

NGHIÊN CỨU SỰ LƯU HÀNH CỦA FOWL ADENOVIRUS Ở GÀ NUÔI TẠI HÀ NỘI VÀ VÙNG PHỤ CẬN

Lê Văn Trường*, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Nguyễn Văn Giáp

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

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

Ngày nhận bài: 02.01.2020

Ngày chấp nhận đăng: 17.06.2020

TÓM TẮT

Fowl Adenovirus (FAdV) serotype 4 được coi là tác nhân chính gây hội chứng viêm gan - viêm ngoại tâm mạc tích nước (hydropericardium-hepatitis syndrome - HHS), trong khi đó viêm gan thể bao hàm (inclusion body hepatitis - IBH) có thể do cả 12 serotype FAdV gây ra. Cho đến nay, ở Việt Nam chưa có báo cáo nào chỉ ra sự lưu hành của FAdV, do đó nghiên cứu của chúng tôi nhằm tìm hiểu sự lưu hành của FAdV ở gà nuôi tại Hà Nội và vùng phụ cận. Tổng số 145 mẫu phủ tạng gà nghi mắc bệnh được chiết tách DNA, sau đó sử dụng kỹ thuật PCR để phát hiện ra FAdV có trong các mẫu nghiên cứu. Các mẫu PCR dương tính với FAdV được tinh sạch và đem đi giải trình tự. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra, có sự lưu hành của FAdV ở gà nuôi tại Hà Nội và vùng phụ cận. Có 30 mẫu dương tính với FAdV trong tổng số 145 mẫu nghiên cứu, chiếm 20,69%. Kết quả giải trình tự phân đoạn gen hexon của FAdV và phân loại theo phả hệ đã xác định được 7 chủng FAdV lưu hành ở Việt Nam gồm các chủng có ký hiệu là: F3, F5, F6, F7, F8, F9, F11. Kết quả phân tích dịch tễ học phân tử cũng cho thấy 7 chủng FAdV trên thuộc 3 loài FAdV-C, FAdV-D, FAdV-E, không có chủng nào thuộc loài FAdV-A và FAdV-B.

Từ khóa: Fowl Adenovirus (FAdV), PCR, gà, sự lưu hành.

The Prevalence of Fowl Adenovirus (FAdV) in Chickens Raised in Hanoi and Its Vicinity

ABSTRACT

Fowl Adenovirus (FAdV) serotype 4 is considered to be the main cause of hydropericardium-hepatitis syndrome (HHS); meanwhile, inclusion body hepatitis (IBH) may be caused by all 12 serotype FAdV. So far, in Vietnam, studies on the prevalence of FAdV strains have not been available. Therefore, our study aimed to find the prevalence of FAdV strains in chicken raised in Hanoi and its vicinity. A total of 145 samples of organs of suspected chicken collected were extracted for DNA, then PCR techniques were used to detect FAdV in the samples. PCR samples found positive for FAdV were then purified and sequenced. The results indicated that there was a prevalence of FAdV in chicken raised in Hanoi and its vicinity. There were 30/145 (20.69%) of samples found FAdV-positive. The sequencing of FAdV hexon gene also identified 7 FAdV strains circulating in Vietnam, coded as F3, F5, F6, F7, F8, F9, F11; the sequences of hexon genes of 7 FAdV strains were very diverse. The results of FAdV molecular analysis also revealed that 7 strains of FAdV isolated in Vietnam belonged to 3 species FAdV-C, FAdV-D, FAdV-E, with no strains of FAdV-A and FAdV-B.

Keywords: Fowl Adenovirus (FAdV), chickens, PCR, prevalence.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh viêm gan thể bao hàm ở gà được mô tả lần đầu tiên tại Mỹ vào năm 1963 (Helmboldt & Frazier, 1963). Từ đó đến nay, bệnh được ghi nhận ở nhiều nơi trên thế giới như Canada, Anh, Úc, Italia, Pháp và Ailen (Howell & cs.,

1970), hiện nay ngày càng có dấu hiệu cho thấy bệnh đang tiếp tục gia tăng (McFerran & Smyth, 2000). Bệnh ảnh hưởng đến gà broiler từ 3-7 tuần tuổi (Winterfield & cs., 1972; Hess, 2013), mặc dù gà nhỏ 7 ngày tuổi hoặc gà lớn 20 tuần tuổi cũng có thể bị mắc (Hess, 2013). Năm 1987, một hội chứng mới với tên gọi viêm

bao tim tích nước (Hydropericardium syndrome - HPS) hay còn gọi là bệnh Angara được phát hiện tại Pakistan (Khawaja & cs., 1988), sau đó được ghi nhận tại Ấn Độ, Kuwait, Iraq, Mexico, miền Nam và Trung Mỹ, Nhật và Nga. Tại vùng Nam và Trung Mỹ, bệnh sau đó được chẩn đoán là bệnh viêm gan thể bao hàm (Inclusion body Hepatitis - IBH) (Abe & cs., 1998; Hess & cs., 1999; Toro & cs., 1999).

Fowl Adenovirus (FAdV) là nguyên nhân gây nên bệnh viêm gan thể bao hàm, hội chứng xoang bao tim tích nước (hydropericardium syndrome - HPS), bệnh sỏi mòn dạ dày (gizzard erosion) và viêm sưng dây chằng, viêm khớp (tenosynovitis) (Hess, 2013). FAdV được xếp vào giống *Aviadenovirus* và họ *Adenoviridae* (ICTVdB Management, 2006). Adenovirus ở gà được chia thành 3 nhóm là nhóm I, II và III. Trong đó; FAdV thuộc nhóm adenovirus I (ICTVdB Management, 2006) và được chia nhỏ thành 5 loài và 12 serotype dựa vào phản ứng cắt men giới hạn và phản ứng trung hòa chéo; gồm có 5 loài: Loài A (serotype 1), loài B (serotype 5), loài C (serotype 4 và 10), loài D (serotype 2, 3, 9 và 11) và loài E (serotype 6, 7, 8a và 8b) (Hess, 2000). FAdV là những virus hình cầu, không có vỏ bọc bên ngoài, nhân là ADN sợi đôi với đường kính dao động từ 70 đến 100nm (Home, 1962; Macpherson & cs., 1961). Hạt virus bao gồm 252 capsomer sắp xếp theo 12 bề mặt hình tam giác với 6 capsomer theo chiều dài mép (Macpherson & cs., 1961; Watson, 1963). Có ít nhất 13 protein trong adenovirus virion, bao gồm II-IX, IIIa, Iva2, protein đầu cuối (TP), μ , và p23, protease virus (Russell, 2009). Triệu chứng đầu tiên có thể quan sát được khi bị bệnh là gà bị xù lông, gập đầu về phía trước và chết đột ngột (Hess, 2000;). Khi mổ khám gà bị bệnh thường thấy gan gà bị nhạt màu, sưng to và xuất huyết (Pattison & cs., 2008). Hiện tượng thiếu máu, hoàng đản da và mỡ ở tổ chức dưới da, xuất huyết các khí quan cũng được mô tả. Hội chứng xoang bao tim tích nước thường xảy ra ở gà hướng thịt từ tuần tuổi thứ 3-6, tỷ lệ chết dao động từ 20-80% (Hess, 2013). Khi xảy ra ở gà giống và gà đẻ, tỷ lệ chết thấp hơn. Đặc trưng của bệnh là xoang bao tim tích nhiều nước

trong (có thể lên đến 10ml), phổi bị phù thũng, gan sưng to, thận sưng to và nhạt màu (Hess, 2013). Hiện tại ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về FAdV ở gà, tuy nhiên qua quan sát triệu chứng và mổ khám bệnh tích, chúng tôi thấy có rất nhiều gà có các biểu hiện bệnh tương tự bệnh viêm gan thể bao hàm, hội chứng bao tim tích nước mà chưa rõ nguyên nhân. Do vậy, chúng tôi tiến hành thu thập mẫu bệnh phẩm ở những nơi có gà biểu hiện các dấu hiệu bệnh tương tự thuộc Hà Nội và vùng phụ cận để phục vụ nghiên cứu; dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử (phản ứng PCR) với các cặp mồi đặc hiệu để phát hiện FAdV. Từ đó cho phép tiến hành các nghiên cứu tiếp theo về FAdV tại Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm được thu thập ngẫu nhiên tại 18 trại gà ở Hà Nội và khu vực lân cận là các tỉnh Bắc Ninh, Hưng Yên và Phú Thọ. Chúng tôi đã thu thập 145 mẫu phủ tạng của gà nghi nhiễm FAdV, mẫu bao gồm: các cơ quan phủ tạng khác nhau của những con gà bị bệnh, đặc biệt là tim và gan, ruột, túi bursal Fabricius trong điều kiện vô trùng. Những mẫu mô này được bảo quản trong hộp đá trong vòng 4h đến phòng thí nghiệm để bảo quản trong tủ lạnh. Các mẫu được lưu trữ ở -80°C cho đến khi phân tích. Mẫu được phân tích tại phòng thí nghiệm Bộ môn Vi sinh vật - Truyền nhiễm, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Tách chiết DNA virus

DNA tổng số được chiết tách từ 10% huyền phù mô gồm các bước sau: (i) Ly giải mẫu (huyền phù mô 250 μ l) trong dung dịch 500 μ l proteinl sucrose/proteinase K (4 μ l proteinase K + 500 μ l lysis Buffer) ở 56°C/90 phút hoặc 37°C/12 giờ; (ii) Tách pha DNA bằng phenol-chloroform- isoamyl (PCI - 25:24:1) (200 μ l): Thêm 200 μ l dung dịch PCI vào ống mẫu sau khi ly giải; vortex/ly tâm 12.000 vòng/phút, ở 4°C; (iii) Tủa DNA bằng cách: Sử dụng ống eppendorf mới, trộn 450 μ l isopropyl + 450 μ l

dung dịch nổi phía trên, trộn đều; kết tủa DNA ở $-20^{\circ}\text{C}/15$ phút, sau đó ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút, ở 4°C ; (iv) Rửa kết tủa DNA bằng 1ml ethanol 70% (pha trong nước cất đã xử lý DEPC), ly tâm (12.000 vòng/phút ở 4°C); (v) Loại bỏ hết cồn, hong khô ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, sau đó hòa tan tủa AND trong 30 μl dung dịch đệm TE (pH 8.0).

2.3. Phương pháp thực hiện phản ứng PCR để phát hiện FAdV

DNA chiết tách được sử dụng cho phản ứng PCR để khuếch đại một phần gen hexon của FAdV. Nghiên cứu này đã sử dụng: (i) Bộ Kít PCR (i-StarMaster, iNtRON Biotech, Korea); (ii) Cặp mồi FAVL/FAVR được thiết kế bởi Ganesh & cs. (2002) để phát hiện và giải trình tự một phần gen hexon của FAdV. Thành phần của phản ứng PCR (20 μl) được phối trộn theo hướng dẫn của nhà sản xuất, trong đó: 17 μl water 3DW + 1 μl mồi xuôi + 1 μl mồi ngược + 1 μl ADN mẫu tách chiết. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm 5 giai đoạn tương ứng với cặp mồi như sau: Biến tính ban đầu ở $94^{\circ}\text{C}/180$ giây; lặp lại 40 chu kỳ ($94^{\circ}\text{C}/15$ giây, $58^{\circ}\text{C}/30$ giây, $72^{\circ}\text{C}/60$ giây) và 5 phút ở 72°C với bước kéo dài cuối cùng. Các sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose có bổ sung 1,5 μl thuốc nhuộm RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution 1x (iNtRON Biotechnology, Korea).

2.4. Giải trình tự gen Hexon của FAdV và phân tích cây phát sinh chủng loại (phylogenetic tree)

Các sản phẩm PCR tinh khiết (0,7 kb) được khuếch đại từ gen hexon sử dụng mồi FAVL/FAVR (Ganesh & cs., 2002) được giải trình tự bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Các trình tự nucleotide và axit amin của các chủng FAdV được dịch và nhận dạng trình tự bởi phần mềm BioEdit v7.1.3.0 (Hall, 1999). Sau đó, tất cả các trình tự giải trình được căn chỉnh ban đầu bằng chương trình căn chỉnh CLUSTAL X (Thompson & cs., 1997).

Mối quan hệ di truyền của FAdV (phylogenetic tree) được xây dựng dựa trên một

phần trình tự gen mã hóa protein hexon (608 nucleotid). Phần mềm MEGA6 (Tamura & cs., 2013) được dùng để xây dựng cây phát sinh chủng loại với các tham số phát sinh đầu vào như sau: (i) phương pháp suy diễn cây phát sinh chủng loại là Neighbor - Joining; (ii) mô phỏng sự thay đổi nucleotide giữa các trình tự gen dựa vào mô hình Tajima - Nei và có sự hiệu chỉnh sự biến động giữa các nucleotide; (iii) mức tin cậy của các nhánh của cây phát sinh chủng loại được ước tính bằng phép thử bootstrap lặp lại 1.000 lần. Các trình tự tham chiếu dựa theo công bố trước đây (McFerran & Smyth, 2000; Meulemans & cs., 2004).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

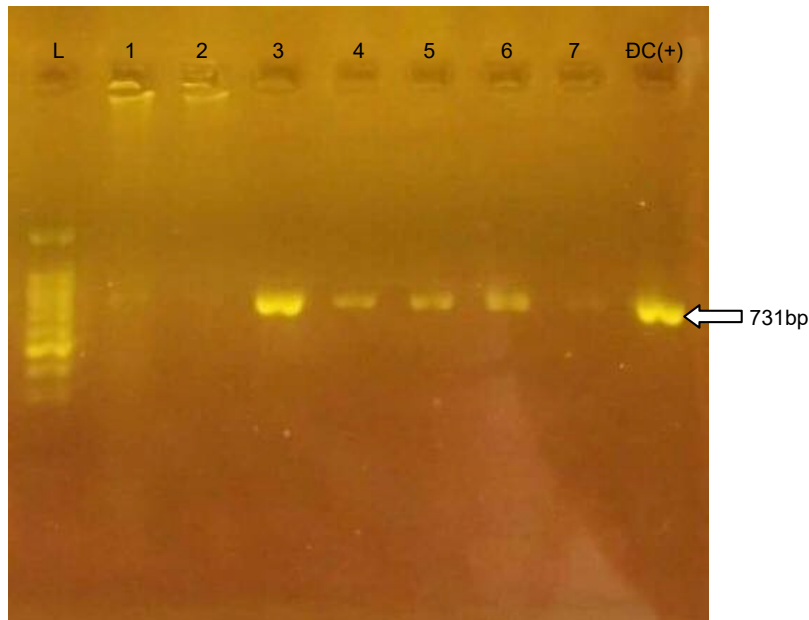
3.1. Kết quả khảo sát sự lưu hành của FAdV tại Hà Nội và vùng phụ cận

Nghiên cứu của chúng tôi tập trung vào việc phát hiện FAdV ở gà nuôi tại Hà Nội và vùng phụ cận được thu thập vào năm 2018. Kết quả PCR phát hiện FAdV (Hình 1) cho thấy việc áp dụng điều kiện tối ưu của phản ứng PCR với các mẫu thực địa từ số 1 đến mẫu số 7 đều có vạch sạch phẩm tương ứng với mẫu đối chứng dương (là mẫu được phân lập từ phủ tạng gà nghi mắc bệnh thu thập ở Hà Nội trước đó và cho vạch sản phẩm dương tính với cặp mồi phát hiện FAdV), không thấy xuất hiện bất kỳ vạch không đặc hiệu nào. Như vậy, điều kiện của phản ứng PCR và cặp mồi hiện thời hoạt động tốt. Kết quả cho thấy có 30/145 (20,69%) mẫu dương tính với FAdV, trong 18 trại được kiểm tra có 10/18 trại với tỷ lệ 55,56% phát hiện có sự lưu hành của FAdV.

FAdV được ghi nhận là xuất hiện ở nhiều nơi trên thế giới; gà bị mắc FAdV, triệu chứng đầu tiên có thể quan sát được khi bị bệnh là gà bị xù lông, gập đầu về phía trước và chết đột ngột (Hess, 2000). Những con còn lại có thể không có triệu chứng hoặc giảm khả năng tăng trọng (Saif & cs., 2008). Tỷ lệ ốm do IBH thường thấp (Howell, 1970; Hess, 2013), tỷ lệ chết thường khoảng từ 5-10% nhưng đôi khi có thể lên đến 30% (Hess, 2013). Dar & cs. (2012) đã báo cáo rằng khi gây bệnh thực nghiệm trên gà

2 ngày tuổi và 2 tuần tuổi với FAdV-8b cho kết quả tỷ lệ tử vong tương ứng 83% và 43%. Trong nghiên cứu của chúng tôi đã xác định được 30/145 với tỷ lệ 20,69% mẫu dương tính, như vậy kết quả của chúng tôi phù hợp với các kết

quả nghiên cứu về tỷ lệ lưu hành của FAdV trên thế giới đã công bố trước đó. Gà có kết quả dương tính với FAdV biểu hiện một số bệnh tích như gan, lách xuất huyết, sưng to như minh họa ở hình 2 và hình 3.



Ghi chú: L: 1kb Marker DNA Giếng 1-7: mẫu thực địa; Giếng 8 mẫu đối chứng dương tính.

Hình 1. Sản phẩm PCR 731 bp của gen hexon - FAdV bằng phương pháp điện di trên gel agarose sau khi nhuộm bằng dung dịch nhuộm Red safe DNA nucleic acid staining solution (iNtRON Biotechnology, Korea)



Hình 2. Gan gà sưng to, xuất huyết



Hình 3. Lách sưng to

3.2. Kết quả phân tích trình tự nucleotide gen hexon của FAdV

Trong bộ gen của FAdV, gen Hexon là một trong những khung đọc mã hóa các protein cấu trúc chính cho tính đặc hiệu của kháng nguyên bề mặt capsid của hạt virion FAdV (Meulemans, 2001). Trong nghiên cứu này, chúng tôi giải trình tự protein mã hóa Hexon của FAdV, xác định các thay đổi trong cấu trúc gen, cấu trúc axit amin mã hóa cho protein virus; để có thể so sánh đặc tính sinh học phân tử giữa các chủng FAdV khác nhau. Sau khi tiến hành kỹ thuật PCR, sản phẩm được tinh sạch để loại bỏ hết các thành phần dư thừa sau phản ứng. Sản phẩm sau khi tinh sạch là DNA của virus sẽ được gửi đi để giải trình tự gen thực hiện bằng máy giải trình tự tự động. Trong 30 mẫu dương tính đối với mỗi được xác định FAdV, chúng tôi đã chọn 14 mẫu để tiến hành giải trình tự gen. Qua phân tích giản đồ giải trình tự (chromatogram) của các sản phẩm nhân lên bởi cặp mồi FAVHL/FAVHR, chúng tôi nhận thấy có 7 mẫu được giải trình tự thành công, trong 7 trình tự này, ở mỗi vị trí nucleotide đều có đỉnh tín hiệu rõ ràng. Trên giản đồ trình tự gen được giải mã, ở mỗi vị trí nucleotide chỉ phát hiện được một đỉnh tín hiệu và không quan sát được sự đa hình nucleotide. Dựa vào kết quả phân tích cây phát sinh gen ở hình 6 cho thấy 7 chủng FAdV được phân lập thuộc 3 loài: FAdV-C (chủng F5), FAdV-D (F3, F8) và FAdV-E (chủng F6, F7, F9, F11). Do vậy, chúng tôi tiến hành phân tích giản đồ của 7 sản phẩm được nhân lên bằng cặp mồi FAVHL/FAVHR (Ganesh & cs., 2002) với các chủng tham chiếu tương ứng với từng loài để so sánh. Cụ thể FAdV-C (chủng F5) so sánh với chủng Fowl adenovirus C isolate 5997 hexon protein gene, (mã số truy cập ngân hàng Genbank: HM592281), FAdV-D (F3, F8) so sánh với Fowl adenovirus 2 chủng SR48 hexon gene thuộc FAdV loài D (mã số truy cập ngân hàng Genbank: AF508946) và FAdV-E (chủng F6, F7, F9, F11) so sánh với Fowl adenovirus 8 chủng TR59 hexon gene thuộc FAdV loài E (mã số truy cập ngân hàng Genbank: AF508956). Kết quả thể hiện ở hình 4 cho thấy mỗi vị trí nucleotide đều có đỉnh tín hiệu rõ ràng. Trên giản đồ trình

tự gen được giải mã, chỉ có thể phát hiện một đỉnh tín hiệu ở mỗi vị trí nucleotide và không quan sát thấy sự đa hình nucleotide. Phân đoạn gen hexon "." dấu hiệu cho thấy các vị trí nucleotide tương tự như trình tự tham chiếu. Khi so sánh trình tự gene hexon của chủng FAdV-F5 trong nghiên cứu này với chủng FAdV tham chiếu khác trước đây thu thập trên ngân hàng GenBank (Hình 4A) cho thấy mức độ tương đồng về nucleotide là 99,6% có đến 2 sự sai khác về trình tự nucleotide ở vị trí 131(A ↔ T) và 421 (A ↔ G). Khi so sánh trình tự gene hexon của chủng FAdV-F6, F7, F9, F11 trong nghiên cứu này với chủng FAdV tham chiếu khác trước đây thu thập trên ngân hàng GenBank (Hình 4B) cho thấy mức độ tương đồng về nucleotide dao động từ 79,7% đến 96,9%. Trong đó, giữa chủng F6 với chủng tham chiếu có đến 17 vị trí nucleotide có sự sai khác về trình tự, giữa F7 với chủng tham chiếu có đến 123 vị trí nucleotide có sự sai khác về trình tự, giữa F9 và chủng tham chiếu là 22 vị trí nucleotide có sự sai khác về trình tự, giữa F11 với chủng tham chiếu có đến 124 vị trí nucleotide có sự sai khác về trình tự. Ngoài ra, một số chủng có đột biến mất nucleotide khi so sánh với chủng tham chiếu như chủng F7 đột biến mất nucleotide ở vị trí 626, F9 ở vị trí 509. Đột biến xóa nucleotide ở các vị trí khác nhau của gen Hexon đã được phát hiện trong nhiều chủng FAdV lưu hành ở nhiều quốc gia, với số lượng loại bỏ nucleotide rất đa dạng: từ 33 đến 66 nucleotide (Jianqiang & cs., 2016; Ru & cs., 2018). Chức năng sinh học của gen đột biến xóa nucleotide vẫn chưa rõ ràng. Tuy nhiên, một nghiên cứu gần đây của Pedro & cs. (2016) đã chỉ ra, serotype 4 FAdV phân lập với ORF19 bị đột biến cắt bớt nucleotide cho thấy có độc lực cao hơn so với các chủng có ORF19 đầy đủ. Phát hiện này cho thấy, các chủng FAdV trong nghiên cứu của chúng tôi có thể liên quan đến khả năng gây bệnh cao. Khi so sánh trình tự gene hexon của chủng FAdV-F3, F8 trong nghiên cứu này với chủng FAdV tham chiếu khác trước đây thu thập trên ngân hàng GenBank (Hình 4C) cho thấy mức độ tương đồng về nucleotide dao động từ 91,3% đến 97,3%, trong đó, khi so sánh trình tự gene hexon của chủng FAdV-F3 với chủng FAdV tham

chiều có đến 58 vị trí có sự sai khác về trình tự nucleotide, giữa chủng FAdV-F3 với chủng FAdV tham chiếu có 57 vị trí có sự sai khác về trình tự nucleotide. Với các trình bày nêu trên, có thể thấy rõ tính đa hình nucleotide của các chủng FAdV mà chúng tôi giải trình tự gen. Fowl adenoviruses (FAdVs) thuộc nhóm I adenovirus (ICTVdB Management, 2006); nhóm adenovirus I được chia thành 5 loài và 12 serotype dựa trên cấu trúc phân tử, phản ứng enzyme hạn chế và phản ứng trung hòa chéo (Hess, 2000); trong đó 5 loài bao gồm: loài A (serotype 1), loài B (serotype 5), loài C (serotype 4 và 10), loài D (serotype 2, 3, 9 và 11) và loài E (serotype 6, 7, 8a và 8b). Có rất nhiều trình tự nucleotide khác nhau giữa 12 serotype FAdV khi so sánh các đoạn Hexon A/B của các chủng FAdV tham chiếu bằng phương pháp đa hình giới hạn đoạn (RFLP: Restriction fragment length polymorphism) (Meulemans, 2001). Vì vậy, kết quả của chúng tôi đã chỉ ra rằng 7 chủng virus được giải trình tự thuộc về các kiểu gen FAdV khác nhau. Đặc điểm này phù hợp với sự hiểu biết đối với FAdV về đa dạng kiểu gen và kiểu huyết thanh trên thế giới (Hess, 2000; Meulemans & cs., 2004).

3.3. Kết quả phân tích trình tự axit amin của protein hexon

Đoạn gen hexon đã được giải trình tự trong nghiên cứu này mã hóa cho hơn 200 codon, trình tự axit amin đã suy diễn của đoạn hexon protein được thể hiện trong hình 5.

Ngoài việc phân tích về trình tự nucleotide, chúng tôi cũng tiến hành phân tích về trình tự axit amin suy diễn (deduced amino acid) của gene hexon của các chủng FAdV. Kết quả phân tích về trình tự axit amin của gene hexon ở hình 5 cho thấy chủng F5 với chủng tham chiếu có sự tương đồng cao với nhau (Hình 5A), chỉ có 2 vị trí sai khác về axit amin (44: L↔H; 143: R↔G) tương ứng với các vị trí có sự sai khác nucleotide. Khi so sánh sự tương đồng axit amin giữa các chủng FAdV-F6, F7, F9, F11 với chủng tham chiếu (Hình 5B) cho thấy giữa các chủng có sự sai khác trình tự axit amin. Trong đó, giữa FAdV-F6 với chủng tham chiếu có 16 vị trí có sự sai khác về trình tự axit amin, giữa FAdV-F7

với chủng tham chiếu có 86 vị trí sai khác, giữa chủng FAdV- F9 và chủng tham chiếu có 19 vị trí có sự sai khác về trình tự axit amin, giữa chủng FAdV- F11 và chủng tham chiếu có 83 vị trí có sự sai khác về trình tự axit amin. Khi so sánh sự tương đồng axit amine giữa các chủng FAdV-F3, F8 với chủng tham chiếu (Hình 5C) cũng có sự sai khác về trình tự axit amin, có 43 vị trí có sự sai khác về trình tự axit amin giữa chủng FAdV-F3, F8 với chủng tham chiếu. Theo những phát hiện của Meulemans & cs. (2001), ở mức axit amin, FAdV4 cho thấy tỷ lệ tương đồng 51% với FAdV1, 91% với FAdV9 và 46-48% với các adenovirus khác. Các chuỗi axit amin giữa các chuỗi hexon FAdV1 đến FAdV12 cho vùng vòng L1 khác nhau rất nhiều. Vì vậy, kết quả của chúng tôi có thể xác nhận rằng 7 chuỗi axit amin đã suy ra của phân đoạn protein hexon thuộc về các kiểu huyết thanh khác nhau của FAdV.

3.4. Kết quả phân tích đặc điểm dịch tễ học phân tử của FAdV

Trình tự gen mã hóa protein hexon từ axit amin 121 đến 324 đã được sử dụng để nghiên cứu các đặc điểm dịch tễ học phân tử của các chủng FAdV phân lập ở Việt Nam và so sánh với các chủng lưu hành trên thế giới (Hình 6). Các chủng FAdV với các nhóm di truyền đã biết được sử dụng làm tham chiếu. Có 7 chủng FAdV đã giải trình tự gen trong nghiên cứu này được so sánh với các trình tự khác nhau trên thế giới. Kết quả phân tích cây phả hệ cho thấy 7 chủng FAdV được phân lập thuộc 3 loài: FAdV-C (chủng F5), FAdV-D (F3, F8) và FAdV-E (chủng F6, F7, F9, F11). Không có chủng nào thuộc loài FAdV-A hoặc loài FAdV-B. Có 4/7 chủng đã được xác định được có quan hệ di truyền gần với một số serotype trong từng loài bao gồm F6; F9 tương đồng với loài FAdV-E serotype 8a; F7 tương đồng với loài FAdV-E serotype 7; F5 tương đồng với loài FAdV-C serotype 4. Với kết quả phân loại ở trên, có thể thấy các chủng FAdV lưu hành trong khu vực lấy mẫu là đa dạng di truyền. Đối với FAdV, do phân loại virus dựa trên phản ứng huyết thanh học (huyết thanh) và dựa trên di truyền đặc trưng (kiểu gen) rất khác nhau (Hess, 2000).

Nghiên cứu sự lưu hành của Fowl Adenovirus ở gà nuôi tại Hà Nội và vùng phụ cận

```

      120      130      140      150      160      170      180      190      200      210      220
HM592281 TCTATACCAACACGAGCACCCTCCAAGACACGACGGCGGCAGGTGACGAAGATTTCCGGCGCTTCCCAATCCCAACCGGACCCGGATAAATCCTCTGCGACAG
F5      .....A.....

      230      240      250      260      270      280      290      300      310      320      330
HM592281 GTAGAAAACGCCAACACCGCGTGCTCGGTGCTTCGCAAGTCTCAGTACAATTACGTTACGGTGCTACGTCAAGCCCGTCGCCGCCGCGGTTCCTCAGTCCCTCAC
F5      .....

      340      350      360      370      380      390      400      410      420      430      440
HM592281 GCAGACCCCTACTGGATCAATGATAACACGGGCACCAATTACTCGGAACGGTGGCGTCGAGGACTACACCAACAGCCTCTCGTACCCAGATACCATAGTCGTGCCGC
F5      .....G.....
    
```

(A)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
AF508956 CTTCAAGCCCTACGGCGGCACGGCTTACAACCCCTGGCCCTCGCGAAGCCTTCTTTAACTGGATCCGGAAGACGGCAACAAGAC
F6      A...G.....
F7      .G.....
F9      .G.....
F11     .G.....

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
AF508956 AACCATCACCGGCAAAATGTCTAACCCCTATGAGAATACCACCTCAAAACGGCCGAGCGGAACAGCCCGCTCGTCGCCAGCGTCTCCGG
F6      G.....G.....
F7      .T.....G.....A.C.T.G.CTC..C.A.C.G...ACA.AC.TA..C.....TA.G.CAA...T..A..
F9      G.....G.....A.C.T.G.CA...CGAGG.G...ACA.A..TA..C.....T..A.CAA.....T..A..
F11     .G..A...A.C.T.G.CA...CGAGG.G...ACA.A..TA..C.....T..A.CAA.....T..A..

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
AF508956 CAGTACCCCTAATCCCAACTCGGGTCGGGCAATTAGCGAAATGGGGCGCTCAGCACTACGCTAGCGGCTCAGGTCCGTCTAGCCGGTCTG
F6      .....C.....C.....
F7      .TCT..T...C..T..GT..A.....A..C...C.C.G..A..C..A..A...T..C..G...A..
F9      .....C.....C.....
F11     .TCT..T...C..T..GT..G.T..C.....A..C...C.C.G..A...A..A.....G.....

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
AF508956 CTTTCGGAAGTATCCAGCGAGAACGCGTCTGGCTTACGGGGCGTACGTCAAGCCCTGAAGAACGACGGCTCTCAGTCTCTGGTGCA
F6      .....C.....T.....T.....
F7      ..T..C..G..G..G.....A.....T.....T..A...A...AGTAC
F9      .....C.....T.....
F11     G..T..C..G..G..G..AT.....C.....T..A...T..G...T..A..AG.....A..T.GAAC

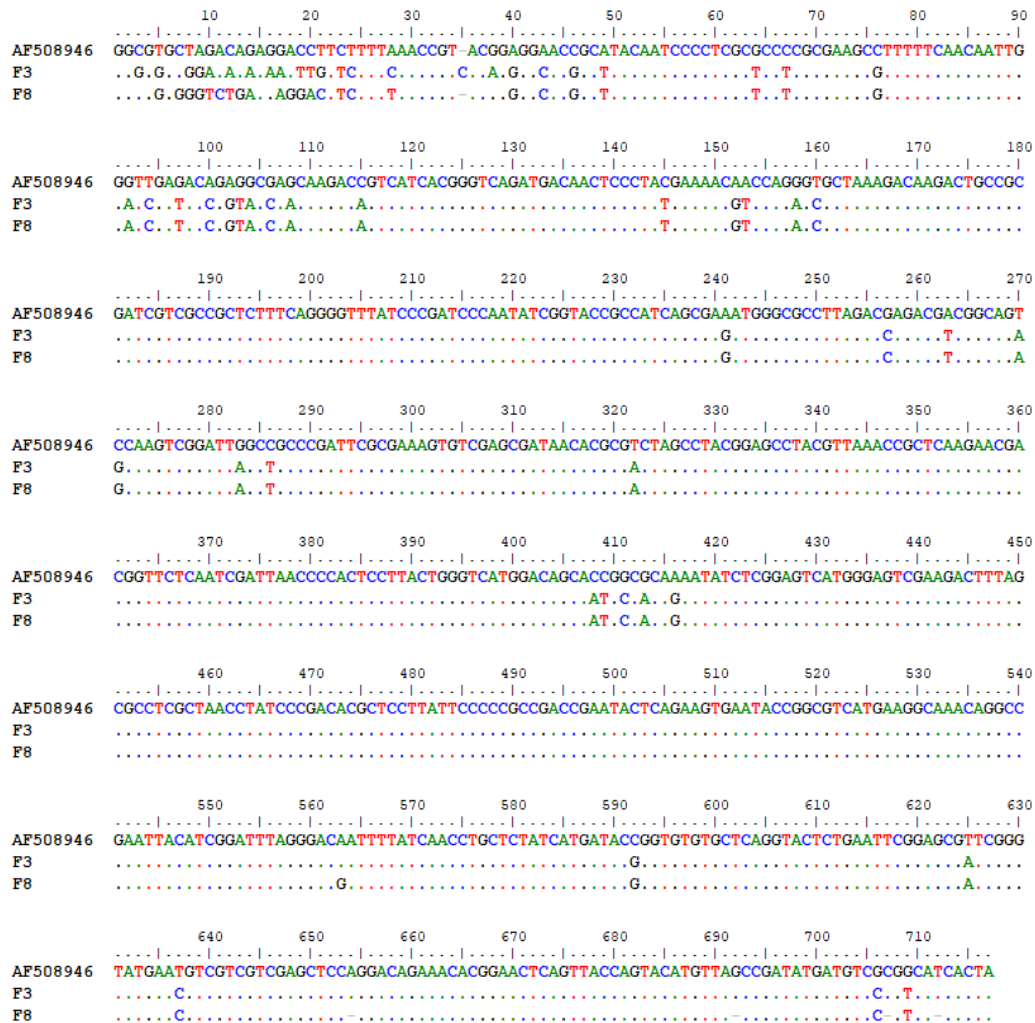
      370     380     390     400     410     420     430     440     450
AF508956 AACACCTTACTACGTCTGACAGCGGGAGCACGGAATATTTGGGTGTGATGGGGGTAGAGGACTTTACCGATAGCCTGACCTACCCCGA
F6      .....C.....T.....T.....
F7      G...A.....GT.....ACAG.T..T..C..CC.....A.....C..GC.A...C..G.....
F9      .....G.....C.....C.....
F11     .G.....GT..A...C.ACCGCACA...C...C..C.....A.....GC.A..T...T...A..

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
AF508956 CAGTCTACTGATCCCGCCTCCTATCGAGTACGGAACGGTCAATACCGGGGTGATGAAAGCTAACAGACCCCAATTACATCGGGTTCCGTGA
F6      .G.....C.....
F7      ...CA.T..T.....TC.....A.TGA...T..C.G.....C.....C.....A...C..
F9      .....G.....C.....C.....T.....
F11     .GT..A...C.....TCT.....GA...T..C.G.....G.....C.....C.....

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
AF508956 CAATTTTCATCAACCTCCTGTACCACGATACCGGCGTGTGCTCCGGCACCTGAACTCCGAGCGGTCCGGCATGAACGTGGTCGTAGAACT
F6      .....T.G.....T.....G.....C.....TC.A.....A.....G...T..
F7      .....G.....A.G.....A.....C.....
F9      .....G.....C.....A...A.....G...G...T..
F11     .....G.....C.....A...A.....G...G...T..

      640     650     660     670     680
AF508956 GCAGGACCGAAACACCGAACTCAGTTACCAGTACATGCTCGCCGACATGATGTC
F6      .....
F7      .....T.....T.....A...T.....
F9      .....A.....
F11     .....C.....T.....
    
```

(B)



(C)

Ghi chú (A): FAdV-C (chủng F5) so sánh với chủng Fowl adenovirus C isolate 5997 hexon protein gene, (mã số truy cập ngân hàng Genbank: HM592281), (B): FAdV-E (chủng F6, F7, F9, F11) so sánh với Fowl adenovirus 8 chủng TR59 hexon gene thuộc FAdV loài E (mã số truy cập ngân hàng Genbank: AF508956), (C): FAdV-D (F3, F8) so sánh với Fowl adenovirus 2 chủng SR48 hexon gene thuộc FAdV loài D (mã số truy cập ngân hàng Genbank: AF508946).

Hình 4. Trình tự gen hexon của 07 chủng FAdV so sánh với các chủng tham chiếu đã được công bố trước đó

Đáng chú ý, một chủng F5 được phân loại vào loài FAdV-C và liên quan chặt chẽ với các chủng huyết thanh FAdV4. Điều này dẫn đến suy luận rằng chủng FAdV- F5 thuộc về serotype FAdV 4; serotype này được biết là gây ra hội chứng viêm gan thể bao hàm, hội chứng xoang bao tim tích nước ở gà (Hess, 2013; Zhao & cs., 2015; Ye & cs., 2016). Hơn nữa, nhìn vào cây phát sinh, chúng ta có thể thấy rằng trình

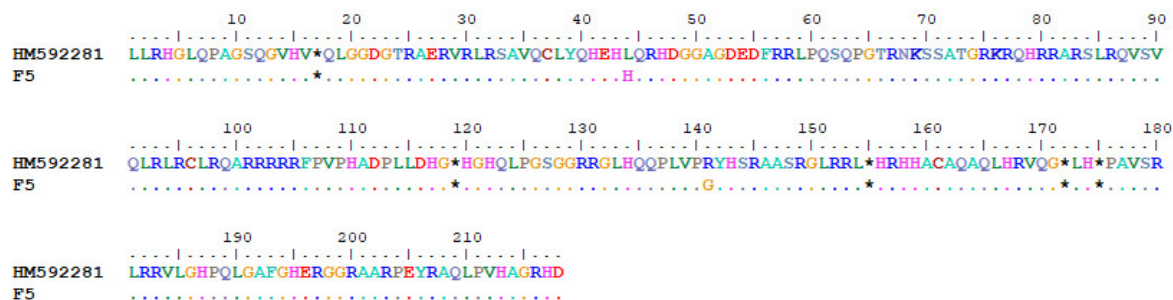
tự nucleotide của chủng FAdV-F5 rất giống với chủng serotype 4 FAdV-C khoảng 98% tương đồng.

4. KẾT LUẬN

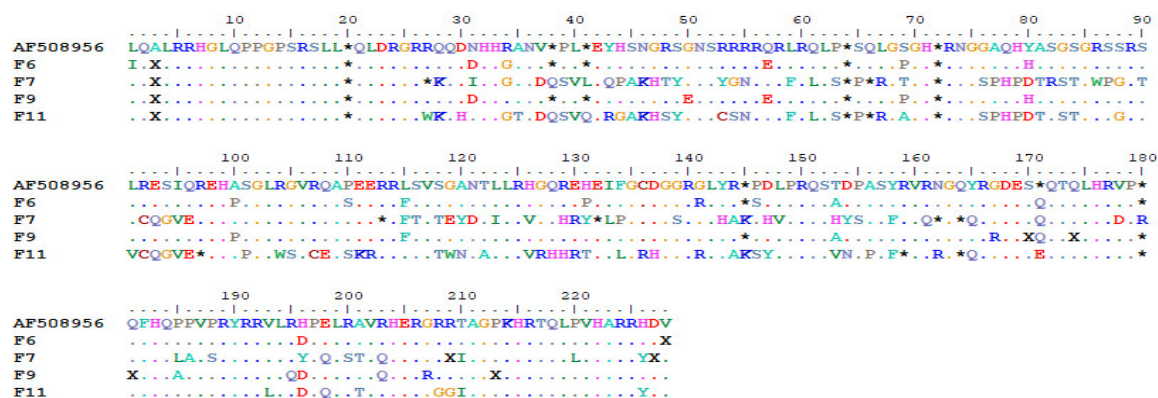
Đây là báo cáo đầu tiên về fowl adenovirus ở Việt Nam. Các cặp mồi được thiết kế bởi Ganesh & cs. (2002) có thể áp dụng để phát hiện

và giải trình tự một phần gen hexon của FAdV tại Việt Nam. Hơn nữa, kết quả của chúng tôi đã chỉ ra rằng có sự lưu hành của FAdV ở gà nuôi tại Hà Nội và vùng phụ cận; 7 chủng FAdV được giải trình tự gen trong nghiên cứu này được so sánh với các trình tự khác nhau trên thế

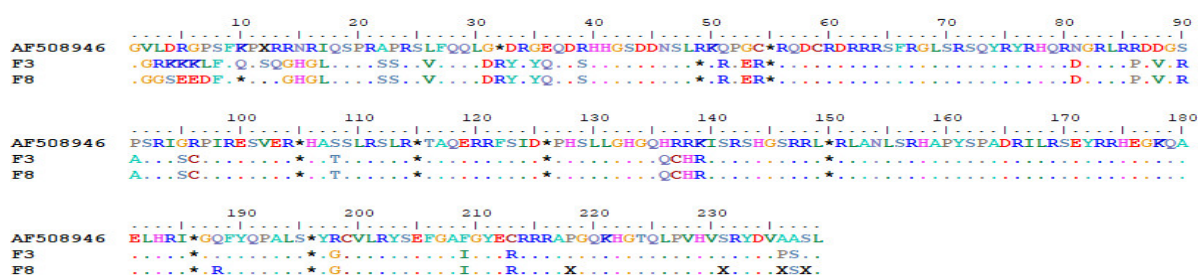
giới thuộc 3 loài khác nhau của FAdV, gồm có: FAdV-C (chủng F5), FAdV-D (F3, F8) và FAdV-E (chủng F6, F7, F9, F11). Đáng chú ý, có một chủng F5 được phân loại vào nhóm loài FAdV-C và liên quan chặt chẽ với các chủng FAdV serotype 4 lưu hành tại Trung Quốc.



(A)



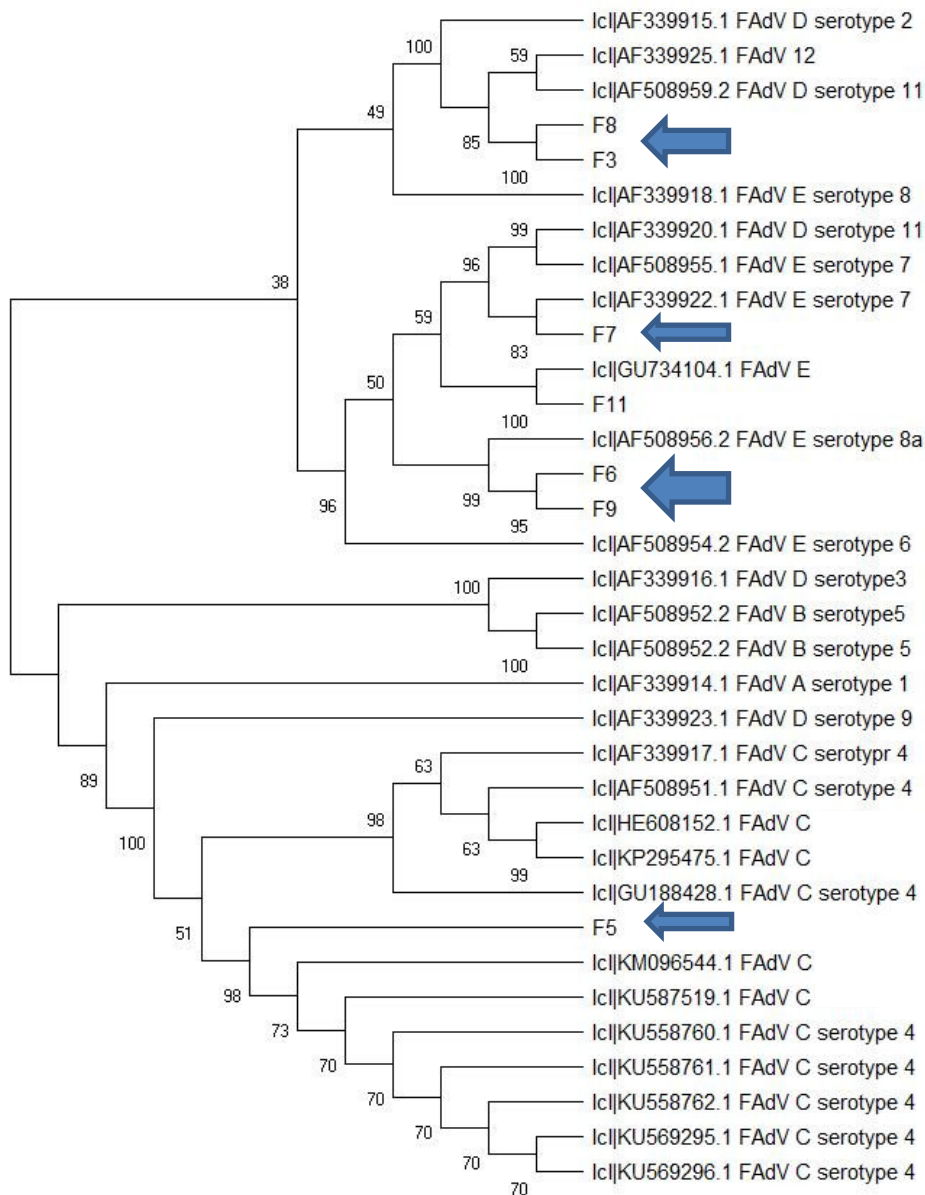
(B)



(C)

Ghi chú: (A): FAdV-C (chủng F5) so sánh với chủng Fowl adenovirus C isolate 5997 hexon protein gene, (mã số truy cập ngân hàng Genbank: HM592281), (B): FAdV-E (chủng F6, F7, F9, F11) so sánh với Fowl adenovirus 8 chủng TR59 hexon gene thuộc FAdV- E (mã số truy cập ngân hàng Genbank: AF508956), (C): FAdV-D (F3, F8) so sánh với Fowl adenovirus 2 chủng SR48 hexon gene thuộc FAdV - D (mã số truy cập ngân hàng Genbank: AF508946).

Hình 5. Trình tự axit amin protein hexon của 07 chủng FAdV so sánh với các chủng tham chiếu đã được công bố trước đó



Hình 6. Cây phát sinh chủng loại của FAdV

LỜI CẢM ƠN

Bài báo được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài cấp học viện: “Nghiên cứu sự lưu hành của Fowl Adenovirus (FAdV) ở gà nuôi tại Hà Nội và vùng phụ cận”. Mã số T2018-03-20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abe T., Nakamura K., Tojo H., Mase H., Shibahara T., Yamaguchi S. & Yuasa N. (1998). Histology, immunohistochemistry and ultrastructure of hydropericardium syndrome in adult broiler breeders and broiler chicks. *Avian Dis.* 42: 606-612.
- Dar A., Gomis S., Shirley I., Mutwiri G., Brownlie R., Potter A., Gerds V. & Tikoo S.K. (2012). Pathotypic and molecular characterization of a fowl adenovirus associated with inclusion body hepatitis in Saskatchewan chickens. *Avian Dis.* 56: 73-81. doi:10.1637/9764-041911-Reg.1.
- Ganesh K., Suryanarayana V.V.S. & Raghavan R. (2002). Detection of fowl adenovirus associated with hydropericardium hepatitis syndrome by a polymerase chain reaction. *Veterinary Research Communications.* 26(1): 73-80.

- Hall TA. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Aymposium Series*. 41: 95-98.
- Helmboldt C.F. & Frazier M.N. (1963). Avian hepatic inclusion bodies of unknown significance. *Avian diseases*. 7(4): 446-450.
- Hess M. (2000). Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review. *Avian pathology*. 29(3): 195-206.
- Hess M. (2013). Aviadenovirus infections. In: Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L., Nair V. *Diseases of Poultry* (13th Edition). John Wiley & Sons, Inc. Ames, IA. pp. 289-300.
- Hess M., Raue R. & Prusas C. (1999). Epidemiological studies on fowl adenoviruses isolated from cases of infectious hydropericardium. *Avian Pathol*. 28: 433-439.
- Home R.W. (1962). The comparative structure of adenoviruses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 101: 475-484.
- Howell J., MacDonald D.W. & Christian R.G. (1970). Inclusion body hepatitis in chickens. *The Canadian Veterinary Journal*. 11(5): 99.
- ICTVdB Management (2006). 00.001. Adenoviridae. In C. Bu"chen-Osmond (ed.), *ICTVdB-the universal virus database*, version 3. Columbia University, New York, NY.
- Jianqiang Ye, Guangchen Liang, Jianjun Zhang, Weikang Wang, Na Song, Ping Wang, Wenlv Zheng, Quan Xie, Hongxia Shao, Zhimin Wan, Chengming Wang, Hongjun Chen, Wei Gao & Aijian Qin (2016). Outbreaks of serotype 4 fowl adenovirus with novel genotype, China. *Emerging Microbes and Infections*. 5: e50. DOI:10.1038/emi.2016.50.
- Khawaja D.A., Ahmad S., Rauf M.A., Zulfiqar M.Z., Mahmood S.M.I & Hassan M. (1988) Isolation of an adenovirus from hydropericardium syndrome in broiler chicks. *Pak J Vet Res*. 1: 2-17.
- Macpherson I.A., Wildy P., Stoker M.G.P & Home R.W. (1961). The fine structure of GAL. - an avian orphan virus. *Virology*. 13: 146-149.
- McFerran J.B. & Smyth J.A. (2000). Avian adenoviruses. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics). 19(2): 589.
- Meulemans G., Boschmans M., Berg T.P. & Decaesstecker M. (2001). Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses. *Avian Pathol*. 30: 655-660.
- Meulemans G., Couvreur B., Decaesstecker M., Boschmans M. & Thierry P. van den Berg. (2004). Phylogenetic analysis of fowl adenoviruses. *Avian Pathol*. 33(2): 164-170.
- Pattison M., McMullin P.F., Bradbury J.M & Alexander D.J. (2008). *Poultry Diseases*, Elsevier, UK.
- Pedro F. Vera-Hernández, Andrés Morales-Garzón, Diana V. Cortés-Espinosa, Alejandra Galiote-Flores, Laura J. García-Barrera, Elizabeth T. Rodríguez-Galindo, Arnulfo Toscano-Contreras, Eduardo Lucio-Decanini & Angel E. Absalón (2016). Clinicopathological characterization and genomic sequence differences observed in a highly virulent fowl Aviadenovirus serotype 4. *Avian Pathol*. 45(1): 73-81.
- Ru Guan, Yiming Tian, Xiaoxiao Han, Xin Yang, Hongning Wang (2018). Complete genome sequence and pathogenicity of fowl adenovirus serotype 4 involved in hydropericardium syndrome in Southwest China. *Microbial Pathogenesis*. 117: 290-298.
- Russell W.C. (2009). Adenoviruses: Update on structure and function. *J. Gen. Virol*. 90: 1-20. doi:10.1099/vir.0.003087-0.
- Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K & Swayne D.E. (2008). Viral infections of waterfowl. *Diseases of Poultry*. 12th ed. Section. 1: 370.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 30(12): 2725-2729.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 25: 4876-4882
- Toro H., Prusas R., Raue R., Cerda L., Geisse C., Gonzalez C. & Hess M. (1999). Characterization of fowl adenoviruses from outbreaks of inclusion body hepatitis hydropericardium syndrome in Chile. *Avian Dis*. 43: 262-270.
- Watson D.H., Macpherson I.A. & Davies M.C. (1963). The structure of the capsid of GAL virus. *Virology*. 19: 418-419.
- Winterfield R.W., Fadly A.M & Gallina A.M. (1972). Adenovirus infection and disease. I. Some characteristics of an isolate from chickens in Indiana. *Avian diseases*. pp. 334-342.
- Zhao J., Zhong Q., Zhao Y., Hu Y.X. & Zhang G.Z. (2015). Pathogenicity and complete genome characterization of fowl adenoviruses isolated from chickens associated with inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in China. *PloS one*. 10(7): e0133073.