

XÁC ĐỊNH SỰ LƯU HÀNH CỦA PORCINE ADENOVIRUS (PAdV) TRÊN ĐÀN LỢN NUÔI TẠI MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM

Lê Văn Trường, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Đặng Hữu Anh,
Nguyễn Văn Giáp, Mai Thị Ngân, Võ Văn Hiếu, Trịnh Hương Ly, Lê Văn Phan*

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

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

Ngày nhận bài: 31.12.2022

Ngày chấp nhận đăng: 27.03.2023

TÓM TẮT

Porcine adenovirus (PAdV) là một trong những nguyên nhân gây ra triệu chứng tiêu chảy ở lợn con từ 1 đến 4 tuần tuổi. Có ba loài Adenovirus (AdVs) gây bệnh cho lợn là A, B và C, trong đó bằng phản ứng trung hòa, người ta đã xác định được có 6 serotypes. Nghiên cứu này nhằm xác định sự có mặt của PAdV ở lợn nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. Để thực hiện điều đó, 140 mẫu phân tiêu chảy của lợn con theo mẹ đã được sử dụng để chẩn đoán PAdV bằng phương pháp nested PCR. Kết quả chẩn đoán cho thấy 61/140 (43,57%) mẫu dương tính với PAdV. Trong số 14 trại kiểm tra có đến 10 (71,43%) trại dương tính với PAdV. Kết quả giải trình tự đoạn gen hexon của PAdV cho thấy các chủng PAdV trong nghiên cứu này đều thuộc PAdV serotype 3, loài Adenovirus A, chi Mastadenovirus.

Từ khóa: Porcine adenovirus, nested PCR, lợn con, sự lưu hành.

Determining the Prevalence of Porcine Adenovirus (PAdV) in Pigs Raised in some Provinces in the North of Vietnam

ABSTRACT

Porcine adenovirus (PAdV) is the causative agent of diarrhea in piglets aged one to four weeks. Among the three species of adenoviruses (AdVs) that cause disease in pigs, A, B, and C, six serotypes have been identified through neutralization methods. Our study aimed to determine the prevalence of PAdV in pigs raised in Hanoi and its surrounding areas. One hundred and forty fecal samples were collected from piglets exhibiting diarrhea symptoms and subjected to DNA extraction. Nested PCR was then used to detect PAdV in the samples. Positive PCR samples were purified and sequenced. The results showed that the nested PCR method was effective in diagnosing PAdV causing diarrhea in pigs, with 43.57% (61/140) of the samples testing positive. Ten out of fourteen (71.43%) farms showed a prevalence of PAdV. The sequencing results of the PAdV hexon gene segment of the positive samples identified six strains of PAdV circulating in Vietnam, including PAdV-8, PAdV-25, PAdV-26, PAdV-28, PAdV-33, and PAdV-34. The molecular epidemiological analysis of PAdV also revealed that all six strains isolated in Vietnam belonged to PAdV serotype 3, a species of Adenovirus A, genus Mastadenovirus.

Keywords: Porcine adenovirus, nested PCR, piglets, prevalence.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Porcine adenovirus (PAdV) lần đầu tiên được phân lập từ lợn ở Anh vào năm 1964 (Haig & cs., 1964). Kể từ đó, sự hiện diện của PAdV ở lợn đã được chứng minh hầu như trên toàn thế giới bằng cách phân lập virus và khảo sát huyết thanh học (Derbyshire, 1989). Adenovirus (AdV)

ở lợn được xếp vào giống Mastadenovirus, họ Adenoviridae. Họ Adenovirus gần đây đã được chia thành bốn chi, Mastadeno, Atadeno, Aviadeno và Siadenovirus (Pringle, 1998; Van Regenmortel & cs., 2000; Buchen-Osmond, 2003). Mastadenovirus chỉ lây nhiễm cho động vật có vú và Aviadenovirus chỉ lây nhiễm cho các loài gia cầm. Tuy nhiên, các thành viên cụ thể

của chi thứ ba và thứ tư đã được chứng minh là có thể lây nhiễm sang động vật có vú, chim, lưỡng cư hoặc bò sát. Có ba loài Adenovirus (AdVs) gây bệnh cho lợn là A, B và C, trong đó bằng phản ứng trung hòa, người ta đã xác định được có 6 serotypes (Garwes & Xuan, 1989; Kleiboeker, 1994; Nagy & cs., 2001; Reddy & cs., 1996; Reddy & cs., 1998). PAdV có hình cầu, không có vỏ bọc, chứa bộ gen ADN sợi kép có kích thước xấp xỉ 34kbp (Van Regenmortel & cs., 2000). Triệu chứng lâm sàng luôn gặp trong bệnh do AdVs gây ra ở lợn con là hiện tượng tiêu chảy, phân nhiều nước, nhão (Sanford & cs., 1983) trong thời gian ngắn mà không có dấu hiệu lâm sàng nào khác liên quan đến nhiễm trùng hoặc có triệu chứng hô hấp (Hirahara & cs., 1990). Đáng chú ý, PAdV cũng đã được phân lập từ những con lợn khỏe mạnh không mắc bệnh lâm sàng (Derbyshire & cs., 1966; Mahnel & Bibrack, 1966; Rasmussen, 1969).

Bệnh tiêu chảy ở lợn do nhiều nguyên nhân khác nhau gây ra, hiện nay người ta đã phát hiện ra nhiều virus khác nhau gây ra tiêu chảy cho lợn như PEDV, Deltacoronavirus, virus Dịch tả lợn... Tuy nhiên, những nghiên cứu xác định sự có mặt của Porcine adenovirus và đặc điểm dịch tễ học phân tử của các chủng PAdV gây tiêu chảy ở lợn nuôi tại Việt Nam vẫn chưa báo cáo nào đề cập đến. Vì vậy việc tiến hành nghiên cứu xác định sự có mặt của Porcine adenovirus (PAdV) ở lợn nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam là cần thiết. Các kết quả nghiên cứu của đề tài này nhằm mục đích phát hiện sự có mặt của PAdV trong các mẫu nghiên cứu, đồng thời đây sẽ là cơ sở khoa học quan trọng trong việc xác định sự lưu hành, định hướng chọn chủng virus cho các nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo về PAdV ở lợn, để từ đó có chiến lược phòng chống dịch bệnh tiêu chảy do virus ở lợn lâu dài tại Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu bệnh phẩm

Mẫu phân (140 mẫu) từ các đàn lợn con theo mẹ 1-4 tuần tuổi có các biểu hiện như tiêu

chảy, phân nhiều nước, nhão đã được thu thập và sử dụng cho nghiên cứu. Các mẫu phân được thu thập trong hai năm 2018 và 2019, sau đó được lưu trữ ở -80°C cho đến khi sử dụng. Thông tin chi tiết liên quan đến mẫu bệnh phẩm sử dụng trong nghiên cứu được thể hiện trong bảng 1 và bảng 2.

2.2. Phương pháp tách chiết DNA và phản ứng PCR phát hiện PAdV

Bộ kit thương mại Gene-SpinTM DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON Biotech, Korea) đã được sử dụng để tách chiết ADN của PAdV. Các bước được tiến hành theo hướng dẫn cụ thể của nhà sản xuất. Để chẩn đoán PAdV bằng phương pháp PCR, bộ Kit PCR (i-StarMaster, iNtRON Biotech, Korea) và cặp môi công bố trước đây đặc hiệu cho PAdV (Maluquer De Motes & cs., 2004) đã được sử dụng (Bảng 1). Chu trình nhiệt áp dụng cho cả phản ứng PCR như sau: Biến tính ban đầu ở $94^{\circ}\text{C}/5$ phút; lặp lại 35 chu kỳ ($94^{\circ}\text{C}/60$ giây, $52^{\circ}\text{C}/60$ giây, $72^{\circ}\text{C}/60$ giây) và 7 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 RedSafeTM Nucleic Acid Staining Solution 1x (iNtRON Biotechnology, Korea).

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

Sản phẩm PCR nhân lên bởi cặp môi PAV 20711-20733 Nested left PALN (mũi xuôi) và PAV 21035-21054 Nested right PARN (mũi ngược) (Maluquer De Motes & cs., 2004) được tinh sạch bằng QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất, sau đó được giải trình tự bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Toàn bộ bước giải trình tự gen được thực hiện tại Công ty 1st Base DNA sequencing division, Malaysia. Các trình tự nucleotide và axit amin của các chủng PAdV được xử lý 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).

Bảng 1. Trình tự mỗi dùng để phát hiện gen hexon của PAdV

Mỗi xuôi/ ngược	Trình tự 5' – 3'	Kích thước (bp)
PAV 20627–20647 First left PALF	5'-GATGTCATGGAYAACGTCAAC-3'	612
PAV 21217–21238 First right PARF	5'-CACGGAGGAGTCRAACTGGATG-3'	
PAV 20711–20733 Nested left PALN	5'-TACTGCMAGTTYCACATCCAGGT-3'	344
PAV 21035–21054 Nested right PARN	5'-GGAATGGAGATGGGCAGGTT-3'	

Mối quan hệ di truyền của PAdV (phylogenetic tree) được xây dựng dựa trên một phần trình tự gen mã hóa protein hexon (344 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.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả chẩn đoán PAdVs bằng phương pháp PCR

Trên thế giới đã có nhiều công bố về sự lưu hành và gây bệnh của các chủng PAdV ở lợn lợn nhưng tại Việt Nam cho đến thời điểm này vẫn chưa có công bố nào về sự lưu hành của virus này. Triệu chứng luôn gặp trong bệnh do PAdVs gây ra ở lợn con là hiện tượng tiêu chảy, phân nhiều nước, nhão (Sanford & cs., 1983). Hầu hết các đợt bùng phát tiêu chảy do adenovirus xảy ra ở lợn con theo mẹ từ 1-4 tuần tuổi (Abid & cs., 1984; Coussement & cs., 1981; Sanford & Hoover, 1983). Trong nghiên cứu này, 140 mẫu phân tiêu chảy của lợn con 1-4 tuần tuổi thu thập được từ 14 trang trại lợn khác nhau tại 6 tỉnh thành khác nhau của miền Bắc (Hà Nội, Ninh Bình, Hưng Yên, Hải Phòng, Vĩnh Phúc và Quảng Ninh) đã được sử dụng để chẩn đoán sự lưu hành PAdV. Số lượng mẫu thu thập được của mỗi địa phương được thể hiện trong bảng 2.

Để làm tăng khả năng phát hiện sự có mặt của PAdV trong các mẫu bệnh phẩm, kỹ thuật nested PCR đã được thực hiện. Cụ thể PCR

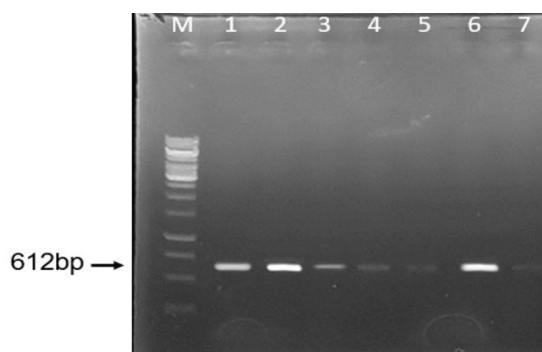
vòng ngoài (Outer PCR) được thực hiện sử dụng cặp mồi PAV 20627–20647 First left PALF (mỗi xuôi, forward) và PAV 21217–21238 First right PARF (mỗi ngược, reverse). Sản phẩm PCR thu được có kích thước là 612bp (Hình 1), đúng với kích thước sản phẩm PCR đã được công bố trước đây (Maluquer & cs., 2004). Sản phẩm PCR vòng ngoài thu được sẽ được dùng làm sợi khuôn cho phản ứng PCR vòng trong (Inner PCR). Kết quả phản ứng PCR vòng trong sử dụng cặp mồi PAV 20711–20733 Nested left PALN (mỗi xuôi) và PAV 21035–21054 Nested right PARN (mỗi ngược) đã thu được sản phẩm PCR có kích thước là 344bp, cũng đúng với kích thước sản phẩm PCR đã được công bố trước đây (Maluquer & cs., 2004) (Hình 2).

Tổng hợp kết quả chẩn đoán xác định sự có mặt của PAdV ở bảng 2 cho thấy có 61/140 mẫu dương tính với PAdV, chiếm tỷ lệ là 43,57%. Trong trong số 14 trại kiểm tra có đến 10 (71,43%) trại dương tính với PAdV. Giữa các khu vực khác nhau thì có tỷ lệ dương tính với PAdV khác nhau. Cụ thể Hà Nội có tỷ lệ dương tính với PAdV là 17/55 (31%), Ninh Bình là 7/25 (28%), Hưng Yên là 10/20 (50%), Hải Phòng là 15/15 (100%), Vĩnh Phúc 2/10 (20%), Quảng Ninh 10/15 (66,67%). Có sự sai khác về tỷ lệ dương tính với PAdV giữa các khu vực Hà Nội với Hải Phòng và Quảng Ninh có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Không có sự sai khác về tỷ lệ mắc giữa khu vực Ninh Bình; Hưng Yên; Vĩnh Phúc và Hà Nội ($P > 0,05$).

Tiêu chảy ở lợn con là một hội chứng do nhiều nguyên nhân gây ra. Lợn bị mắc PAdV thường có các triệu chứng có thể quan sát được như tiêu chảy, phân nhiều nước, nhão (Sanford & cs., 1983). Trong nghiên cứu của Kattareeya & cs. (2019), tỷ lệ nhiễm PAdV ở heo con không bị tiêu chảy là 2,6%, tương tự như báo cáo được

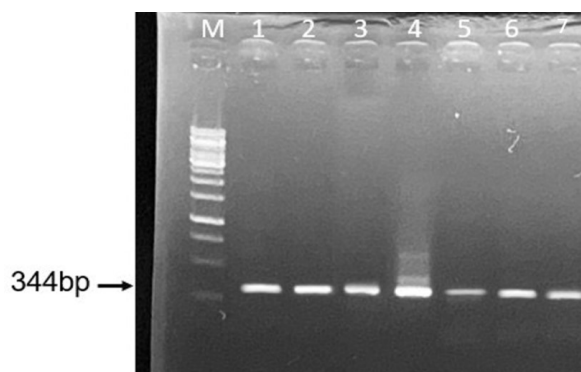
thực hiện ở heo con khỏe mạnh ở Tây Ban Nha với tỷ lệ mắc là 3% (Buitrago & cs., 2010), nhưng khác với nghiên cứu được công bố ở Ireland, tỷ lệ mắc là 25% (Gunn & cs., 2015). Dữ liệu dịch tễ học và vai trò của PAdV liên quan đến bệnh tiêu chảy còn rất hạn chế. Thông tin duy nhất hiện có về tỷ lệ nhiễm PAdV ở lợn bị tiêu chảy đã được ghi nhận từ lâu với tỷ lệ phổ

biến là 2% (Coussement & cs., 1981; Nagy & cs., 1996) đến 30% (Abid & cs., 1984). Trong nghiên cứu này, tỷ lệ nhiễm PAdV ở heo con bị tiêu chảy là 43,57%, cao hơn đáng kể so với tỷ lệ heo con không bị tiêu chảy nhiễm PAdV ở các công bố trước đó. Điều này cho thấy có thể có mối liên quan giữa nhiễm PAdV và bệnh tiêu chảy ở lợn tại Việt Nam.



Ghi chú: M: Marker - GeneRuler 1kb. Giếng ký hiệu từ 1 đến 7 là các mẫu phân thu thập được ở các trang trại thuộc phạm vi nghiên cứu. Sản phẩm PCR có kích thước 612bp.

Hình 1. Kết quả phản ứng PCR vòng ngoài (Outer PCR) phát hiện PAdV



Ghi chú: M: Marker - GeneRuler 1kb. Sản phẩm PCR có kích thước 344bp.

Hình 2. Kết quả phản ứng PCR trong (Inner PCR) phát hiện PAdV

Bảng 2. Kết quả khảo sát sự lưu hành của PAdV theo khu vực

Tỉnh	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Số mẫu dương tính/ Số mẫu kiểm tra
Hà Nội	55	17	17/55 (31%)
Ninh Bình	25	7	7/25 (28%)
Hưng Yên	20	10	10/20 (50%)
Hải Phòng	15	15	**15/15 (100%)
Vĩnh Phúc	10	2	2/10 (20%)
Quảng Ninh	15	10	*10/15 (66,67%)
Tổng mẫu	140	61	61/140 (43,57%)

Ghi chú: *: $P < 0,05$; **: $P < 0,001$.



Hình 3. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của đoạn gen mã hóa protein Hexon của PAdV giữa 6 chủng PAdV trong nghiên cứu này với các chủng PAdV tham chiếu khác trên thế giới

Bảng 3. Kết quả so sánh mức độ tương đồng trình tự nucleotide của đoạn gen mã hóa protein Hexon của PAdV giữa 6 chủng PAdV trong nghiên cứu này với các chủng PAdV tham chiếu khác trên thế giới

Chủng virus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
PAdV-5/NC 002702											
PAdV-5/AF289262	100										
PAdV-5/LC702314	99,1	99,1									
PAdV-3/NC 005869	77,7	77,7	77,4								
PAdV8	78,7	78,7	78,4	95							
PAdV25	78,4	78,4	78,1	94,4	97,6						
PAdV26	78,4	78,4	78,1	94,4	97,6	100					
PAdV28	79,6	79,6	79,3	94,4	97,3	96,1	96,1				
PAdV33	79	79	78,7	96,4	97,9	97,3	97,3	97,9			
PAdV34	79,3	79,3	79	96,1	98,2	97,6	97,6	98,2	99,7		
PAdV-3/MK774519	74,3	74,3	73,7	76,9	76,1	76,9	76,9	77,2	77,2	77,2	

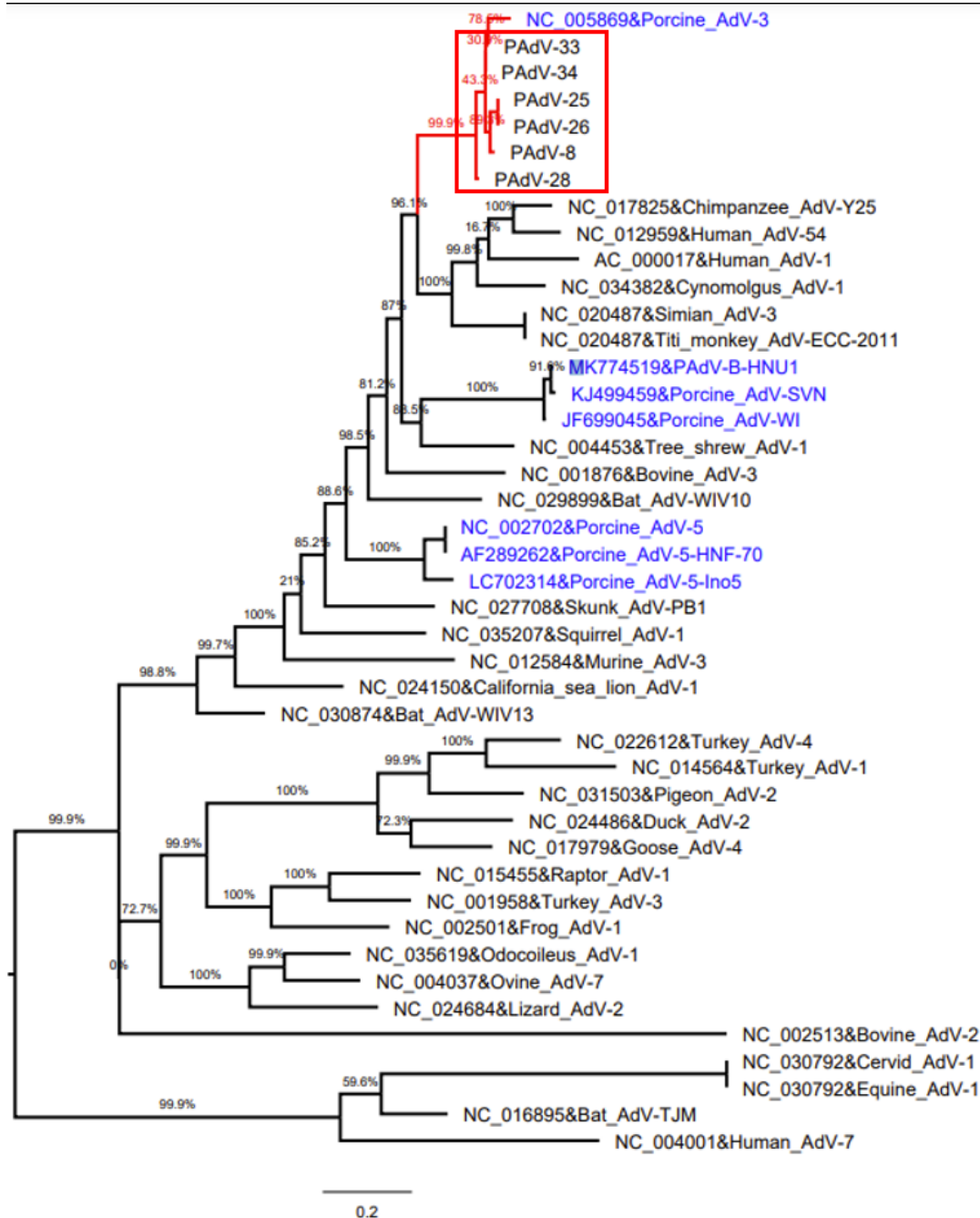
3.2. Kết quả giải trình tự gen hexon của PAdV

Trong nghiên cứu này, 6/61 mẫu dương tính với PAdV đã được lựa chọn ngẫu nhiên để giải

trình tự đoạn gen mã hóa protein hexon của PAdV. Các mẫu giải trình tự gen được kí hiệu là PAdV-8; PAdV-25; PAdV-26; PAdV-28; PAdV-33; PAdV-34. Cụ thể, sản phẩm PCR (344bp) thu được khi sử dụng cặp mồi

PAV 20711-20733 Nested left PALN (mũi xuôi) và PAV 21035-21054 Nested right PARN (mũi ngược) (Maluquer & cs., 2004) thuộc vùng gen mã hóa protein Hexon của PAdV đã được tinh sạch bằng kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) và được giải trình tự gen tại công ty 1st

BASE, Malaysia. Kết quả giải trình tự gen đã thu được đoạn gen có kích thước là 344bp. Theo chủng tham chiếu PAdV-5 (mã số truy cập GenBank: NC_002702) thì kích thước sản phẩm 344bp sẽ tương ứng với vị trí trình tự nt từ 1560 đến vị trí nt 1900 (Hình 3).



Ghi chú: Các chủng trong ô vuông màu đỏ là những chủng PAdV trong nghiên cứu này. Các chủng PAdV đánh dấu màu xanh sẽ là những chủng tham chiếu được lựa chọn ngẫu nhiên để phân tích sự tương đồng về trình tự nucleotide với các chủng trong nghiên cứu này; Giá trị bootstrap ở mỗi nhánh biểu thị mức độ tin cậy của phân nhánh; Thước đo ở phía dưới của cây biểu thị tốc độ đột biến nucleotide/vị trí.

Hình 4. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự đoạn gen mã hóa protein Hexon của PAdV

Để làm rõ hơn về mối quan hệ di truyền của các chủng PAdV phân lập được tại Việt Nam với một số chủng PAdV phân lập được trên thế giới, một số trình tự gen tham chiếu thu thập được trên ngân hàng GenBank đã được sử dụng. Các chủng virus tham chiếu được sử dụng để phân tích trình tự nt mã hóa protein hexon của PAdV bao gồm chủng PAdV-3 (mã số GenBank: NC005869), chủng PAdV-5 phân lập tại Hungary năm 2000 (mã số GenBank: NC002702), chủng PAdV-5 HNF-70 (mã số GenBank: AF28926); chủng Ino5 phân lập tại Nhật Bản năm 2020 (mã số GenBank: LC702314) và chủng PAdV-B-HNU1 (mã số GenBank: MK774519).

Kết quả phân tích trình tự nt mã hóa protein hexon của PAdV cho thấy 6 chủng trong nghiên cứu này là PAdV-8, PAdV-25, PAdV-26, PAdV-28, PAdV-33 và PAdV-34 có sự tương đồng với nhau rất cao, giao động từ 96,1-100%. Khi so sánh với các chủng PAdV tham chiếu khác trên thế giới thuộc các serotype khác nhau thì 6 chủng PAdV trong nghiên cứu này có mức độ tương đồng trình tự gen mã hóa protein hexon cao nhất khi so sánh với chủng PAdV thuộc serotype 3 (mã số truy cập GenBank: NC_005869), mức độ tương đồng giao động từ 94,4-96,4%. Ngược lại 6 chủng trong nghiên cứu này có mức độ tương đồng thấp khi so sánh với các chủng PAdV tham chiếu còn lại khác, mức độ tương đồng giao động từ 73,7-79,6% (Bảng 3).

Adenoviruses (AdVs), thuộc họ *Adenoviridae*, là những virus ADN sợi kép, không có vỏ bọc với bộ gen có kích thước 26-45kb. Trình tự gen mã hóa protein hexon từ amino acid 512 đến 625 đã được dùng để nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học phân tử của các chủng AdVs (Shu-Jing & cs., 2020). Kết quả thu được trong nghiên cứu này về phân tích trình tự gen và xây dựng cây phả hệ dựa trên trình tự gen mã hóa cho protein hexon của PAdV cho thấy cả 6/6 chủng PAdV nghiên cứu đều thuộc về PAdV serotype 3, loài *Adenovirus A*, chi *Mastadenovirus*, tương tự như chủng PAdV serotype 3 (mã số truy cập GenBank: NC_005869) đã được công bố trước đây (Davison & cs., 2003) (Hình 4).

4. KẾT LUẬN

Kết quả chẩn đoán bằng phương pháp nested PCR cho thấy 61/140 (43,57%) mẫu dương tính với PAdV. Trong số 14 trại nghiên cứu có đến 10/14 (71,43%) dương tính với PAdV. Kết quả giải trình tự phân đoạn gen hexon của PAdV cho thấy các chủng PAdV trong nghiên cứu này đều thuộc PAdV serotype 3, loài *Adenovirus A*, chi *Mastadenovirus*. Đây là báo cáo đầu tiên tại Việt Nam về sự lưu hành của PAdV trên đàn lợn ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài cấp Học viện: “Nghiên cứu xác định sự có mặt của Porcine adenovirus (PAdV) ở lợn nuôi tại Hà Nội và vùng phụ cận”. Mã số T2022-09-29.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abid H.N., Holscher M.A. & Byerly C.S. (1984). An outbreak of adenovirus enteritis in piglets. *Vet. Med. Small. Anim. Clin.* 79: 105.
- Buchen-Osmond C. (Ed). (2003). 00.001. *Adenoviridae*. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. ICTVdB Management, The Earth Institute, Biosphere 2 Center, Columbia University, Oracle, AZ, USA.
- Buitrago D., Cano-Gomez C., Aguero M., Fernandez-Pacheco P., Gomez-Tejedor C. & Jimenez-Clavero M.A. (2010). A survey of porcine picornaviruses and adenoviruses in fecal samples in Spain. *J. Vet. Diagn. Investig.* 22: 763-766.
- Coussement W., Ducatelle R., Charlier G. & Hoorens J. (1981). Adenovirus enteritis in pigs. *Am. J. Vet. Res.* 42: 1905-1911.
- Davison A.J., Benko M. & Harrach B. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol.* 84: 2895-2908.
- Derbyshire J.B. (1989). Porcine Adenovirus. In: *Virus Infections of Vertebrates* Pensaert, M.B. (Ed.),. *Virus Infections of Porcines*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Denmark. 2: 73-80.
- Derbyshire J.B., Clarke M.C. & Jessett D.M. (1966). Observations on the faecal excretion of adenoviruses and enteroviruses in conventional and Minimal Disease pigs. *Veterinary Record.* 79: 595-599.

- Garwes D.J. & Xuan H. (1989). Genome typing of three serotypes of porcine adenovirus. *Intervirology*. 30: 234-236.
- Gunn L., Collins P.J., Fanning S., McKillen J., Morgan J., Staines A & O'Shea H. (2015). Detection and characterisation of novel bocavirus (genus Bocaparvovirus) and gas- troenteritis viruses from asymptomatic pigs in Ireland. *Infect. Ecol. Epidemio*. 5: 27270.
- Haig D.A., Clarke M.C., Pereira M.S. (1964). Isolation of adenovirus from pig. *J Comp Pathol Ther*. 74(1): 81-84.
- Hall T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Aymposium Series*. 41: 95-98.
- Hirahara T., Yasuhara H., Matsui O., Yamanaka M., Tanaka M., Fukuyama S., Izumida A., Yoshiki K., Kodama K., Nakai M & Sasaki N. (1990). Isolation of porcine adenovirus from the respiratory tract of pigs in Japan. *Nihon Juigaku Zasshi*. 52: 407-409.
- Kattareeya Kumthip, Pattara Khamrin, Aphisek Kongkaew, Ratchaya Vachirachewin, Rungnapa Malasao, Hiroshi Ushijima & Niwat Maneekarn (2019). Molecular epidemiology and characterization of porcine adenoviruses in pigs with diarrhea in Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*. 67: 73-77.
- Kleiboeker S.B. (1994). Sequence analysis of putative E3, pVIII and fiber genomic regions of a porcine adenovirus. *Virus Research*. 31: 17-25.
- Mahnel H. & Bibrack B. (1966). Isolation of adenovirus from kidney cell cultures of normal slaughter pigs. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene Erste Abteilung*. 199: 329-338.
- Maluquer de Motes C., Clemente-Casares P., Hundesa A., Martin M. & Girones R. (2004). Detection of bovine and porcine adenovirus for tracing the source of fecal contamination. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 1448-1454.
- Nagy M., Nagy E. & Tuboly T. (2001). The complete nucleotide sequence of porcine adenovirus serotype 5. *Journal of General Virology*. 82: 525-529.
- Pringle C.R. (1998). The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Virus Taxonomy (ICTV), including new proposals ratified since publication of the Sixth ICTV Report in 1995. *Archives of Virology*. 143: 203-210.
- Rasmussen P.G. (1969). Porcine adenoviruses. Isolation and cytopathogenic examination of four serological types. *Acta Vet. Scand*. 10: 10-17.
- Reddy P.S., Idamakanti N., Derbyshire J.B. & Nagy E. (1996). Porcine adenovirus types 1, 2 and 3 have short and simple early E-3 regions. *Virus Research*. 43: 99-109.
- Reddy P.S., Idamakanti N., Song J.Y., Lee J.B., Hyun B.H., Park J.H., Cha S.H., Bae Y.T., Tikoo S.K. & Babiuk L.A. (1998). Nucleotide sequence and transcription map of porcine adenovirus type-3. *Virology*. 251: 414-426.
- Sanford S.E. & Hoover D.M. (1983). Enteric adenovirus infection in pigs. *Can. J. Comp. Med*. 47: 396-400.
- Shu-Jing Liu., Qiong Wang., Ting-Ting Li., Si-Hua Zhang., Jin-Yan Li., Li-Jun Wu., Ye Qiu & Xing-Yi Ge. (2020). Characterization of the First Genome of Porcine mastadenovirus B (HNU1 Strain) and Implications on Its Lymphoid and Special Origin. *Virologica Sinica*. 35: 528-537.
- 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.
- Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R. & Wickner R.B. (2000). *Virus Taxonomy: The 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego.