Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Tập 24, Số đặc biệt 1, 2026: 107-118 https://doi.org/10.31817/tckhnnvn.2026.24.SP01.12
vie.vjas.vn

ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA CHỦNG DUCK ADENOVIRUS TYPE 3 (VNUA-DAdV-3-1) PHÂN LẬP TỪ VỊT BỆNH TẠI BẮC NINH, VIỆT NAM

Trương Quang Lâm[1*], Nguyễn Anh Tuấn[2], Đào Lê Anh[1], Nguyễn Thị Lan[1]

[1]Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
[2]Công ty Cổ phần Công nghệ sinh phẩm thú y VNUA

[*]Tác giả liên hệ: tqlam@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 07.04.2026 Ngày chấp nhận đăng: 02.10.2026

TÓM TẮT

Chủng duck adenovirus type 3 (DAdV-3-1), thuộc giống *Aviadenovirus*, là tác nhân gây bệnh quan trọng, gây thiệt hại kinh tế đáng kể đối với ngành chăn nuôi vịt tại Trung Quốc. Tuy nhiên, các nghiên cứu và thông tin về sự lưu hành của DAdV-3 trên đàn vịt tại Việt Nam còn hạn chế. Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và đánh giá đặc điểm sinh học phân tử chủng VNUA-DAdV-3-1 từ mẫu gộp gan, thận của vịt nghi mắc bệnh vào tháng 12 năm 2025 tại xã Mỹ An, tỉnh Bắc Ninh. Chủng virus VNUA-DAdV-3-1 được phân lập thành công trên tế bào xơ phôi vịt (DEF), với bệnh tích tế bào (CPE) xuất hiện sau 24 giờ gây nhiễm và các CPE rõ rệt ở thời điểm 48 và 72 giờ và biểu hiện CPE nặng nhất với hiện tượng tế bào tròn hóa, co rút, bong tách và phá hủy lan rộng lớp tế bào ở thời điểm 96h với hiệu giá virus đạt đỉnh với mức cao nhất là $1,36 \times 10^7$ $TCID_{50}$/ml. Kết quả PCR và real-time PCR xác định chủng phân lập thuộc DAdV-3. Phân tích trình tự gene *Hexon* cho thấy mức tương đồng hơn 99% với các chủng DAdV-3 công bố tại Trung Quốc giai đoạn 2015-2022. Theo hiểu biết của nhóm tác giả, đây là báo cáo ghi nhận phân lập và xác định sự lưu hành của DAdV-3 tại Việt Nam, cung cấp nền tảng dữ liệu khoa học cho giám sát dịch tễ và xây dựng giải pháp phòng, chống hiệu quả bệnh do Adenovirus type 3 trên đàn vịt.

Từ khoá: Adenovirus tuýp 3, phân lập, bệnh tích tế bào, hiệu giá virus, mối quan hệ di truyền.

Molecular Characterization of a Duck Adenovirus Type 3 (VNUA-DAdV3-1) Strain Isolated from a Diseased Duck in Bac Ninh province, Vietnam

ABSTRACT

Duck adenovirus type 3 (DAdV-3-1), a member of the *Aviadenovirus*, is an important pathogene causing significant economic losses to the duck industry in China. However, studies and information regarding the circulation of DAdV-3 in duck populations in Vietnam remain limited. This study was aimed to isolate and molecularly characterize a DAdV-3 strain, designated VNUA-DAdV3-1, from clinical samples collected from a diseased duck flock in December 2025 in My An, Bac Ninh province, Vietnam. The VNUA-DAdV3-1 strain was successfully isolated and propagated in duck embryo fibroblast (DEF) cells. Cytopathic effects (CPE) were first observed at 24h post-inoculation, became evident at 48 and 72h, and reached maximum severity at 96 h, characterized by cell rounding, shrinkage, detachment, and extensive destruction of the cell monolayer with the viral titer peaked at 1.36×10^7 $TCID_{50}$/ml. PCR and real-time PCR assays confirmed that the isolate belonged to DAdV-3. Sequence analysis of the *Hexon* gene revealed more than 99% nucleotide identity with DAdV-3 strains reported in China during 2015-2022. To our knowledge, this study represents the first documentation of DAdV-3 isolation and confirmation of its circulation in Vietnam. These findings provide essential baseline data for epidemiological surveillance and the development of effective control strategies against Duck adenovirus type 3 infection in duck populations.

Keywords: Duck adenovirus type 3, isolation, cytopathic effect, viral titer, phylogenetic analysis.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Adenovirus ở thủy cầm thuộc họ Adenoviridae là virus DNA sợi kép không vỏ, có capsid đối xứng khối 20 mặt và hệ gene tuyến tính khoảng 43-45kb, mã hóa các protein capsid chính gồm Hexon, Penton và Fiber tham gia cấu trúc virion, bám dính và xâm nhập tế bào, cùng

các protein không cấu trúc cần thiết cho sao chép DNA và lắp ráp hạt (Harrach & cs., 2011; ICTV, 2023). Ở vịt, adenovirus thuộc các chi *Atadenovirus* và *Aviadenovirus*, thể hiện sự đa dạng về kiểu gene, cơ quan đích và biểu hiện lâm sàng giữa các type (Marek & cs., 2014; ICTV, 2023).

Trong các adenovirus thuộc chi *Aviadenovirus* ở vịt, DAdV-3 gần đây nổi lên như một tác nhân gây bệnh quan trọng tại Trung Quốc (Shi & cs., 2019; Yin & cs., 2022). Bệnh chủ yếu ghi nhận ở vịt non, đặc biệt dưới 3 tuần tuổi, với tỷ lệ chết 35-100% trong một số ổ dịch; tổn thương điển hình tập trung ở gan và thận, gồm gan sưng, hoại tử/xuất huyết và thận sưng, xuất huyết, đôi khi kèm dịch màng tim hoặc tổn thương lách (Shi & cs., 2019; Yin & cs., 2022; Shao & cs., 2022; Shi & cs., 2022). Những đặc điểm này cho thấy tính mẫn cảm theo lứa tuổi và định hướng gan, thận là cơ quan ưu tiên lấy mẫu chẩn đoán.

Các nghiên cứu gần đây tại Trung Quốc đã phân lập thành công DAdV-3 từ gan và thận vịt bệnh, nuôi cấy trên tế bào DEF và xác nhận bằng PCR/Real-time PCR và giải trình tự gene mục tiêu Hexon và Fiber để định type và phân tích quan hệ di truyền (Shi & cs., 2019; Shao & cs., 2022). Hexon là protein capsid chính, chứa các vùng biến thiên có giá trị trong định type và phân tích quan hệ di truyền, trong khi các protein bề mặt như Fiber liên quan đến tương tác virus - vật chủ và có tiềm năng ứng dụng trong chẩn đoán, miễn dịch học (Marek & cs., 2014; Shao & cs., 2022). Sự xuất hiện của các biến thể DAdV-3 cho thấy cần duy trì giám sát dịch tễ học phân tử để phát hiện sớm các dòng virus lưu hành và biến đổi di truyền có ý nghĩa (Shi & cs., 2022).

Mặc dù ngành chăn nuôi vịt tại Việt Nam phát triển mạnh, đến nay chưa có công bố chính thức về sự hiện diện và đặc điểm sinh học phân tử của DAdV-3 trên đàn vịt trong nước. Trong bối cảnh DAdV-3 đã được ghi nhận lưu hành tại Trung Quốc và có nguy cơ lan truyền trong khu vực, việc xác định sự hiện diện của virus tại Việt Nam là cần thiết cho giám sát dịch tễ và kiểm soát bệnh. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập DAdV-3 từ vịt bệnh tại Bắc Ninh, đánh giá đặc điểm nhân lên và bệnh tích tế bào trên tế bào DEF, đồng thời giám định phân tử và phân tích quan hệ di truyền của chủng phân lập dựa trên gene Hexon.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Mẫu nghiên cứu: 4 bộ mẫu gan và thận của vịt nghi mắc bệnh tại trại chăn nuôi vịt thuộc xã Mỹ An, Bắc Ninh.

- Môi trường, hoá chất: DMEM (Gibco, Mỹ), FBS (Corning, Mỹ), kháng sinh cho nuôi cấy tế bào (Carnicorn, Đức), PBS (Gibco, Mỹ), trypsin (Carnicorn, Đức).

- Tế bào: tế bào xơ phôi vịt (DEF: duck embryo fibroblast)

- Địa điểm nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp 3, Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ sinh học thú y, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập mẫu bệnh phẩm

Theo thông tin được cung cấp tại trại chăn nuôi với quy mô nuôi đàn vịt hơn 5.000 con 15 ngày tuổi có tỷ lệ chết cao trên 30% thuộc xã Mỹ An, Bắc Ninh được chẩn đoán dương tính DAdV-3 bằng real-time PCR bởi công ty tập tập đoàn INVET vào tháng 12 năm 2025, nhóm nghiên cứu đã tiến hành mổ khám 4 vịt yếu và thu thập mẫu bệnh phẩm gồm gan, thận phục vụ nghiên cứu theo TCVN 8402:2010 và QCVN 01-83:2011/BNNPTNT. Mẫu bệnh phẩm được đựng trong lọ đựng mẫu hoặc túi chuyên dụng, bảo quản lạnh trong thùng chuyển mẫu. Mẫu được vận chuyển về phòng thí nghiệm để xử lý phục vụ nghiên cứu chẩn đoán, phân lập virus.

2.2.2. Phân lập virus và xác định hiệu giá virus

Phương pháp phân lập virus DAdV-3 sử dụng tế bào xơ phôi vịt (DEF) được thực hiện như mô tả của các nghiên cứu trước đây (Chen & cs., 2017; Shi & cs., 2019; Shi & cs., 2022) với một số thay đổi. Mẫu được xử lý bằng cách nghiền trong dung dịch PBS vô trùng (pH 7,2-7,4), ly tâm

8.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C và lọc qua màng 0,45µm để loại bỏ vi khuẩn và tạp chất. Dịch lọc được sử dụng để gây nhiễm lên tế bào DEF nuôi cấy trong môi trường DMEM bổ sung 10% FBS và 1% kháng sinh antibiotic/antimycotic (Carnicorn, Đức). Sau khi gây nhiễm, tế bào được ủ ở 37°C trong điều kiện CO_2 5% và theo dõi bệnh tích tế bào (Cytopathic Effect - CPE) hàng ngày dưới kính hiển vi soi ngược. Khi CPE đạt trên 70%, bình tế bào được thu hoạch, đông - tan và ly tâm thu dịch chứa virus. Dịch virus được bảo quản ở -80°C sử dụng cho các đời cấy chuyển và phân tích tiếp theo. Hiệu giá virus được xác định theo phương pháp $TCID_{50}$ (50% Tissue Culture Infectious Dose) trên đĩa nuôi cấy tế bào DEF bằng phương pháp pha loãng cơ số 10 liên tiếp trên môi trường nuôi cấy tế bào, và gây nhiễm như mô tả ở trên, theo dõi bệnh tích tế bào ở thời điểm 72, 96, 120 giờ sau gây nhiễm, và tính toán $TCID_{50}$/ml theo công thức Reed và Muench (Reed & Muench, 1938).

2.2.3. Chiết tách DNA, real-time PCR và PCR

DNA của virus được chiết tách từ dịch thu sau gây nhiễm VNUA-DAdV-3-1 trên tế bào DEF bằng bộ Kít tách chiết DNA thương mại (PureLink genomic DNA, Invitrogene, Thermo Fisher Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng real-time PCR sử dụng cặp mồi và đoạn dò đặc hiệu cho gene *Hexon* được sử dụng để giám định chủng phân lập, theo quy trình đã được mô tả trong nghiên cứu của Wan & cs. (2018). Phản ứng real-time PCR được thực hiện sử dụng Kít thương mại Capital qPCR Green Master Mix (Biotechrabbit, Đức) sử dụng bộ mồi F DAdV-3, R DAdV-3 và probe DAdV-3 (Bảng 1) với các bước thực hiện và điều kiện chu trình real-time PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ngoài ra, phản ứng PCR được thực hiện nhằm khuếch đại đoạn gene *Hexon* và *Fiber-2* (Bảng 1) đặc hiệu cho DAdV-3, dựa trên trình tự mồi đã được công bố trước đó (Zhang *&* cs., 2024). Chu trình nhiệt bao gồm giai đoạn biến tính ban đầu ở 95°C trong 3 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ gồm 95°C trong 15 giây, 58°C trong 30 giây, và 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1% với thang chuẩn DNA 100 bp (Invitrogene, Mỹ) trong 30 phút, sau đó ảnh điện di được chụp bằng hệ thống Gel Doc (Bio-Rad, Mỹ). Đối chứng dương sử dụng cho phản ứng PCR và real-time PCR là mẫu DNA dương tính với DAdV-3 từ đàn vịt nghi mắc bệnh từ Công ty cổ phần INVET, đã được xác nhận dương tính bằng phương pháp real-time PCR đặc hiệu gene Hexon sử dụng quy trình nội bộ (giá trị Ct < 39), và được bảo quản ở -20°C theo đúng yêu cầu kỹ thuật.

Để đánh giá độ thuần khiết của chủng DAdV-3 phân lập, phương pháp real-time PCR đã được thực hiện sử dụng các cặp mồi và probe đặc hiệu nhằm phát hiện sự hiện diện của cúm gia cầm type A, viêm gan vịt type I (DHV-1), Duck parvovirus (DPV), Duck tembusu virus (DTMUV), Duck reovirus (DRV), Duck circovirus (DuCV), virus dịch tả vịt (Duck enteritis virus; DEV) (Bảng 1).

2.2.4. Giải trình tự đoạn gene và phân tích di truyền

Sản phẩm PCR đặc hiệu khuếch đại một phần gene Hexon của chủng virus VNUA-DAdV3-1 được tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch DNA và gửi giải trình tự theo phương pháp Sanger hai chiều tại Công ty TNHH Công nghệ sinh học Phù Sa (Hà Nội, Việt Nam). Trình tự nucleotide thu được được kiểm tra và lắp ráp bằng phần mềm BioEdit version 6.0 và so sánh với các trình tự tham chiếu trên GeneBank bằng công cụ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Phân tích mối quan hệ di truyền được thực hiện bằng phần mềm Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) phiên bản 11 sử dụng mô hình Maximum Likelihood với 1.000 lần bootstrap. Các trình tự tham chiếu từ ngân hàng GeneBank bao gồm các chủng DAdV-3 lưu hành tại Trung Quốc từ năm 2015-2022, cũng như các type DAdV-1, DAdV-2 và DAdV-4 đã được sử dụng để so sánh trình tự và xây dựng cây phát sinh loài.

2.2.5. Phân tích thống kê

Dữ liệu hiệu giá virus được xử lý và tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel và GraphPad Prism 6. Giá trị $TCID_{50}$ và giá trị Ct của real-time PCR được biểu thị dưới dạng trung bình (mean) ± độ lệch chuẩn (SD) của 2 lần lặp lại độc lập.

Bảng 1. Trình tự các mồi sử dụng trọng nghiên cứu

Tên mồi	Tên bệnh	Trình tự mồi (5'-3')	Tham khảo
Probe M11	Avian influenza type A	FAM- TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ-1	Spackman & cs. (2002)
Primer F M11		AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG	
Primer R M11		TGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTG	
Probe DHV	Duck virus hepatitis type I	FAM-TGTGTTCAGGATCCCCATGTACTACCGTG-TAMRA	Li & cs. (2022)
Primer F DHV		TGATGAGATATGGCAGGTAGAAGGA	
Primer R DHV		CACGCAAGTTGATTCACAATAGA	
Probe MDPV	Duck parvovirus	FAM- TGAACGAGCGAATGAGCCTTCC	Wan & cs. (2018)
Primer F MDPV		TACGAATGAACAAACCAA	
Primer R MDPV		CGCTCTTAATATCTCCTCTA	
Probe DRV	Duck reovirus	FAM-AACGCCTGTGCACGAGCTGAAC-TAMRA	Zhang & cs. (2020)
Primer F DRV		CCCGGATTCTTCGATGAATGGT	
Primer R DRV		CGACCCACTGCTGGATAACAAG	
Probe DTMUV	Duck tembusu virus	JOE-TTACCATGGACAGGGTCATCAGC-BHQ-2	Zhang & cs. (2020)
Primer F DTMUV		CAGAGACTGGTTTCATGA	
Primer R DTMUV		AAGCCACCACTGATTGTT	
Probe DVE	Duck virus enteritis	FAM- CCTCCTCCTCGCTGAGTGGCATCC-BHQ-1	Yang & cs. (2005)
Primer F DVE		CTCTACGCAGCTTTTGACGATTT	
Primer R DVE		AGAAACATACTGTGAGAGTGACGA	
Probe DuCV	Duck circovirus	FAM- TTCCCGAGTAACCGTCCCAC-BHQ-1	Zhang & cs. (2021)
Primer F DuCV		CCGAAAACAAGTATTACAAAC	
Primer R DuCV		GTACCCAACCATAAAAGTC	
Primer F	DAdV-3 *Hexon*	ATGGCCGCTCTGACCCCTGA	Zhang & cs. (2024)
Primer R		ATTCAGCCTTAGCTACTTTC	
Primer F	DAdV-3 *Fiber-2*	GCTTCGCGACTATTTCAACCA	
Primer R		GCCTTAACGACTGCGGTTTC	
Probe DAdV-3	Duck adenovirus type 3	FAM- TGTCTGCTCAGGTACGCTTAATTCT-Eclipse	Wan & cs. (2018)
Primer F DAdV-3		GACCRATCCTGTCACCTCTGAC	
Primer R DAdV-3		AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA	

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định virus trong mẫu bệnh phẩm và một số biến đổi bệnh lý đại thể

Chủng VNUA-DAdV3-1 được phân lập từ mẫu gan của đàn vịt 15 ngày tuổi tại Bắc Ninh, với tỷ lệ chết ghi nhận khoảng 30% và có nhiễm ghép *Riemerella anatipestifer* (RA). Về bệnh tích đại thể, đàn vịt bệnh khi tiến hành mổ khám tại trại và quan sát bệnh tích đại thể cho thấy gan sưng, có các đốm và dải xuất huyết điểm rải rác trên bề mặt, và thận sưng nhạt màu (Hình 1). Những tổn thương này phù hợp với mô tả điển hình của DAdV-3, trong đó gan và thận là hai cơ quan đích quan trọng của virus (Zhang & cs., 2016; Wang & cs., 2020, Shi & cs., 2022). Zhang & cs. (2016) khi mô tả chủng CH-GD-12-2014 đã ghi nhận hiện tượng gan sưng, xuất huyết lan tỏa và thận sưng rõ trên vịt Xiêm nhiễm tự nhiên. Tương tự, Shi & cs. (2022) cũng báo cáo biến thể DAdV-3 gây tổn thương gan-thận nghiêm trọng và có thể kèm dịch màng tim nhẹ trong mô hình gây nhiễm thực nghiệm. Độ tuổi vịt ghi nhận trong nghiên cứu này nằm trong khoảng mẫn cảm cao đã

được ghi nhận trong các ổ dịch DAdV-3 tại Trung Quốc, nơi bệnh chủ yếu xảy ra trên vịt con từ 1-3 tuần tuổi (Shi & cs., 2019; Yin & cs., 2022). Các nghiên cứu dịch tễ cho thấy DAdV-3 gây tỷ lệ mắc 40-55% và tỷ lệ chết dao động 35-43% trên vịt Xiêm, vịt Cherry tại nhiều tỉnh của Trung Quốc (Shi & cs., 2019).

3.2. Phân lập và đặc điểm sinh học của chủng VNUA-DAdV3-1

Chủng VNUA-DAdV3-1 đã được phân lập thành công từ mẫu gan của vịt nghi mắc bệnh nuôi tại tỉnh Bắc Ninh. Trên tế bào DEF, chủng VNUA-DAdV-3-1 gây bệnh tích tế bào (CPE) tăng dần theo thời gian sau gây nhiễm (Hình 2). Ở thời điểm 24 giờ sau gây nhiễm, lớp tế bào đơn lớp vẫn tương đối nguyên vẹn, chỉ xuất hiện biến đổi nhẹ về độ đồng đều và chiết quang, và đạt hiệu giá $7{,}37 \times 10^4$ $TCID_{50}$/ml (Hình 2; Bảng 2). Đến 48 giờ, các ổ CPE khu trú bắt đầu xuất hiện với hiện tượng tế bào thoái hoá, hơi co tròn hóa, co cụm và thưa lớp tế bào, và hiệu giá virus tăng lên đạt mức $3{,}69 \times 10^5$ $TCID_{50}$/ml (Hình 2; Bảng 2). Tại 72 giờ, số lượng và mức độ tổn thương tăng rõ, tế bào bị tròn hóa nhiều hơn, tụ thành cụm và phá vỡ từng phần lớp đơn bào, và hiệu giá virus tăng rõ rệt đạt $2{,}19 \times 10^6$ $TCID_{50}$/ml (Hình 2; Bảng 2). Ở thời điểm 96 giờ, CPE biểu hiện nặng nhất với hiện tượng tròn hóa, co rút, bong tách và phá hủy lan rộng lớp tế bào, và hiệu giá virus đạt đỉnh với mức cao nhất là $1{,}36 \times 10^7$ $TCID_{50}$/ml (Hình 2; Bảng 2).

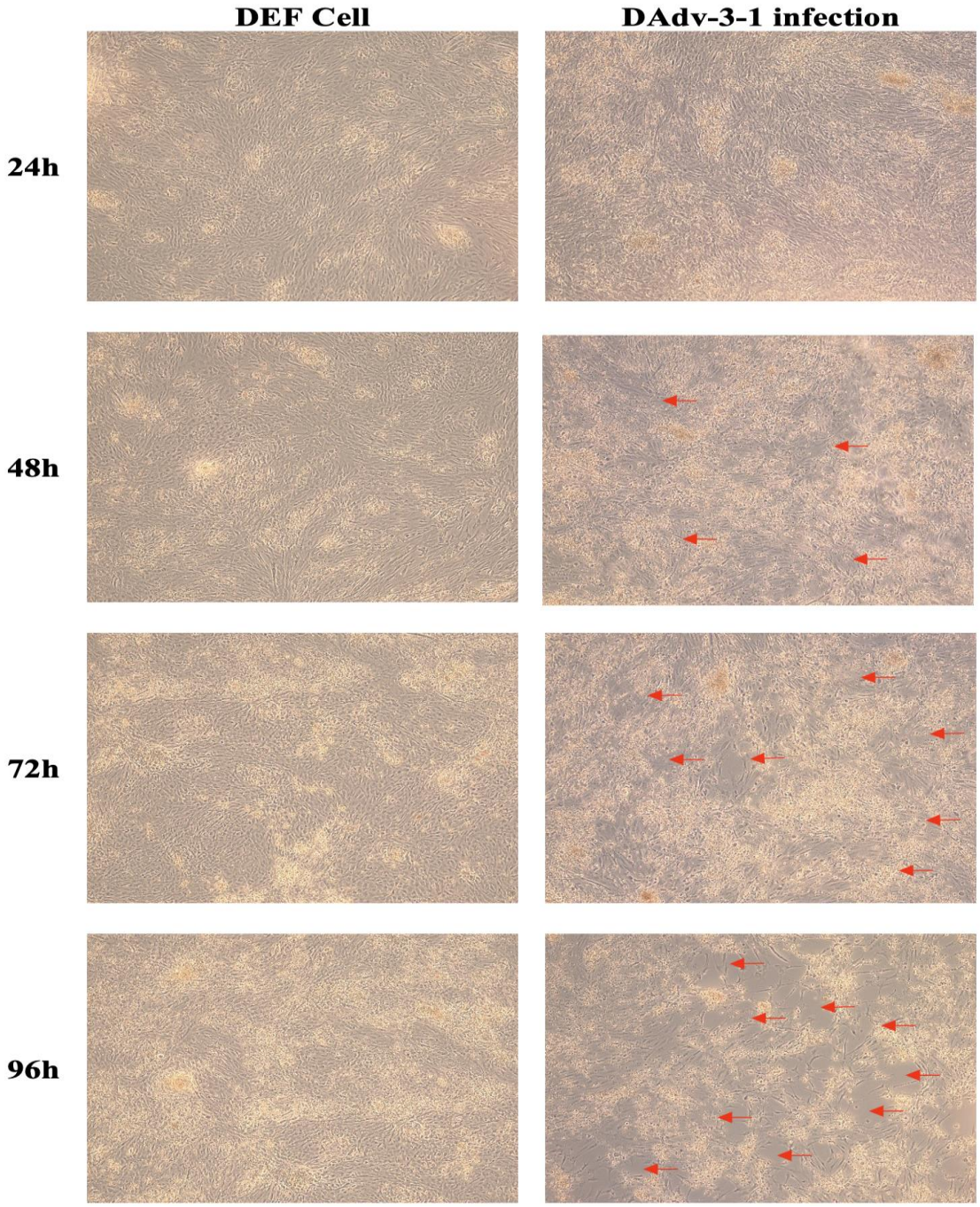
Dịch tế bào thu tại các thời điểm xác định hiệu giá cũng được phân tích bằng real-time PCR. Kết quả real-time PCR trên dịch tế bào thu cùng thời điểm cho thấy giá trị Ct giảm từ 25,42 ở 24 giờ xuống 21,93; 18,29 và 15,56 tương ứng ở 48, 72 và 96 giờ sau gây nhiễm (Bảng 2). Xu hướng giảm Ct phù hợp với sự gia tăng hiệu giá virus, cho thấy VNUA-DAdV3-1 thích nghi và nhân lên hiệu quả trên tế bào DEF, với hiệu giá cao nhất tại 96 giờ.

Chủng virus VNUA-DAdV3-1 nhân lên mạnh ở thời điểm 72 giờ và hiệu giá đạt đỉnh ở 96 giờ sau gây nhiễm, phù hợp với đặc điểm chung của adenovirus khi nuôi cấy kéo dài dẫn đến phá hủy tế bào hoàn toàn và giảm tính lây nhiễm của hạt virus (Harrach & cs., 2011). Điều này cho thấy thời điểm 72-96 giờ sau gây nhiễm là thời điểm thu hoạch tối ưu nhằm đảm bảo hiệu giá cao và bảo tồn hoạt lực virus. Do đó, việc phân lập thành công chủng VNUA-DAdV3-1 và xác định đặc điểm sinh học của virus là bước quan trọng để triển khai các nghiên cứu tiếp theo đánh giá độc lực thực nghiệm trên vịt thí nghiệm, khả năng lây truyền và nguy cơ bùng phát dịch trong điều kiện chăn nuôi tại Việt Nam.



Ghi chú: A: Vịt lười vận động, lật ngửa; B: Thận sưng, nhạt mầu; C: Gan sưng, có các đốm xuất huyết; D: Gan sưng có các dải xuất huyết.

Hình 1. Một số hình ảnh biến đổi bệnh lý đại thể ở vịt nghi mắc bệnh do duck adenovirus type 3

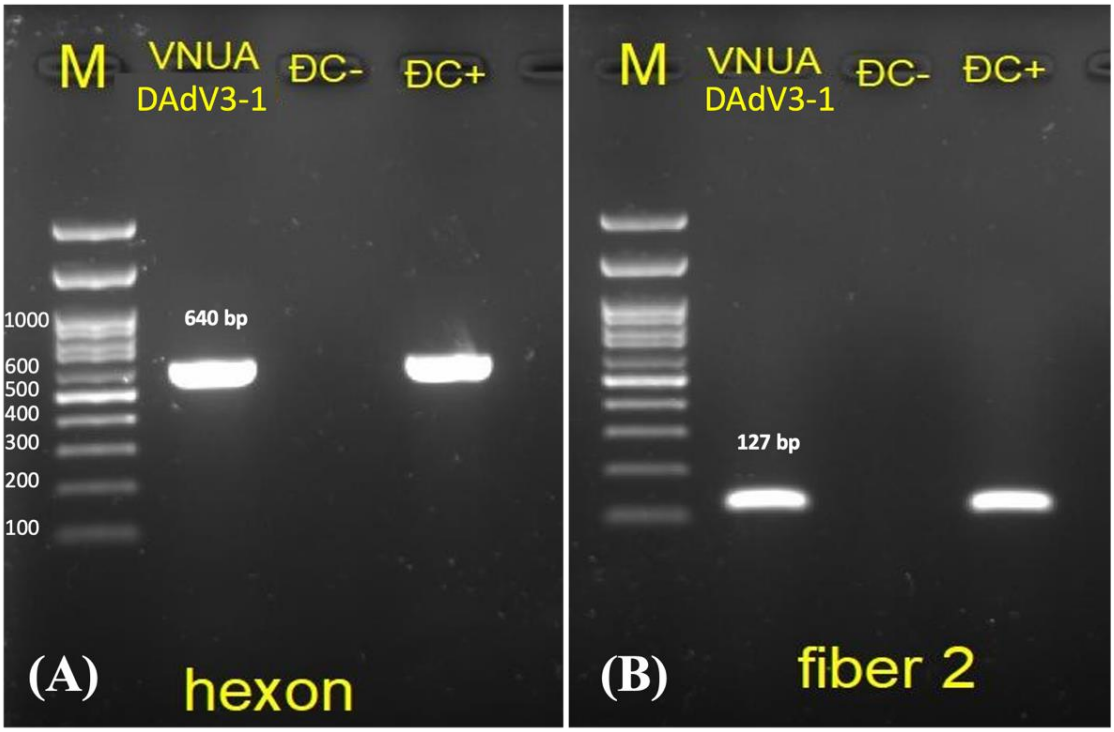


Hình 2. Kết quả nghiên cứu gây nhiễm và bệnh tích tế bào (CPE) **của chủng virus VNUA-DAdV-3-1 ở các thời điểm 24, 48, 72, 96 trên tế bào sơ phôi vịt** (DEF)

Bảng 2. Kết quả xác định hiệu giá VNUA-DAdV-3-1 bằng nuôi cấy tế bào và định lượng bằng real-time PCR

Chỉ tiêu đánh giá	Hiệu giá ($TCID_{50}$/ml)/Định lượng virus sau gây nhiễm (Mean ± SD) và giá trị real-time PCR (Ct value)			
	24h	48h	72h	96h
Hiệu giá virus	$7{,}37 \times 10^4 \pm 8{,}06 \times 10^3$	$3{,}69 \times 10^5 \pm 7{,}49 \times 10^4$	$2{,}19 \times 10^6 \pm 2{,}54 \times 10^5$	$1{,}36 \times 10^7 \pm 1{,}48 \times 10^6$
Real-time PCR	25,42 ± 0,54	21,93 ± 0,81	18,29 ± 0,37	15,56 ± 0,62

Trong nghiên cứu của Shen & cs. (2019) về các chủng DAdV-3 lưu hành tại Trung Quốc trên tế bào DEF đã mô tả bệnh tích tế bào dạng tròn hóa, thoái hoá và tụ thành đám, được xem là hình ảnh CPE kinh điển của adenovirus trên tế bào nuôi. Ở một số nghiên cứu khác Trung Quốc cũng đã mô tả tế bào LMH nhiễm DAdV-3 có bệnh tích CPE giảm chiết quang, tròn hóa và kết cụm dạng chùm nho (Shi & cs. 2022; Tan & cs. 2024). Qua đó có thể thấy kết quả nghiên cứu đạt được và các nghiên cứu trước đây có sự khá tương đồng về mô tả bệnh tích tế bào dù hệ tế bào khác nhau, kiểu hình CPE cốt lõi của DAdV-3 vẫn là: giảm độ đồng đều đơn lớp, tròn hóa, thoái hoá, tế bào bong và co cụm và phá hủy dần lớp tế bào.



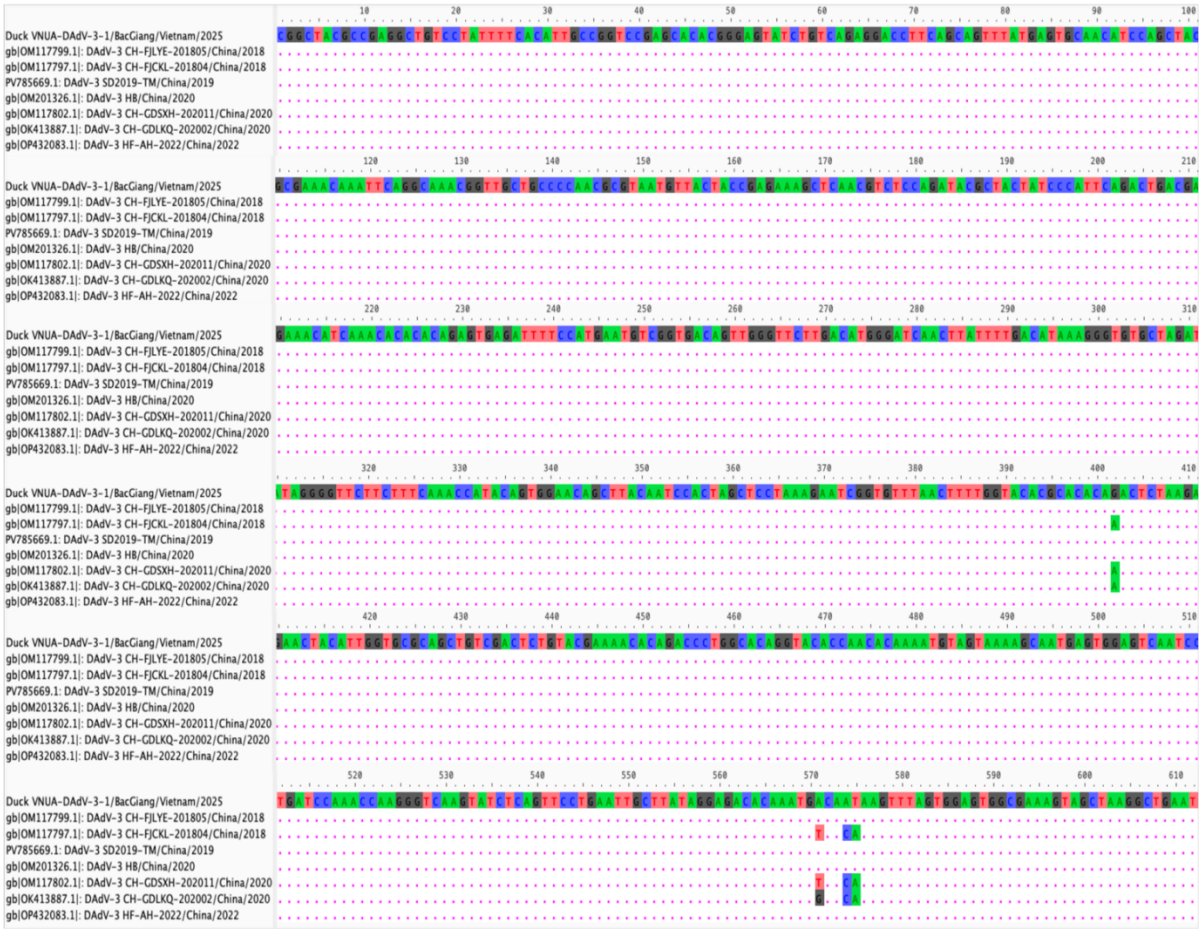
Ghi chú: M: Thang DNA chuẩn 100bp; ĐC-: Đối chứng âm; ĐC+: Đối chứng dương.

Hình 3. Kết quả minh họa sản phẩm PCR khuếch đại một phần (A) **gene Fiber-2 và** (B) **Hexon của chủng VNUA-DAdV3-1**

Bảng 3. Kết quả kiểm tra giám định và thuần khiết của chủng VNUA-DAdV3-1 bằng phương pháp real-time PCR

Virus xét nghiệm	Kết quả real-time PCR	Kết luận
Duck adenovirus type 3 (DAdV-3)	+	Dương tính
Avian influenza type A (AIVtype A)	N/A	Âm tính
Duck hepatitis A virus type 1 (DHV-1)	N/A	Âm tính
Duck parvovirus (DPV)	N/A	Âm tính
Duck tembusu virus (DTMUV)	N/A	Âm tính
Duck reovirus (DRV)	N/A	Âm tính
Duck circovirus (DuCV)	N/A	Âm tính
Duck viral enteritis (DEV)	N/A	Âm tính

Ghi chú: N/A: Không xác định giá trị Ct.



Hình 4. Kết quả giải trình tự một phần gene *Hexon* của chủng nghiên cứu VNUA-DAdV 3-1 so sánh với các chủng tham chiếu được công bố trên GeneBank

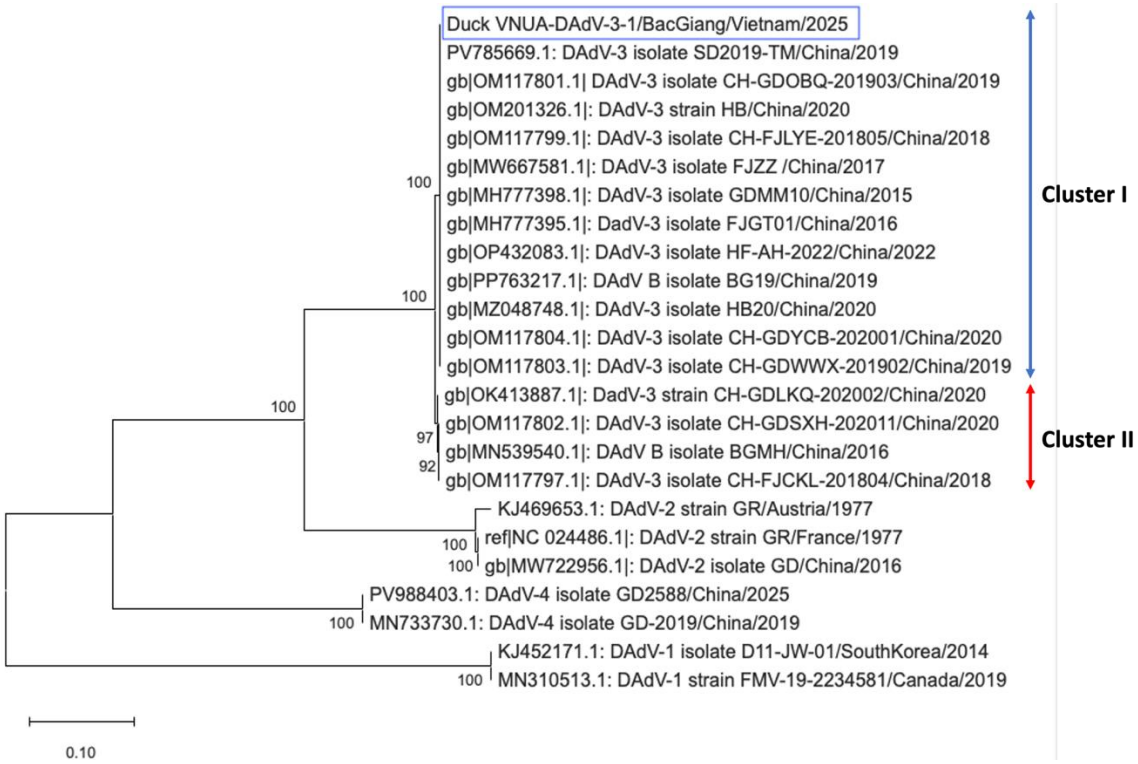
3.3. Giám định và đánh giá độ thuần khiết của chủng phân lập

Để xác định chủng phân lập VNUA-DAdV3-1 thuộc Duck adenovirus type 3 và đánh giá độ thuần khiết, chúng tôi thực hiện real-time PCR và PCR truyền thống với các cặp mồi đặc hiệu gene Hexon và Fiber-2. Hai gene được lựa chọn vì Hexon chứa các vùng siêu biến phục vụ định type và phân tích quan hệ di truyền adenovirus (Marek & cs., 2014), trong khi Fiber-2 tăng độ đặc hiệu nhờ khác biệt giữa các type *Aviadenovirus* (Shao & cs., 2022).

PCR và real-time PCR đều xác nhận VNUA-DAdV3-1 dương tính đặc hiệu với DAdV-3 (Bảng 3). Sản phẩm PCR của gene Hexon và Fiber-2 có kích thước tương ứng 640bp và 127bp, không ghi nhận sản phẩm ngoài dự kiến (Hình 3), phù hợp với các nghiên cứu sử dụng hai mục tiêu này để nhận diện DAdV-3 (Zhang & cs., 2024; Wang & cs., 2024).

Để đánh giá độ thuần khiết của chủng phân lập, chúng tôi thực hiện các xét nghiệm real-time PCR bổ sung nhằm kiểm tra sự hiện diện đồng thời của những virus thủy cầm thường gặp khác, bao gồm DPV, DTMUV, DRV, DuCV, DEV và DHEV (Bảng 2; Bảng 3). Kết quả các phản ứng real-time PCR đều cho kết quả âm tính cho thấy chủng virus phân lập VNUA-DAdV3-1 là thuần khiết và không chứa các virus đánh giá khác (Bảng 3). Việc loại trừ các tác nhân virus khác là bước quan trọng để đảm bảo rằng các quan sát bệnh tích tế bào, hiệu giá virus, và phân tích di truyền chỉ phản ánh hành vi của DAdV-3, không bị nhiễm chéo bởi virus khác. Điều này cũng tương tự với cách tiếp cận trong các nghiên cứu khác, nơi các nhà nghiên cứu sử dụng đa mồi (multiplex) PCR để đảm bảo thuần nhất chủng

phân lập, tránh nhầm lẫn do đồng nhiễm hoặc tạp nhiễm (Wang & cs., 2024; Shao & cs., 2022). Tổng hợp các kết quả nghiên cứu cho thấy chủng virus phân lập VNUA-DAdV3-1 đáp ứng tiêu chí độ thuần khiết cao, thích nghi và nhân lên với hiệu giá cao trên tế bào DEF, phù hợp cho các nghiên cứu tiếp theo như giải trình tự hệ gene đầy đủ, đánh giá độc lực trên mô hình vật nuôi, phát triển công cụ chẩn đoán đặc hiệu, và thậm chí bước đầu định hướng nghiên cứu vaccine và chế phẩm sinh học hỗ trợ phòng trị bệnh trong tương lai.



Hình 5. Phân tích cây phát sinh loài dựa trên trình tự một phần gene Hexon của chủng phân lập VNUA-DAdV-3-1 so với các chủng duck adenovirus tham chiếu trên thế giới

Bảng 4. Mức tương đồng trình tự nucleotide một phần gene Hexon giữa chủng VNUA-DAdV3-1 và các chủng DAdV-3 tham chiếu trên GeneBank

Chủng tham chiếu	Mã số GeneBank	Năm	Tỉnh/Vùng (Trung Quốc)	Nhánh (Cluster)	Tương đồng Nu (%)
GDMM10	MH777398.1	2015	Guangdong	I	100
FJGT01	MH777395.1	2016	Fujian	I	100
FJZZ	MW667581.1	2017	Fujian	I	100
CH-FJLYE-201805	OM117799.1	2018	Fujian	I	100
CH-GDOBQ-201903	OM117801.1	2019	Guangdong	I	100
SD2019-TM	PV785669.1	2019	Shandong	I	100
HB	OM201326.1	2020	Hebei	I	100
HF-AH-2022	OP432083.1	2022	Anhui	I	100
CH-FJCKL-201804	OM117797.1	2018	Fujian	II	99,35
CH-GDSXH-202011	OM117802.1	2020	Guangdong	II	99,35
CH-GDLKQ-202002	OK413887.1	2020	Guangdong	II	99,35

3.4. Phân tích trình tự một phần gene Hexon và mối quan hệ di truyền của chủng VNUA-DAdV3-1

Để xác định đặc điểm di truyền và vị trí phân loại của chủng VNUA-DAdV 3-1, một phần gene Hexon được khuếch đại, giải trình tự và so sánh với các trình tự tham chiếu của duck adenovirus đã công bố trên GeneBank. Gene Hexon được lựa chọn do đây là gene mã hóa protein capsid chính của Adenovirus, chứa các vùng siêu biến có giá trị cao trong định type và phân tích quan hệ phát sinh loài giữa các chủng trong cùng loài và giữa các type khác nhau (Marek & cs., 2014; Harrach & cs., 2011).

Kết quả phân tích trình tự nucleotide một phần gene Hexon và cây phát sinh loài cho thấy chủng VNUA-DAdV-3-1 có độ tương đồng cao và nằm trong cùng một nhánh (clade) phát sinh với các chủng DAdV type 3 (DAdV-3) được công bố tại Trung Quốc (Hình 4 và 5), và tách biệt rõ ràng với các type khác như DAdV-1 (Atadenovirus) và DAdV-4 (Marek & cs., 2014; Huang & cs., 2020). Chủng VNUA-DAdV-3-1 có mức tương đồng 100% về trình tự nucleotide với các chủng thực DadV-3 thuộc Cluster I và 99,35% so với các chủng DAdV-3 thuộc Cluster II được công bố tại Trung Quốc từ năm 2015-2022 (Shi & cs., 2019; Yin & cs., 2022) (Hình 5 và Bảng 4). Mức tương đồng cao này cho thấy chủng phân lập tại Việt Nam có quan hệ tiến hóa rất gần với các dòng DAdV-3 đang lưu hành tại Trung Quốc (Hình 5).

Các nghiên cứu tại Trung Quốc cho thấy mặc dù DAdV-3 có mức tương đồng nucleotide cao (98-100%) giữa các chủng lưu hành, tuy nhiên một số biến đổi khác biệt tại một số điểm trình tự thuộc gene Hexon, có thể dẫn đến sự thay đổi độc lực hoặc thích nghi vật chủ (Shi & cs., 2022; Yin & cs., 2022). Do đó, mặc dù mức tương đồng 99,35-100% của chủng VNUA-DAdV3-1 với các chủng tại Trung Quốc cho thấy sự bảo tồn di truyền tương đối cao, nguy cơ xuất hiện đột biến hoặc tái tổ hợp trong tương lai vẫn cần được theo dõi. Về mặt dịch tễ học phân tử, sự tương đồng cao giữa chủng Việt Nam và các chủng Trung Quốc đặt ra giả thuyết về khả năng nguồn gốc liên quan đến dòng lưu hành khu vực, có thể thông qua hoạt động thương mại con giống, vận chuyển gia cầm hoặc sản phẩm chăn nuôi xuyên biên giới. Tuy nhiên, cũng không loại trừ khả năng virus đã lưu hành âm thầm trên đàn vịt trước đó, và khi được phát hiện khi gây bệnh rõ rệt hoặc phát bệnh khi có yếu tố bội nhiễm với virus hoặc vi khuẩn khác. Yin & cs. (2022) nhấn mạnh rằng DAdV-3 có thể tồn tại ở mức lưu hành thấp trong đàn trước khi bùng phát dịch khi điều kiện miễn dịch hoặc quản lý thay đổi (Yin & cs. 2022).

Kết quả phân tích cây phát sinh loài cho thấy chủng VNUA-DAdV3-1 tụ thành một nhánh chung với các chủng DAdV-3 lưu hành tại nhiều tỉnh của Trung Quốc trong giai đoạn 2015-2022, bao gồm các chủng từ Guangdong (Zhang & cs., 2016), Shandong và Fujian (Shi & cs., 2019; Shen & cs., 2019), Guangdong và Yunnan (Yin & cs., 2022) và Zhejiang (Shi & cs., 2022). Điều này cho thấy VNUA-DAdV3-1 thuộc dòng virus DAdV-3 đang lưu hành chủ yếu ở khu vực Đông Á và có nguồn gốc tiến hóa gắn liền với dòng virus lưu hành tại Trung Quốc. Phát hiện này tương đồng với các nghiên cứu khác cho thấy các chủng DAdV-3 lưu hành trong khu vực có mức tương đồng gene rất cao và hình thành một lineage đơn thống nhất, phản ánh quá trình lây lan xuyên biên giới thông qua hoạt động thương mại gia cầm hoặc vịt giống trong khu vực (Yin & cs., 2022; Wang & cs., 2024). Tuy nhiên, cần lưu ý rằng phân tích dựa trên một phần gene Hexon chưa đủ độ phân giải để phân biệt các sub-lineage hoặc biến thể trong cùng dòng virus; do đó, việc giải trình tự toàn bộ hệ gene sẽ cung cấp thông tin đầy đủ hơn về phân loại và tiến hóa của chủng VNUA-DAdV3-1 trong bối cảnh các chủng DAdV-3 đang lưu hành trên thế giới (Shi & cs., 2022). Việc xác định chính xác vị trí phát sinh loài của VNUA-DAdV3-1 có ý nghĩa quan trọng đối với giám sát dịch tễ và xây dựng chiến lược phòng chống. Trình tự gene Hexon có thể được sử dụng làm chỉ thị phân tử để theo dõi sự lưu hành và biến đổi của DAdV-3 tại Việt Nam trong tương lai, đồng thời làm cơ sở cho việc

thiết kế bộ mồi chẩn đoán đặc hiệu và nghiên cứu phát triển vaccine phù hợp với dòng virus lưu hành (Marek & cs., 2014; Shao & cs., 2022).

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này báo cáo kết quả phân lập và giám định thành công chủng duck adenovirus type 3 (DAdV-3), ký hiệu VNUA-DAdV3-1, từ đàn vịt 15 ngày tuổi có tỷ lệ chết cao tại Bắc Ninh, Việt Nam. Chủng VNUA-DAdV3-1 nhân lên hiệu quả trên tế bào DEF với bệnh tích tế bào điển hình và đạt hiệu giá virus $1{,}36 \times 10^7$ $TCID_{50}$/ml tại thời điểm 96 giờ sau gây nhiễm. Kết quả PCR, real-time PCR và phân tích trình tự gene Hexon xác nhận chủng thuộc DAdV-3, với mức tương đồng nucleotide 99,35-100% so với các chủng lưu hành tại Trung Quốc giai đoạn 2015-2022. Nghiên cứu cung cấp bằng chứng về sự hiện diện khoa học về sự lưu hành của DAdV-3 tại Việt Nam và đặt ra yêu cầu tăng cường giám sát dịch tễ, đánh giá độc lực, và phát triển giải pháp phòng chống phù hợp cho đàn thủy cầm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi đề tài nghiên cứu cho các sản phẩm có tiềm năng chuyển giao công nghệ ứng dụng của nhóm nghiên cứu xuất sắc nghiên cứu sản xuất thực nghiệm và đánh giá thử nghiệm chế phẩm sinh học trên động vật của Học viện nông nghiệp Việt Nam giai đoạn 2026-2028. Nhóm tác gửi lời cảm ơn tới các cán bộ nghiên cứu và sinh viên nghiên cứu khoa học tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ sinh học thú y, Khoa Thú y, Học viện nông nghiệp Việt Nam, và các cán bộ nghiên cứu của công ty cổ phần sinh phẩm thú y VNUA và Công ty Cổ phần INVET đã hỗ trợ và hợp tác nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chen S., Chen S., Zhang Y., Liu M., Wang J., Zhu X. & Li Y. (2017). Isolation and characterization of duck adenovirus 3 circulating in China. Archives of Virology. 162: 195-203.

Harrach B., Benkő M., Both G.W., Brown M., Davison A.J., Echavarría M., Hess M., Jones M.S., Kaján G.L., Lehmkuhl H.D., Mautner V., Mittal S.K. & Wadell G. (2011). Family Adenoviridae. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic press.

Huang Y., Kang H., Dong J., Zhang B., Li J., Wang X. & Chen H. (2020). Isolation and partial genetic characterization of a novel duck adenovirus 4 in China. Veterinary Microbiology. 247: 108775.

Li Y., Wei L., Cheng A., Wang M., Ou X., Mao S., Tian B., Yang Q., Wu Y., Zhang S., Huang J., Gao Q., Sun D., Zhao X., Jia R., Liu M., Zhu D., Chen S., Yu Y., Zhang L. & Pan L. (2022). Specific DNAzymes cleave the 300–618 nt of 5′UTR to inhibit DHAV-1 translation and replication. Frontiers in Microbiology. 13: 1064612.

Marek A., Kaján G. L., Kosiol C., Harrach B., Schachner A. & Hess M. (2014). Complete geneome sequences of pigeon adenovirus 1 and duck adenovirus 2 extend the number of species within the genus *Aviadenovirus*. Virology. 462-463: 107-114.

Shao H., Zhang W., Lin Y., Liu Y., Li Y., Chen H. & Wang Q. (2022). Novel monoclonal antibodies against Fiber-1 protein of duck adenovirus 3 and identification of B-cell epitopes. Frontiers in Veterinary Science. 9: 1003262.

Shen H., Shi S., Liu R., Wan C., Cheng L., Chen Z., Fu G., Chen H., Fu Q. & Huang Y. (2019). Isolation and characterization of duck adenovirus 3 circulating in China. Archives of Virology. 164: 205-212.

Shi S., Liu R., Wan C., Zhang X., Sun H., Chen H. & Fu G. (2019). Isolation and characterization of duck adenovirus 3 circulating in China. Archives of Virology. 164: 847-851.

Shi X., Zhang X., Sun H., Liu R., Wan C., Chen H. & Fu G. (2022). Isolation and pathogeneic characterization of duck adenovirus 3 mutant circulating in China. Poultry Science. 101(3): 101564.

Tan Y., Zhang Y., Liu M., Feng X., Yang X., Li Y., Zhang Q., Wang J., Chen H., Cheng A., Wang M., Jia R., Zhu D., Liu M., Zhao X. & Chen S. (2024). Isolation, characterization, evaluation of pathogeneicity, and immunomodulation through interferon production of duck adenovirus type-3 (DAdV-3). Poultry Science. 103(3): 103411.

Wan C., Chen C., Cheng L., Fu G., Shi S., Liu R., Chen H., Fu Q. & Huang Y. (2018). Development of a TaqMan-based real-time PCR for detecting duck adenovirus 3. Journal of Virological Methods. 261: 86-90.

Wang H., Chen J., An T., Zhang Y., Li G., Liu Y. & Sun H. (2024). Development and application of

quadruplex real-time quantitative PCR for differentiation of Muscovy duck parvovirus, goose parvovirus, duck circovirus, and duck adenovirus 3. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 14: 1448480.

Wang J., Chen H., An T., Zhang Y., Liu R., Sun H. & Li G. (2020). Pathogeneicity of duck adenovirus 3 in ducklings and immune response analysis. Veterinary Microbiology. 247: 108780.

Yang F.L., Jia W.X., Yue H., Luo W., Chen X., Xie Y., Zen W. & Yang W.Q. (2005). Development of quantitative real-time polymerase chain reaction for duck enteritis virus DNA. Avian Diseases. 49(3): 397-400.

Yin L., Zhou Q., Mai K., Chen H., Liu Y., Wang J. & Li G. (2022). Epidemiological investigation of duck adenovirus 3 in southern China during 2018-2020. Avian Pathology. 51(2): 171-180.

Zhang X., Xu B., Zhou H., Zhou X., Wang Q., Sun J., Liu K., Zha L., Li J., Dai Y. & Chen F. (2024). Pathogeneicity of duck adenovirus type 3 in chickens. Animals. 14(16): 2284.

Zhang X., Zhong Y., Zhou Z., Liu M., Wang J., Chen H. & Li G. (2016). Molecular characterization, phylogenetic analysis and pathogeneicity of a Muscovy duck adenovirus strain isolated in China in 2014. Virology. 493: 12-21.

Zhang S., Li W., Liu X., Li X., Gao B., Diao Y. & Tang Y. (2020). A TaqMan-based real-time PCR assay for specific detection of novel duck reovirus in China. BMC Veterinary Research. 16: 306.

Zhang X., Yao M., Tang Z., Xu D., Luo Y., Gao Y. & Yan L. (2020). Development and application of a triplex real-time PCR assay for simultaneous detection of avian influenza virus, Newcastle disease virus, and duck Tembusu virus. BMC Veterinary Research. 16: 203.