Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2026, 24(9): 1245-1254 https://doi.org/10.31817/tckhnnvn.2026.24.9.08
vie.vjas.vn

MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC VÀ KHẢ NĂNG GÂY BỆNH THỰC NGHIỆM CỦA VIRUS CÚM A/H9N2 PHÂN LẬP Ở MIỀN BẮC VIỆT NAM

Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Lan*, Hoàng Thị Phương, Đào Lê Anh

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Tác giả liên hệ: nguyenlan@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 18.08.2026 Ngày chấp nhận đăng: 18.09.2026

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm phát hiện RNA virus cúm A/H9N2 trong mẫu mô của gia cầm có biểu hiện bệnh, phân lập virus và đánh giá một số đặc tính sinh học và khả năng gây bệnh thực nghiệm. Tổng số 55 mẫu phổi, khí quản và não được thu từ 19 cá thể tại bốn trang trại ở Hà Nội, Hưng Yên và Thái Nguyên giai đoạn 2020-2023. RNA H9 và N2 được phát hiện bằng real-time RT-PCR, mẫu dương tính được phân lập trên trứng gà có phôi và đánh giá bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA), ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) và liều gây nhiễm 50% phôi (EID_{50}). Có 22/55 mẫu mô dương tính. Mười hai mẫu tạo dịch niệu mô có hoạt tính HA và bảy chủng đáp ứng tiêu chí HI. Chủng H9N2.HY1.2 đạt 8,89 × 10^7 EID_{50}/ml và được gây nhiễm tĩnh mạch cho gà 21 ngày tuổi với liều 10^6 EID_{50}/con. Biểu hiện lâm sàng rõ nhất ở ngày 6-9 và không ghi nhận tử vong. RNA virus được phát hiện ở khí quản và phổi đến ngày 28, lách và thận đến ngày 21 và trong phân ở ngày 7-14, không phát hiện trong máu hoặc tuyến tụy. Tổn thương chủ yếu ở đường hô hấp và một số cơ quan ngoài hô hấp. Kết quả nghiên cứu đặc trưng cho chủng khảo sát trong mô hình gây nhiễm tĩnh mạch và không đại diện cho tỷ lệ lưu hành hoặc đặc điểm nhiễm tự nhiên.

Từ khóa: Real-time RT-PCR, trứng gà có phôi, ngưng kết hồng cầu, mô bệnh học, phân bố mô.

Biological Characteristics and Experimental Pathogenicity of Avian Influenza A/H9N2 Virus Isolates from Northern Vietnam

ABSTRACT

This study aimed to detect avian influenza A(H9N2) viral RNA in tissue specimens from clinically affected poultry, isolate the virus, and characterize selected biological features and experimental pathogenicity. A total of 55 lung, tracheal, and brain specimens were collected from 19 poultry at four farms in Hanoi, Hung Yen, and Thai Nguyen during 2020-2023. H9 and N2 RNA were detected by real-time RT-PCR, positive specimens were inoculated into embryonated chicken eggs and evaluated by hemagglutination (HA), hemagglutination inhibition (HI), and EID_{50} assays. H9N2 RNA was detected in 22/55 tissue specimens. Twelve specimens yielded hemagglutinating allantoic fluid, and seven isolates met the HI-based selection criteria and were passaged. Isolate H9N2.HY1.2 reached 8.89 × 10^7 EID_{50}/ml and was used in an intravenous challenge model in 21-day-old chickens at 10^6 EID_{50}/bird. No mortality occurred, mild clinical signs were most evident at 6-9 days post-inoculation. Viral RNA was detected in the trachea and lung through day 28, in the spleen and kidney through day 21, and in feces on days 7-14, but not in blood or pancreas. Lesions were observed mainly in the respiratory tract, with additional changes in selected extra-respiratory organs. These findings characterize H9N2.HY1.2 under an intravenous challenge model and should not be interpreted as population prevalence or as the course of natural infection.

Keywords: Embryonated chicken egg, hemagglutination, histopathology, real-time RT-PCR, tissue distribution.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus cúm A thuộc họ Orthomyxoviridae có bộ gen RNA sợi đơn âm gồm tám phân đoạn. Dựa trên đặc điểm kháng nguyên của hemagglutinin và neuraminidase, virus cúm A được phân thành nhiều phân type. Ở gia cầm, các virus cúm A thuộc phụ type H9N2 thường là các virus độc lực

thấp. Các virus này lưu hành rộng tại châu Á, Trung Đông và Bắc Phi, gây giảm tăng trọng, giảm sản lượng trứng, tăng chi phí kiểm soát và làm nặng thêm bệnh khi đồng nhiễm với các tác nhân hô hấp khác (Nagy & cs., 2017; Peacock & cs., 2019; Carnaccini & Perez, 2020).

Ngoài tác động đối với chăn nuôi, H9N2 còn được quan tâm do khả năng lây nhiễm sang động vật có vú và người, cũng như vai trò cung cấp các phân đoạn gen cho một số virus cúm tái tổ hợp có khả năng gây bệnh ở người. Vì vậy, giám sát sự lưu hành, phân lập và đánh giá đặc tính sinh học của các virus H9N2 tại đàn gia cầm có ý nghĩa đối với thú y và sức khỏe cộng đồng (Bi & cs., 2022). Đáng chú ý, các virus H9N2 cung cấp các phân đoạn gen nội cho những virus cúm A tái phân đoạn có khả năng lây sang người, điển hình như A(H7N9), A(H10N8) và A(H5N6), cho thấy H9N2 có thể đóng vai trò như một nguồn gen quan trọng trong quá trình hình thành các virus cúm mới (Pu & cs., 2015; Peacock & cs., 2019).

Tại Việt Nam, virus cúm A/H9N2 đã được ghi nhận với mức độ đa dạng di truyền đáng kể trong chuỗi cung ứng gia cầm. Khảo sát tại các chợ gia cầm sống ở miền Bắc năm 2014 cho thấy virus cúm A/H9 được phát hiện ở 422/468 mẫu gộp dương tính với virus cúm A. Nghiên cứu cũng đồng thời ghi nhận nhiều dòng H9N2 (Clade) cùng lưu hành (Thuy & cs., 2016). Các nghiên cứu về mạng lưới buôn bán gia cầm cho thấy hành vi và cấu trúc phân phối có liên quan đến nguy cơ phát hiện virus cúm (Sealy & cs., 2019). Gần đây, Hennessey & cs. (2026) phát hiện virus cúm A/H9N2 trong 197 mẫu swab ở gà thuộc mạng lưới sản xuất - phân phối tại miền Bắc Việt Nam trong giai đoạn 2021-2022, chiếm tỷ lệ 11,71%. Tỷ lệ dương tính ở các cơ sở phân phối gia cầm sống cao hơn so với tỷ lệ dương tính xác định ở các trang trại chăn nuôi. Tuy nhiên, dữ liệu về các chủng H9N2 thu trực tiếp từ gia cầm có biểu hiện bệnh tại trang trại và đặc tính gây bệnh thực nghiệm của các chủng này ở Việt Nam vẫn còn hạn chế.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm (i) xác định tỷ lệ phát hiện RNA virus cúm A/H9N2 trong các mẫu bệnh phẩm của gia cầm nghi mắc bệnh tại một số trang trại ở miền Bắc Việt Nam, (ii) phân lập và đánh giá một số đặc tính sinh học của virus trên trứng gà có phôi và (iii) xác định đặc tính gây bệnh của virus ở gà trong điều kiện phòng thí nghiệm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Tổng số 55 mẫu mô gồm phổi, khí quản và não (45 mẫu từ gà và 10 mẫu từ ngan) được thu từ 19 cá thể gia cầm (15 gà và 4 ngan) tại 4 trang trại ở Hà Nội, Hưng Yên và Thái Nguyên trong giai đoạn 2020-2023. Các trang trại được lựa chọn có chủ đích trên cơ sở ghi nhận đàn gia cầm có biểu hiện lâm sàng nghi mắc cúm gia cầm. Đặc điểm đàn, số cá thể và số mẫu mô được trình bày trong bảng 1. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thu thập và phân tích các mẫu riêng lẻ từ cùng một cá thể thay vì sử dụng mẫu gộp nhiều cá thể. Cách tiếp cận này nhằm tránh hiện tượng pha loãng mẫu làm giảm tải lượng của virus dưới ngưỡng phát hiện, hạn chế tối đa tỷ lệ âm tính giả. Mẫu bệnh phẩm được bảo quản ở -80°C cho đến khi xét nghiệm. Do thiết kế chọn mẫu có chủ đích và số trang trại khảo sát hạn chế, tập mẫu này không đại diện cho quần thể gia cầm tại các địa phương nghiên cứu và không được sử dụng để ước tính tỷ lệ lưu hành ở cấp quần thể.

Bảng 1. Thông tin mẫu thu thập

Trang trại	Địa phương	Loài	Lứa tuổi (tuần)	Quy mô đàn	Tình trạng tiêm phòng vacxin cúm gia cầm A/H9	Số cá thể lấy mẫu	Số mẫu thu
1	Hà Nội	Gà thịt	3	2.500	Không	5	15
2	Hưng Yên	Gà thịt	5	3.000	Không	5	15
3	Hưng Yên	Gà đẻ	26	3.000	Không	5	15
4	Thái Nguyên	Ngan	7	2.000	Không	4	10

Bảng 2. Trình tự mồi và đoạn dò sử dụng trong phản ứng real-time RT-PCR phát hiện virus cúm A/H9 và A/N2

Gen đích	Tên mồi/đoạn dò	Trình tự (5′-3′)	Tài liệu tham khảo
H9	H9-F Mồi xuôi	ATRGGGTTTGCTGCC	TCVN 8400-59:2026
	H9-R1	TCATATACAAATGTTGCAYCTG	
	H9-R2	TTATATACAGATGTTGCAYCTG	
	H9-probe	FAM-TTCTGGGCYATGTCHAAYGG-BHQ1	
N2	N2-F	AGTCTGGTGGACYTCAAAYAG	
	N2-R	AATTGCGAAAGCTTATATAGVCAT	
	N2-probe	FAM-CCATCAGGCCATGAGCCT-MGB	

Ghi chú: R = A/G; Y = C/T; H = A/C/T; V = A/C/G.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xử lý mẫu bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm được đồng nhất thành huyễn dịch 10% trong dung dịch phosphate-buffered saline 1× có bổ sung 1% hỗn hợp kháng sinh, ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 2 phút và thu dịch nổi. Mẫu được bảo quản ở điều kiện -80°C cho tới khi sử dụng.

2.2.2. Tác chiết RNA tổng số và thực hiện phản ứng real-time RT-PCR

RNA tổng số được tách chiết bằng MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, mã A32702) trên hệ thống KingFisher Duo Prime theo hướng dẫn của nhà sản xuất. RNA sau đó được hòa tan trong 60µl nước tinh khiết không có enzyme nucleaza và bảo quản ở nhiệt độ -30°C cho tới khi sử dụng.

Trình tự mồi và đoạn dò (probe) để thực hiện phản ứng real-time PCR xác định RNA của virus Cúm A/H9 và A/N2 được trình bày trong bảng 2. Phản ứng real-time RT-PCR được thực hiện với 4X CAPITAL 1-Step qRT-PCR Probe Mix, 20X RTase with RNase Inhibitor, nước không có nuclease, mồi, probe và RNA khuôn. Chu trình nhiệt gồm 50°C trong 10 phút, 95°C trong 3 phút, tiếp theo 45 chu kỳ ở 95°C trong 10 giây và 60°C trong 30 giây. Mỗi lần chạy có chứng âm và chứng dương; phản ứng chỉ được chấp nhận khi chứng âm không xuất hiện tín hiệu khuếch đại và chứng dương cho tín hiệu huỳnh quang thu nhận tại chu kỳ 28-32 của phản ứng. Mẫu được xác định dương tính với virus cúm A/H9N2 khi cả hai đích H9 và N2 cho tín hiệu khuếch đại hợp lệ theo tiêu chí của xét nghiệm.

2.2.3. Phân lập virus trên trứng gà có phôi

Các mẫu dương tính với virus cúm A/H9N2 được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ lọc là 0,45µm và gây nhiễm vào xoang niệu mô của trứng gà có phôi 9-10 ngày tuổi theo TCVN 8400-26:2014. Mỗi mẫu được gây nhiễm trên 3 trứng với thể tích 0,2 ml/trứng. Lỗ tiêm được bít kín bằng paraffin; trứng được ấp ở 37°C và soi phôi mỗi 12 giờ. Phôi chết trong 24 giờ đầu được loại khỏi đánh giá do có khả năng liên quan đến thao tác. Phôi chết sau 24 giờ được thu ngay và bảo quản ở 2-8°C. Các phôi còn sống được thu tại thời điểm kết thúc quy trình (96 giờ sau gây nhiễm) và làm lạnh ở 2-8°C trong tối thiểu 4 giờ trước khi thu dịch niệu mô. Dịch niệu mô được kiểm tra khả năng gây ngưng kết hồng cầu gà bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu (Hemagglutination assay - HA).

2.2.4. Phản ứng ngưng kết và ngăn trở ngưng kết hồng cầu

Phản ứng HA và ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) được thực hiện với hồng cầu gà 1% theo TCVN 8400-26:2014. Hiệu giá HA được xác định là nghịch đảo của độ pha loãng cao nhất còn gây ngưng kết hoàn toàn và biểu thị theo $\log_2$. Các dịch niệu mô có hiệu giá HA trên 4 $\log_2$ được kiểm tra HI với kháng huyết thanh H9N2; đồng thời kiểm tra với kháng huyết

thanh H5N1 và virus Newcastle nhằm phát hiện phản ứng không đặc hiệu hoặc khả năng hiện diện của tác nhân có hoạt tính ngưng kết hồng cầu khác. Để đảm bảo độ đặc hiệu, phản ứng HI được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kháng thể chuẩn (kháng huyết thanh chuẩn) bao gồm: H9N2, H5N1 và virus Newcastle (ND) (GD Animal Health).

Các chủng có HI dương tính với H9N2 và không phản ứng với H5N1 hoặc virus Newcastle được lựa chọn để tiếp đời.

2.2.5. Xác định hiệu giá EID_{50}

Các chủng đáp ứng tiêu chí HI được tiếp truyền ba lần trên trứng gà có phôi 9-10 ngày tuổi. Dịch virus được pha loãng thập phân từ 10^{-1} đến 10^{-9}; mỗi độ pha loãng được gây nhiễm trên ba trứng. Trạng thái nhiễm ở từng độ pha loãng được xác định dựa trên hoạt tính HA của dịch niệu mô. Hiệu giá liều gây nhiễm 50% phôi (EID_{50}/ml) được tính theo phương pháp Reed & Muench (1938).

2.2.6. Gây nhiễm thực nghiệm trên gà

Ba mươi gà Lương Phượng lai 1 ngày tuổi, chưa được tiêm phòng cúm gia cầm, được kiểm tra âm tính với kháng thể cúm gia cầm bằng phương pháp HI, virus cúm gia cầm, virus Newcastle và virus viêm phế quản truyền nhiễm bằng phương pháp real-time RT-PCR. Gà được nuôi cách ly đến 21 ngày tuổi trước khi tiến hành thí nghiệm và được phân bổ vào nhóm gây nhiễm (20 con) và nhóm đối chứng (10 con) tại khu chăn nuôi động vật an toàn sinh học cấp 3 của Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Trong lô thí nghiệm, 10 gà được dành để theo dõi lâm sàng trong 28 ngày; 10 gà còn lại được bố trí đánh giá phân bố RNA theo thời gian, trong đó 2 gà được mổ lấy mẫu nền ngay trước gây nhiễm (0dpi) và 8 gà còn lại được lấy mẫu, hai con tại mỗi thời điểm 7, 14, 21 và 28dpi.

Những gà được gây nhiễm được tiêm tĩnh mạch cánh 0,2ml dịch virus H9N2.HY1.2 chứa 10^6 EID_{50}/con. Gà đối chứng được tiêm cùng thể tích nước muối sinh lý vô trùng. Đường tiêm tĩnh mạch được sử dụng trong mô hình công cường độc của nghiên cứu; do không mô phỏng đường phơi nhiễm tự nhiên, kết quả về biểu hiện bệnh và phân bố RNA được diễn giải trong phạm vi của mô hình này.

Gà được theo dõi hằng ngày trong 28 ngày về tình trạng ăn uống, vận động, biểu hiện hô hấp, tiêu hóa, mắt, mặt và tử vong. Ở nhóm đánh giá phân bố RNA, các mẫu khí quản, phổi, lách, thận, tuyến tụy, máu và phân được thu tại các thời điểm quy định và xét nghiệm H9N2 bằng real-time RT-PCR.

2.2.7. Đánh giá bệnh tích đại thể và vi thể

Gà được mổ khám theo quy trình bệnh lý thú y, tổn thương đại thể tại mắt, khí quản, phổi, tim, gan, lách, thận, đường tiêu hóa, tuyến ức, túi Fabricius và tuyến tụy được ghi nhận. Các mẫu mô khí quản, phổi, tim, gan, lách, thận, tuyến ức, tuyến tụy và ruột của 3 gà nhóm gây nhiễm và 3 gà nhóm đối chứng sau 28 ngày theo dõi, mẫu được cố định ngay trong formalin trung tính 10%, xử lý mô, đúc paraffin, cắt lát và nhuộm hematoxylin-eosin. Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi quang học ở vật kính 10x, 20x và 40x.

Bảng 3. Bố trí thí nghiệm gây nhiễm gà thí nghiệm

Lô thí nghiệm	Số gà (con)	Xử lý	Theo dõi/đánh giá	Thời điểm lấy mẫu
Gây nhiễm - theo dõi lâm sàng	10	Tiêm tĩnh mạch cánh 0,2ml H9N2.HY1.2, 10^6 EID_{50}/con	Theo dõi lâm sàng hằng ngày trong 28 ngày	Đến 28dpi
Lấy mẫu nền	2	Không gây nhiễm	Mổ lấy mẫu nền trước gây nhiễm	0dpi
Gây nhiễm - phân bố RNA	8	Tiêm tĩnh mạch cánh 0,2ml H9N2.HY1.2, 10^6 EID_{50}/con	Mổ lấy mẫu 2 gà tại mỗi thời điểm	7, 14, 21 và 28dpi
Đối chứng	10	Tiêm 0,2ml nước muối sinh lý vô trùng	Theo dõi lâm sàng trong 28 ngày; 3 gà dùng đối chiếu mô bệnh học cuối kỳ	28dpi

2.2.8. Xử lý số liệu

Số liệu được trình bày dưới dạng số lượng và tỷ lệ phần trăm. Do chỉ có 4 trang trại, cách lấy mẫu có chủ đích và số mẫu tại mỗi địa điểm nhỏ, nghiên cứu không thực hiện kiểm định so sánh tỷ lệ giữa các địa điểm và không diễn giải số liệu như ước tính tỷ lệ lưu hành của quần thể. Các kết quả lâm sàng, phân bố RNA virus và bệnh tích được phân tích mô tả. Do nhiều mẫu mô được lấy từ cùng một cá thể kết hợp với thiết kế chọn mẫu có chủ đích nên nghiên cứu giới hạn ở thống kê mô tả và diễn giải các tỷ lệ trong phạm vi tập mẫu khảo sát.

2.2.9. Đạo đức nghiên cứu

Thí nghiệm trên động vật được thực hiện sau khi được Hội đồng Nghiên cứu và Đạo đức trong sử dụng động vật, Khoa Thú y phê duyệt (mã số: CARE-2019/02, ngày 25/12/2019). Việc nuôi, gây nhiễm, theo dõi, an tử và xử lý chất thải được thực hiện trong điều kiện an toàn sinh học cấp 3 theo quy trình của đơn vị.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phát hiện RNA virus cúm A/H9N2 trong mẫu thực địa

Trong 55 mẫu bệnh phẩm thu từ 4 trang trại, 22 mẫu dương tính với H9N2 bằng real-time RT-PCR, tương ứng tỷ lệ phát hiện là 40,0%. Tỷ lệ phát hiện dao động giữa các nhóm mẫu tại bốn trang trại. Do số mẫu tại từng địa điểm nhỏ và được thu có chủ đích từ đàn có biểu hiện bệnh, các tỷ lệ này chỉ mô tả tập mẫu khảo sát và không xác định khác biệt dịch tễ giữa địa phương hoặc ước tính tỷ lệ lưu hành trong quần thể.

Trong khảo sát tại chợ gia cầm sống năm 2014, Thuy & cs. (2016) ghi nhận H9 ở 422/468 (90,1%) mẫu gộp dương tính cúm A có Ct < 26 được lựa chọn để định phân type; tỷ lệ 90,1% này không đại diện cho toàn bộ mẫu lấy tại chợ. Gần đây, Hennessey & cs. (2026) phát hiện H9N2 ở 197/1.682 (11,7%) gà được lấy mẫu dọc mạng lưới sản xuất - phân phối tại miền Bắc Việt Nam. Sự khác biệt về quần thể đích, loại mẫu và thiết kế lấy mẫu khiến các tỷ lệ này không thể so sánh trực tiếp với 40,0% ở cấp mẫu mô của nghiên cứu hiện tại. Giá trị chính của kết quả thực địa trong nghiên cứu này là xác nhận sự hiện diện của RNA virus cúm A/H9N2 trong các mẫu mô thu từ gia cầm có biểu hiện bệnh tại các trang trại khảo sát và cung cấp nguồn mẫu cho bước phân lập virus.

3.2. Phân lập và lựa chọn chủng virus

Trong số 22 mẫu mô H9N2 dương tính, 12 mẫu cho dịch niệu mô dương tính với phản ứng HA, hiệu giá từ 3 đến 11$\log_2$. Mười một mẫu dịch có hiệu giá HA > 4$\log_2$ được kiểm tra bằng phản ứng HI. Bảy mẫu dịch có HI dương tính với H9N2 và không có phản ứng HI với H5N1 hoặc virus Newcastle được lựa chọn để tiếp truyền (Bảng 4). Bốn dịch còn lại có phản ứng HI với H5N1 hoặc virus Newcastle nên không được sử dụng cho các bước tiếp theo nhằm tránh diễn giải các dịch chưa bảo đảm tính đặc hiệu như chủng H9N2 thuần.

Khả năng tạo hiệu giá HA của dịch niệu mô cho thấy một số mẫu thực địa chứa tác nhân có khả năng nhân lên trên phôi trứng gà và gây ngưng kết hồng cầu. Bảy dịch virus đáp ứng tiêu chí HI dương tính với H9N2 và không phản ứng với H5N1 hoặc virus Newcastle được tiếp truyền ba đời để xác định hiệu giá EID_{50}. Kết quả được trình bày trong bảng 5.

Hiệu giá của bảy chủng sau ba đời tiếp truyền dao động từ $2{,}81 \times 10^5$ đến $8{,}89 \times 10^7$ EID_{50}/ml. Chủng H9N2.HY1.2 có hiệu giá cao nhất ($8{,}89 \times 10^7$ EID_{50}/ml) và được lựa chọn làm chủng đại diện cho thí nghiệm gây nhiễm trên gà. Hiệu giá này phản ánh khả năng gây nhiễm phôi trong điều kiện thí nghiệm và được sử dụng để chuẩn hóa liều công cường độc, không được xem là chỉ báo trực tiếp về độc lực trên gà. Sự khác biệt EID_{50} giữa các chủng có thể phản ánh khác biệt về lượng virus sống ban đầu trong mẫu, khả năng thích nghi và nhân lên trên trứng gà có phôi, cũng như biến thiên sinh học giữa các chủng sau quá trình tiếp truyền. Tuy nhiên, do nghiên cứu không chuẩn hóa tải lượng virus đầu vào của từng mẫu thực địa và chưa có dữ liệu trình tự gen tương ứng, nên chưa thể kết luận khác biệt hiệu giá là do một đặc điểm di truyền cụ thể, đồng thời EID_{50} cao trên phôi không đồng nghĩa với độc lực cao trên gà.

Bảng 4. Hiệu giá HA và HI của các dịch virus phân lập

Chủng	HA (log_2)	HI-H9N2 (log_2)	HI-H5N1 (log_2)	HI-NDV (log_2)	Lựa chọn
H9N2.TN2	11	9	0	0	Có
H9N2.TN3	3	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện	Không
H9N2.HY1.1	9	8	7	0	Không
H9N2.HY1.2	11	9	0	0	Có
H9N2.HY1.3	11	8	6	0	Không
H9N2.HY1.4	10	8	0	0	Có
H9N2.HY1.5	10	8	0	9	Không
H9N2.HN2	9	9	7	0	Không
H9N2.HN6	11	8	0	0	Có
H9N2.HN8	11	7	0	0	Có
H9N2.HY2.1	10	8	0	0	Có
H9N2.HY2.2	10	9	0	0	Có

Ghi chú: HA: Ngưng kết hồng cầu; HI: Ngăn trở ngưng kết hồng cầu; NDV: Virus Newcastle. Tiêu chí lựa chọn: HI dương tính với H9N2 và HI bằng 0 với H5N1, NDV.

Bảng 5. Hiệu giá EID_{50} của các chủng virus sau ba đời tiếp truyền

Độ pha loãng	H9N2.TN2	H9N2.HY1.2	H9N2.HY1.4	H9N2.HN6	H9N2.HN8	H9N2.HY2.1	H9N2.HY2.2
10^{-1}	3*/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
10^{-2}	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
10^{-3}	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
10^{-4}	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
10^{-5}	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3
10^{-6}	2/3	3/3	0/3	3/3	3/3	3/3	0/3
10^{-7}	0/3	2/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3
10^{-8}	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
10^{-9}	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
EID_{50}/ml	$8,89 \times 10^6$	$8,89 \times 10^7$	$2,81 \times 10^5$	$1,58 \times 10^7$	$2,81 \times 10^7$	$1,58 \times 10^7$	$1,58 \times 10^6$

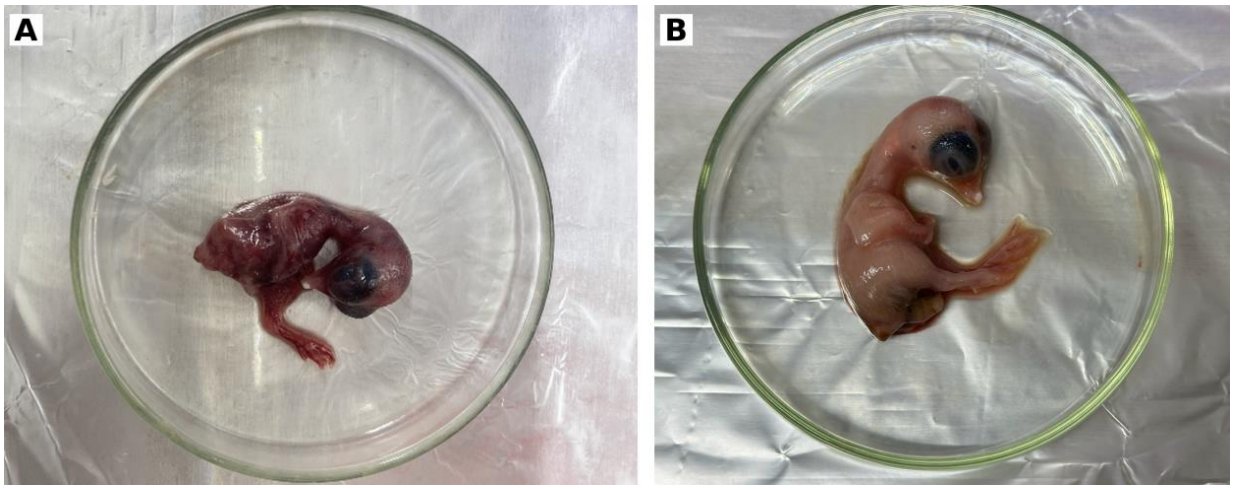
*Ghi chú: *: Số phôi có dịch niệu mô HA dương tính/số trứng gây nhiễm.*

3.3. Biểu hiện lâm sàng và tỷ lệ sống sau gây nhiễm

Không ghi nhận gà chết ở nhóm gây nhiễm hoặc đối chứng trong 28 ngày theo dõi. Nhóm đối chứng không xuất hiện triệu chứng. Ở nhóm gây nhiễm, biểu hiện lâm sàng bắt đầu từ ngày 3 và rõ nhất ở ngày 6-9 sau gây nhiễm. Giảm ăn là biểu hiện thường gặp nhất, đạt 6/10 con ở ngày 6. Ủ rũ, xù lông, giảm vận động và tiêu chảy cùng được ghi nhận ở 5/10 con tại ngày 6. Triệu chứng hô hấp gồm ho, hắt hơi hoặc chảy nước mũi xuất hiện ở 4/10 con tại ngày 6. Các biểu hiện giảm dần từ ngày 12 và không còn ghi nhận vào ngày 15 (Bảng 6).

Diễn biến trên phù hợp với đặc điểm thường gặp của nhiều virus H9N2 độc lực thấp, trong đó gà có thể không chết hoặc chỉ biểu hiện bệnh hô hấp nhẹ khi gây nhiễm đơn tác nhân. Bi & cs. (2010) ghi nhận các chủng virus cúm A/H9N2 khảo sát nhân lên ưu thế ở phổi nhưng không gây chết và hầu như không tạo biểu hiện

lâm sàng rõ trên gà sạch bệnh. Begum & cs. (2023) cũng không ghi nhận tử vong sau gây nhiễm qua đường mũi - mắt ở gà thương phẩm, mặc dù vẫn quan sát tổn thương tại khí quản, phổi và ruột. Tuy nhiên, nghiên cứu hiện tại sử dụng đường tiêm tĩnh mạch, không phải đường phơi nhiễm tự nhiên; vì vậy mức độ biểu hiện lâm sàng và phân bố tổn thương chỉ được mô tả trong giới hạn của mô hình này. Trong điều kiện thực địa, mức độ bệnh còn có thể bị ảnh hưởng bởi đồng nhiễm, điều kiện chăn nuôi và tình trạng miễn dịch của đàn.



Hình 1. Phôi trứng sau gây nhiễm dịch bệnh phẩm H9N2 (A) **và phôi đối chứng** (B)

Bảng 6. Diễn biến triệu chứng lâm sàng ở gà gây nhiễm H9N2

Triệu chứng	Ngày sau gây nhiễm (dpi)					
	0	3	6	9	12	15
Mào, tích tím tái	0/10	2/10	2/10	1/10	0/10	0/10
Ủ rũ, xù lông, vận động kém	0/10	0/10	5/10	4/10	2/10	0/10
Viêm kết mạc, phù mặt, chảy nước mắt	0/10	0/10	3/10	2/10	0/10	0/10
Bỏ ăn hoặc giảm ăn	0/10	3/10	6/10	3/10	1/10	0/10
Tiêu chảy	0/10	1/10	5/10	3/10	1/10	0/10
Triệu chứng hô hấp	0/10	1/10	4/10	3/10	1/10	0/10

Ghi chú: Giá trị trình bày là số gà có triệu chứng/số gà được theo dõi; dpi: Ngày sau gây nhiễm. Tất cả các chỉ tiêu ở nhóm đối chứng đều là 0/10.

Bảng 7. Kết quả phát hiện RNA H9N2 tại các cơ quan sau gây nhiễm

Ngày sau gây nhiễm (dpi)	Cơ quan						
	Khí quản	Phổi	Lách	Thận	Tuyến tụy	Máu	Phân
0	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
7	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	2/2
14	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	1/2
21	1/2	2/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2
28	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

Ghi chú: Giá trị trình bày là số gà có kết quả real-time RT-PCR dương tính/số gà được kiểm tra; dpi: Ngày sau gây nhiễm.

3.4. Sự phân bố RNA virus theo cơ quan và thời gian

Trước gây nhiễm, tất cả mẫu được kiểm tra đều âm tính. Tại ngày 7, RNA H9N2 được phát hiện ở khí quản, phổi, lách, thận và phân của cả 2 gà được lấy mẫu. Kết quả dương tính ở khí quản, phổi, lách và thận tiếp tục được ghi nhận tại ngày 14 và 21 với tần suất khác nhau. Đến ngày 28, RNA virus vẫn được phát hiện ở khí quản và phổi của 1/2 gà, trong khi lách, thận và phân âm tính. Không phát hiện RNA virus trong tuyến tụy hoặc máu tại bất kỳ thời điểm nào (Bảng 7).

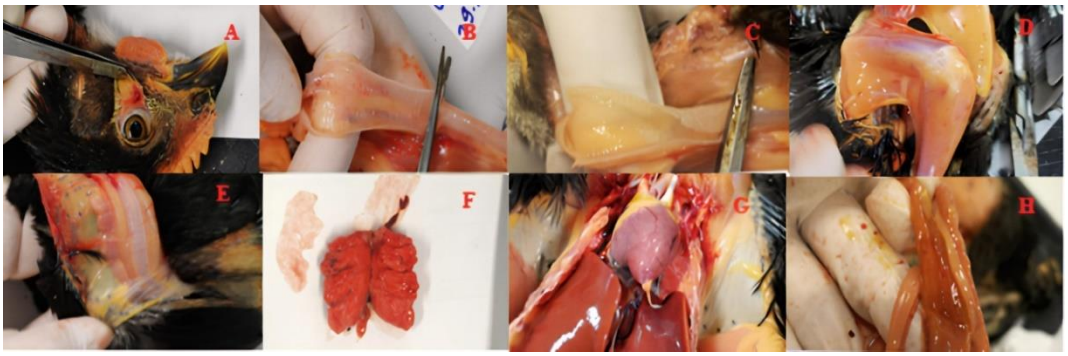
RNA virus được phát hiện kéo dài nhất tại khí quản và phổi, phù hợp với tính hướng mô hô hấp thường được mô tả đối với virus cúm A/H9N2. Bi & cs. (2010) cho thấy các chủng H9N2 khảo sát nhân lên chủ yếu ở phổi gà, trong khi lượng virus ở gan và lách thấp hoặc không phát hiện ở một số cơ quan khác. Kết quả dương tính tại lách và thận trong nghiên cứu hiện tại có thể liên quan một phần đến đường gây nhiễm tĩnh mạch, tạo điều kiện để virus hoặc RNA virus tiếp cận các mô ngoài đường hô hấp ở giai đoạn sớm. Tuy nhiên, real-time RT-PCR chỉ chứng minh sự hiện diện của RNA và không phân biệt virus còn khả năng lây nhiễm với RNA tồn lưu; vì vậy không thể khẳng định virus còn sống hoặc đang nhân lên tại tất cả các mô dương tính. Trong mô hình gây nhiễm qua đường mũi - mắt của Begum & cs. (2023), RNA H9N2 được phát hiện ở khí quản, phổi và ruột từ 1 đến 10dpi và không còn phát hiện sau 15dpi. So với nghiên cứu đó, việc phát hiện RNA đến 28dpi tại khí quản/phổi trong nghiên cứu hiện tại kéo dài hơn; tuy nhiên khác biệt về chủng virus, đường gây nhiễm, loại mẫu, thời điểm lấy mẫu và độ nhạy xét nghiệm không cho phép suy diễn trực tiếp rằng virus lây nhiễm còn tồn tại đến 28dpi. Kết quả real-time RT-PCR ở các thời điểm muộn vì vậy cần được hiểu là bằng chứng của RNA virus, không phải bằng chứng về virus còn sống hoặc còn khả năng lây nhiễm.

RNA H9N2 được phát hiện trong phân ở ngày 7 và 14 nhưng không còn ở ngày 21. Kết quả này cho thấy RNA virus có thể hiện diện trong mẫu phân trong một khoảng thời gian giới hạn của mô hình thí nghiệm, nhưng chưa đủ để khẳng định động học bài thải virus lây nhiễm. Mỗi thời điểm chỉ có 2 gà được kiểm tra và nghiên cứu không thu mẫu ngoáy hầu họng/lỗ huyệt lặp lại trên cùng cá thể. Các nghiên cứu tiếp theo nên lấy mẫu dọc theo thời gian, báo cáo giá trị Ct hoặc số bản sao RNA và phân lập virus từ mẫu ngoáy để đánh giá chính xác hơn động học bài thải.

Nhìn chung, chuỗi kết quả từ phát hiện RNA trong mẫu thực địa, phân lập trên trứng gà có phôi, gây nhiễm thực nghiệm và đánh giá bệnh lý cho thấy chủng H9N2.HY1.2 có khả năng nhân lên tốt trên phôi nhưng chỉ gây biểu hiện lâm sàng nhẹ và không gây tử vong trong mô hình khảo sát; biến đổi bệnh lý tập trung chủ yếu ở đường hô hấp, trong khi RNA virus được phát hiện tạm thời ở một số cơ quan ngoài hô hấp. Do sử dụng đường gây nhiễm tĩnh mạch, mô hình này không phản ánh đầy đủ diễn biến của nhiễm tự nhiên, nhưng minh họa giá trị của việc kết hợp xét nghiệm phân tử, phân lập virus và đánh giá thực nghiệm để đặc trưng các chủng H9N2 lưu hành. Trong bối cảnh H9N2 có khả năng cung cấp các phân đoạn gen cho các virus cúm A tái phân đoạn khác, việc tăng cường giám sát, phân lập và đặc trưng di truyền các chủng từ đàn có biểu hiện bệnh có ý nghĩa đối với kiểm soát bệnh trên gia cầm và tiếp cận Một sức khỏe (Pu & cs., 2015; Peacock & cs., 2019).

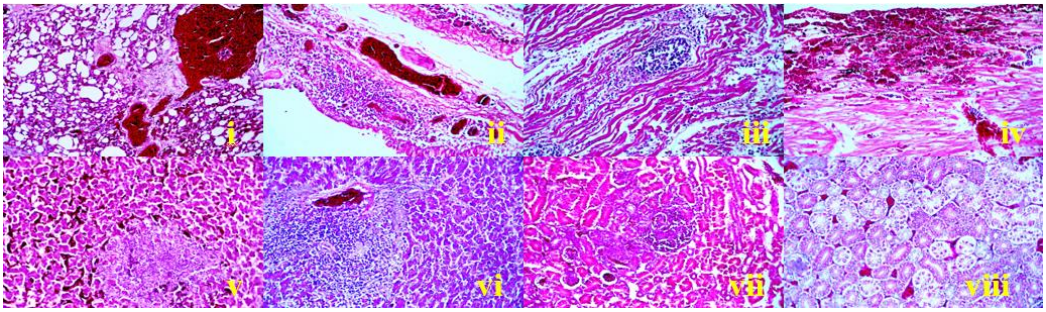
3.5. Biến đổi bệnh lý đại thể và vi thể

Ở các gà gây nhiễm được mổ khám, tổn thương đại thể nhìn chung ở mức độ nhẹ đến vừa, gồm sung huyết hoặc xuất huyết niêm mạc mắt, viêm khí quản nhẹ, dịch nhầy và xuất huyết lấm chấm ở khí quản, sung huyết phổi, sung huyết hoặc xuất huyết nhẹ tuyến ức, dịch quanh tim, lách và thận sưng, cùng một số điểm xuất huyết ở dạ dày tuyến, ruột và cơ. Không ghi nhận tổn thương đại thể rõ ở túi Fabricius và tuyến tụy. Một số tổn thương đại diện được trình bày tại hình 2.



Ghi chú: A: Xuất huyết niêm mạc mắt; B-C: Khí quản xuất huyết lấm chấm và có dịch nhầy; D: Xuất huyết cơ đùi; E: Tuyến ức xuất huyết nhẹ; F: Phổi sung huyết/xuất huyết; G: Tim sưng và có dịch quanh tim; H: Ruột xuất huyết.

Hình 2. Một số tổn thương đại thể ở gà gây nhiễm H9N2



Ghi chú: i: Phổi sung huyết/xuất huyết (H&E, 40X); ii: Thâm nhiễm tế bào viêm tại biểu mô phế quản (H&E, 40X); iii: Viêm cơ tim (H&E, 40X); iv: Xuất huyết vùng ngoại tâm mạc (H&E, 40X); v-vi: Ổ hoại tử ở gan (H&E, 40X); vii: Tổn thương cầu thận (H&E, 40X); viii: Thoái hóa tế bào ống thận (H&E, 40X).

Hình 3. Biến đổi bệnh lý vi thể ở gà gây nhiễm H9N2

Ở nhóm đối chứng, cấu trúc vi thể của khí quản, phổi, tim, gan, thận, tuyến ức, tuyến tụy và ruột không ghi nhận biến đổi đáng chú ý. Ở nhóm gây nhiễm, khí quản có phù nề và thâm nhiễm khu trú tế bào viêm đơn nhân; phổi có sung huyết, phì đại cơ trơn phế quản và thâm nhiễm tế bào viêm. Tim xuất hiện sung huyết, viêm cơ tim và xuất huyết vùng ngoại tâm mạc. Gan có sung huyết, phù nề, tăng sinh ống mật, không bào và hoại tử tế bào gan kèm thâm nhiễm tế bào đơn nhân. Thận có viêm cầu thận, xuất huyết kẽ, thoái hóa hoặc hoại tử tế bào ống thận. Tuyến tụy có thoái hóa không bào và apoptosis biểu mô nang tuyến; ruột có dày niêm mạc, thâm nhiễm tế bào viêm đơn nhân và hoại tử biểu mô (Hình 3).

Các tổn thương tại khí quản và phổi phù hợp với các mô tả trước đây, trong đó đường hô hấp là vị trí tổn thương nổi bật sau nhiễm H9N2 (Nili & Asasi, 2002; Bi & cs., 2010; Begum & cs., 2023). Việc ghi nhận biến đổi ở thận, gan, tim và ruột cho thấy tổn thương trong mô hình thí nghiệm không chỉ giới hạn ở hệ hô hấp. Tuy nhiên, tổn thương mô học không đồng nghĩa với bằng chứng virus nhân lên trực tiếp tại cơ quan. Trong nghiên cứu này, RNA được phát hiện ở lách và thận nhưng không có kết quả xét nghiệm đối với gan hoặc tim; do đó, cơ chế của các tổn thương ngoài hô hấp chưa thể xác định. Các biến đổi quan sát được có thể liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp đến nhiễm virus, đáp ứng viêm toàn thân, đường tiêm tĩnh mạch hoặc các yếu tố nền của động vật thí nghiệm

4. KẾT LUẬN

RNA virus cúm A/H9N2 được phát hiện trong 22/55 mẫu mô thu từ gia cầm có biểu hiện

bệnh tại bốn trang trại khảo sát, tương ứng tỷ lệ phát hiện 40,0% ở cấp mẫu mô. Mười hai mẫu cho dịch niệu mô có hoạt tính HA và bảy chủng đáp ứng tiêu chí HI được lựa chọn để tiếp truyền; H9N2.HY1.2 đạt hiệu giá cao nhất, $8,89 \times 10^7$ EID_{50}/ml. Trong mô hình gây nhiễm tĩnh mạch trên gà 21 ngày tuổi, chủng này không gây tử vong nhưng tạo các biểu hiện lâm sàng nhẹ, rõ nhất ở 6-9dpi. RNA virus được phát hiện kéo dài nhất tại khí quản và phổi đến 28dpi, đồng thời xuất hiện tạm thời ở lách, thận và phân. Biến đổi bệnh lý đại thể và vi thể chủ yếu được ghi nhận ở đường hô hấp và một số cơ quan ngoài hô hấp. Các kết quả này đặc trưng cho tập mẫu khảo sát và mô hình gây nhiễm tĩnh mạch, không đại diện cho tỷ lệ lưu hành hoặc diễn biến của nhiễm tự nhiên. Giải trình tự các gen HA/NA và gây nhiễm qua đường hô hấp tự nhiên hơn sẽ cần thiết để làm rõ dòng di truyền, các dấu ấn phân tử và đặc điểm gây bệnh của chủng. Về ý nghĩa thực tiễn, kết quả nhấn mạnh nhu cầu giám sát virus cúm A/H9N2 ở các đàn gia cầm có biểu hiện hô hấp, kết hợp phân lập và giải trình tự virus để theo dõi biến đổi di truyền, nhận diện sớm các chủng có đặc tính bất thường và hỗ trợ đánh giá nguy cơ đối với chăn nuôi cũng như sức khỏe cộng đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Begum J.A., Hossain I., Nooruzzaman M., King J., Chowdhury E.H., Harder T.C. & Parvin R. (2023). Experimental pathogenicity of H9N2 avian influenza viruses harboring a tri-basic hemagglutinin cleavage site in Sonali and broiler chickens. Viruses. 15(2): 461. https://doi.org/10.3390/v15020461.

Bi J., Deng G., Dong J., Kong F., Li X., Xu Q., Zhang M., Zhao L. & Qiao J. (2010). Phylogenetic and molecular characterization of H9N2 influenza isolates from chickens in northern China from 2007-2009. PLoS ONE. 5(9): e13063. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013063.

Bi Y., Li J. & Shi W. (2022). The time is now: a call to contain H9N2 avian influenza viruses. The Lancet Microbe. 3(11): e804-e805. https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00232-4.

Bộ Khoa học và Công nghệ (2014). TCVN 8400-26:2014. Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán - Phần 26: Bệnh cúm gia cầm H5N1.

Bộ Khoa học và Công nghệ (2026). TCVN 8400-59:2026. Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán - Phần 59: Bệnh cúm gia cầm A/H9N2.

Carnaccini S. & Perez D.R. (2020). H9 influenza viruses: an emerging challenge. Cold Spring Harb Perspect Med. 10(6): a038588. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038588.

Hennessey M., Thi T.H., Raghwani J., Kim Y., Pham H.T.T., Nguyen T.H., Nguyen H.Q., Lynton-Jenkins J.G., Banyard A.C., Brown I.H., James J., Lewis T., Lewis N.S., Pfeiffer D., Tomley F., Blake D., Thi N.P., Conan A., Bui V.N. & Fournié G. (2026). Avian influenza A (H9N2) virus transmission across chicken production and distribution networks, Vietnam. Emerg Infect Dis. 32(2): 259-264. https://doi.org/10.3201/eid3202.251416.

Nagy A., Mettenleiter T.C. & Abdelwhab E.M. (2017). A brief summary of the epidemiology and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the Middle East and North Africa. Epidemiol Infect. 145(16): 3320-3333. https://doi.org/10.1017/S0950268817002576.

Nili H. & Asasi K. (2002). Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. Avian Pathol. 31(3): 247-252. 10.1080/03079450220136567.

Peacock T.P., James J., Sealy J.E. & Iqbal M. (2019). A global perspective on H9N2 avian influenza virus. Viruses. 11(7): 620. 10.3390/v11070620.

Pu J., Wang S., Yin Y., Zhang G., Carter R.A., Wang J., Xu G., Sun H., Wang M., Wen C., Wei Y., Wang D., Zhu B., Lemmon G., Jiao Y., Duan S., Wang Q., Du Q., Sun M., Bao J., Sun Y., Zhao J., Zhang H., Wu G., Liu J. & Webster R.G. (2015). Evolution of the H9N2 influenza genotype that facilitated the genesis of the novel H7N9 virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 112(2): 548-553. https://doi.org/10.1073/pnas.1422456112.

Reed L.J. & Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Epidemiol. 27(3): 493-497. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.

Sealy J.E., Fournie G., Trang P.H., Dang N.H., Sadeyen J.R., Thanh T.L., van Doorn H.R., Bryant J.E. & Iqbal M. (2019). Poultry trading behaviours in Vietnamese live bird markets as risk factors for avian influenza infection in chickens. Transbound Emerg Dis. 66(6): 2507-2516. https://doi.org/10.1111/tbed.13308.

Thuy D.M., Peacock T.P., Bich V.T.N., Fabrizio T., Hoang D.N., Tho N.D., Diep N.T., Nguyen M., Hoa L.N.M., Trang H.T.T., Choisy M., Inui K., Newman S., Trung N.V., van Doorn H.R., Thanh T.L., Iqbal M. & Bryant J.E. (2016). Prevalence and diversity of H9N2 avian influenza in chickens of Northern Vietnam, 2014. Infect Genet Evol. 44: 530-540. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.038.