ở mức thiết kế và kết quả giải trình tự, khả năng dương tính giả là ít khả dĩ để giải thích sự khác biệt quan sát được. Tổng hợp các bằng chứng này cho thấy DRV.368F/368R phù hợp hơn so với DRV.320F/320R trong phát hiện WRV ở điều kiện nghiên cứu hiện tại.

5. KẾT LUẬN

Các kết quả của nghiên cứu này cho thấy khác biệt về trình tự và cấu trúc giữa hai cặp môi liên quan trực tiếp đến khả năng phát hiện WRV thực địa, nhấn mạnh sự cần thiết của phân tích môi trong xét nghiệm PCR. Các kết quả cho thấy DRV.368F/368R là cặp môi phù hợp hơn cho phát hiện WRV bằng RT-PCR.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cao Y., Sun M., Wang J., Hu X., He W. & Su J. (2019). Phenotypic and genetic characterisation of an emerging reovirus from Pekin ducks in China. *Sci Rep.* 9(1): 7784.
- Đặng Hữu Anh, Nguyễn Văn Giáp & Huỳnh Thị Mỹ Lệ (2020). Một số kết quả nghiên cứu bước đầu về Tembusu virus trên địa bàn Hà Nội. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y.* 27(1): 22-28.
- Day J.M. (2009). The diversity of the orthoreoviruses: molecular taxonomy and phylogenetic divides. *Infect Genet Evol.* 9(4): 390-400.
- Hall T.A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 41: 95-98.
- Heffels-Redmann U., Muller H. & Kaleta E.F. (1992). Structural and biological characteristics of reoviruses isolated from Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Avian Pathol.* 21(3): 481-91.
- Huang C., Huang Y., Liu Z., Li J., Han J., Liu Y., Liu J., Chen H. & Chen Z. (2023). Isolation and characterization of a duck reovirus strain from mature ducks in China. *Poult Sci.* 102(2): 102345.
- Huang K., Zhang J., Li J., Qiu H., Wei L., Yang Y. & Wang C. (2024). Exploring the Impact of Primer-Template Mismatches on PCR Performance of DNA Polymerases Varying in Proofreading Activity. *Genes (Basel).* 15(2).
- Huang Q., Yang F., Yu J., Wei W. & Wu S. (2026). Novel duck reovirus: A comprehensive review of molecular pathogenesis and advances in diagnosis and vaccination. *Poult Sci.* 105(4): 106468.
- Jiang C., Lei D., Xu B., Wang Z., Fang R., Tang Y. & Wang H. (2025). High-efficient molecular detection system termed RAA-based CRISPR-Cas13a for novel duck orthoreovirus. *Poultry Science.* 104(8): 105327.
- Katoh K., Rozewicki J. & Yamada K.D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics.* 20(4): 1160-1166.
- Landis J.R. & Koch G.G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33(1): 159-74.
- Liu H.J., Lee L.H., Hsu H.W., Kuo L.C. & Liao M.H. (2003). Molecular evolution of avian reovirus: evidence for genetic diversity and reassortment of the S-class genome segments and multiple cocirculating lineages. *Virology.* 314(1): 336-349.
- Matthijns J., Attoui H., Banyai K., Brussaard C.P.D., Danthi P., Del Vas M., Dermody T.S., Duncan R., Fang Q., John R., Mertens P.P.C.,

- Mohd Jaafar F., Patton J.T., Sasaya T., Suzuki N. & Wei T. (2022). ICTV Virus Taxonomy Profile: Spinareoviridae 2022. *J Gen Virol.* 103(11).
- Meagher R.J., Priye A., Light Y.K., Huang C. & Wang E. (2018). Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA. *Analyst.* 143(8): 1924-1933.
- Nguyễn Văn Giáp, Đặng Hữu Anh, Cao Thị Bích Phượng, Nguyễn Thị Bích, Nguyễn Hữu Huân & Huỳnh Thị Mỹ Lệ (2019). Kết quả bước đầu phát hiện parvovirus gây bệnh ở vịt tại Hưng Yên năm 2019. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.* 17(10): 816-825.
- Nhan P., Chien N.T.P., Ngu N.T., Nhu T.Q. & Khanh N.P. (2025). Whole-genome characterization and evolutionary analysis of a novel duck reovirus isolated from *Cairina moschata* in Vietnam. *Vet World.* 18(12): 4172-4183.
- Niu X., Zhang B., Yu X., Zhang X., Dou Y., Tang Y. & Diao Y. (2017). Preparation and evaluation of goose reovirus inactivated vaccine. *BMC Vet Res.* 13(1): 214.
- Qiu Q., Hu R., Liu Z., Yan L., Dai X., Xing C., Yang F. & Cao H. (2025). Taqman-probe-based multiplex real-time RT-QPCR for simultaneous detection of duck tembusu virus, novel duck reovirus, duck hepatitis a type 1 virus and duck hepatitis a type 3 virus. *Poult Sci.* 104(10): 105508.
- Stadhouders R., Pas S.D., Anber J., Voermans J., Mes T.H. & Schutten M. (2010). The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J Mol Diagn.* 12(1): 109-17.
- Tran G.T.H., Mai N.T., Bui V.N., Dao T.D., Trinh D.Q., Vu T.T.T., Le V.P. & Van Dong H. (2022). Duck circovirus in northern Vietnam: genetic characterization and epidemiological analysis. *Archives of Virology.* 167(9): 1871-1877.
- Varga-Kugler R., Marton S., Thuma A., Szentpali-Gavaller K., Balint A. & Banyai K. (2022). Candidate 'Avian orthoreovirus B': An emerging waterfowl pathogen in Europe and Asia? *Transbound Emerg Dis.* 69(5): e3386-e3392.
- Vasserman Y., Eliahoo D., Hemsani E., Kass N., Ayali G., Pokamunski S. & Pitcovskiad J. (2004). The influence of reovirus sigma C protein diversity on vaccination efficiency. *Avian Dis.* 48(2): 271-8.
- Vu T.N., Le V.T., Cao T.B.P., Nguyen V.G. & Huynh T.M.L. (2025). Novel Reoviruses of Waterfowl Origin in Northern Vietnam: A Laboratory Investigation. *Microbiology Research.* 16.
- Wang D., Shi J., Yuan Y., Zheng L. & Zhang D. (2013). Complete sequence of a reovirus associated with necrotic focus formation in the liver and spleen of Muscovy ducklings. *Vet Microbiol.* 166(1-2): 109-22.
- Yun T., Yu B., Ni Z., Ye W., Chen L., Hua J. & Zhang C. (2014). Genomic characteristics of a novel reovirus from Muscovy duckling in China, *Vet Microbiol.* 168(2-4): 261-71.
- Zhang Y., Liu M., Shuidong O., Hu Q.L., Guo D.C., Chen H.Y. & Han Z. (2006). Detection and identification of avian, duck, and goose reoviruses by RT-PCR: goose and duck reoviruses are part of the same genogroup in the genus Orthoreovirus. *Archives of Virology.* 151(8): 1525-1538.