

PHÁT TRIỂN PHƯƠNG PHÁP RT-PCR ĐA MỒI ĐỂ PHÁT HIỆN VIRUS GÂY BỆNH DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI VÀ VIRUS GÂY BỆNH DỊCH TẢ LỢN CỔ ĐIỂN

Trần Trọng Vương¹, Ngô Hữu Lai¹, Lưu Quang Hùng¹, Nguyễn Thị Hằng Nga¹,
Nguyễn Văn Thế¹, Võ Thị Bình¹, Trần Thị Minh Thu¹, Trần Thị Nguyễn¹,
Nguyễn Văn Chèo^{2*}

¹Chi cục Thú y vùng IV;

²Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

*Tác giả liên hệ: nguyenvanchao@huaf.edu.vn

Nhận bài: 07/10/2022 Hoàn thành phản biện: 14/12/2022 Chấp nhận bài: 20/12/2022

TÓM TẮT

Virus dịch tả lợn Châu Phi (ASFV) và virus dịch tả lợn cổ điển (CSFV) đã gây thiệt hại kinh tế rất lớn cho người chăn nuôi lợn. Có nhiều phương pháp xét nghiệm để phát hiện hai virus này như: PCR, Realtime PCR, phân lập virus, ELISA. Bên cạnh đó phương pháp Multiplex Real-time RT-PCR (mReal-time RT-PCR) để phát hiện đồng thời ASFV và CSFV cũng đã được đánh giá ở một số nước trên thế giới nhưng chưa được nghiên cứu nhiều tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này chúng tôi đánh giá mReal-time RT-PCR để xét nghiệm phát hiện đồng thời ASFV và CSFV. Kết quả cho thấy giới hạn phát hiện của phương pháp là $12,5 \times 10^1$ copies/ μ L đối với ASFV và CSFV. Kiểm tra độ lặp lại bằng cách sử dụng mẫu chuẩn (p-ASFV và p-CSFV) cho thấy hệ số biến đổi giữa các lần lặp lại <2%. Áp dụng xét nghiệm 90 mẫu thực địa thu thập từ năm 2019-2022 với kết quả tỷ lệ dương tính ASFV và CSFV là 42,22% và 8,89% theo thứ tự; đồng cảm nhiễm ASFV và CSFV là 2,2%.

Từ khóa: mRealtime RT-PCR, sRealtime RT-PCR, ASFV, CSFV

DEVELOPMENT OF A ONE-STEP MULTIPLEX RT-PCR FOR DETECTION OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS AND CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS

Tran Trong Vuong¹, Ngo Huu Lai¹, Luu Quang Hung¹, Nguyen Thi Hang Nga¹,
Nguyen Van The¹, Vo Thi Binh¹, Tran Thi Minh Thu¹, Tran Thi Nguyen¹,
Nguyen Van Chao^{2*}

¹Center for Veterinary Diagnostics, Regional Animal Health Office No. 4;

²University of Agriculture and Forestry, Hue University.

ASBTRACT

African swine fever virus (ASFV) and classical swine fever virus (CSFV) have caused great economic losses to the swine industry. There are many methods to detect these viruses such as PCR, Real-time PCR, virus isolation, ELISA. Moreover, multiplex Real-time RT-PCR (mReal-time RT-PCR) method for simultaneous detection of ASFV and CSFV has also been studied and applied in a number of countries but not yet in Vietnam. In this study, we evaluated mReal-time RT-PCR for simultaneous detection of ASFV and CSFV. The results showed that the limit of detection (LOD) of this assay was 12.5 copies/ μ L for both ASFV and CSFV. A repeatability test using standard recombinant plasmids (p-ASFV and p-CSFV) showed that the intra- and interassay coefficients of variation (CVs) were less than 2%. Using the mRealtime RT-PCR to test 90 field samples, there were 42.22% and 8.89% samples positive for ASFV and CSFV, respectively; the coinfection rates of ASFV and CSFV were 2.2%.

Keywords: mRealtime RT-PCR, sRealtime RT-PCR, ASFV, CSFV

1. MỞ ĐẦU

Bệnh dịch tả lợn Châu Phi (African swine fever-ASF) là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, do *African swine fever virus* (ASFV) thuộc họ *Asfviridae* có nhân là sợi đôi DNA gây ra ở lợn (Mahy, 2008). Khi lợn mắc bệnh có khả năng chết lên đến 100%, do đó bệnh gây ảnh hưởng lớn đến hiệu quả kinh tế của ngành chăn nuôi lợn, đặc biệt là ở những nước có nền chăn nuôi phát triển (Blome và cs., 2020; Galindo và Alonso, 2017). Bệnh được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1921 tại Kenya sau đó lan rộng ra các nước Châu Âu, Nam Mỹ và vùng Cari-bê vào giữa thế kỷ trước (Galindo và Alonso, 2017). Tại Châu Á, bệnh được ghi nhận lần đầu tiên tại Trung Quốc vào tháng 8/2018 (Zhou và cs., 2018), tại Việt Nam bệnh xảy ra vào đầu năm 2019 (Dixon và cs., 2019). Đợt bùng phát dịch bệnh ASF ở Việt Nam vào năm 2019 đã dẫn tới số lợn chết và tiêu hủy ước tính 6 triệu con chiếm hơn 20% tổng đàn của cả nước (Nguyen và cs., 2021). Các đợt bùng phát dịch bệnh ASF đã gây thiệt hại rất lớn đến nền kinh tế. Người chăn nuôi là đối tượng bị ảnh hưởng trực tiếp và nó cũng gây ảnh hưởng gián tiếp đến các giai đoạn trong chuỗi cung ứng thịt lợn (Nguyen và cs., 2021; Zhou và cs., 2018). Trong khi đó, bệnh dịch tả lợn cổ điển (Classical swine fever- CSF) là một bệnh truyền nhiễm phổ biến ở lợn, lây lan nhanh, do virus giống *Pestivirus* thuộc họ *Flaviviridae*, gây ra (Linda và cs., 2008). Đây là virus ARN chuỗi đơn sợi dương, có độ dài 12 Kb mã hóa cho 4 protein cấu trúc và protein phi cấu trúc (Moormann và Hulst, 1988). Bệnh dịch tả lợn cổ điển xảy ra trên lợn gây thiệt hại trầm trọng về mặt kinh tế cho người chăn nuôi (Brown và cs., 2021; Choe và cs., 2020).

Khi dịch bệnh xảy ra việc xác định nhanh, chính xác căn nguyên và điều tra các yếu tố nguy cơ dịch tễ để hạn chế sự lây lan,

giảm thiệt hại về kinh tế là điều quan trọng (Aliro và cs., 2022). Việc chẩn đoán phân biệt trong thực địa là rất khó khăn, bởi vì hai bệnh ASF và CSF có nhiều điểm tương đồng về biểu hiện lâm sàng. Khi bệnh xảy ra ở thể quá cấp và cấp tính các biểu hiện đặc trưng chưa xuất hiện thì việc chẩn đoán trong phòng thí nghiệm là phương pháp chẩn đoán thường được lựa chọn (Gallardo và cs., 2021). Một kết quả tối ưu nhất là khi kết hợp kết quả từ phòng thí nghiệm và dữ liệu từ những yếu tố dịch tễ liên quan (Aliro và cs., 2022; Penrith và Vosloo, 2009). Hiện nay, một số phương pháp thường được sử dụng để phát hiện virus gồm phân lập virus, miễn dịch huỳnh quang trực tiếp (Direct fluorescent antibody test-DIFT), PCR và Real-time PCR, mỗi phương pháp đều có ưu điểm và nhược điểm riêng (OIE, 2019a; b; Oura và cs., 2013). Phương pháp Real-time PCR là phương pháp có độ nhạy, độ đặc hiệu cao, xét nghiệm được trên nhiều nền mẫu lâm sàng khác nhau (Gallardo và cs., 2021; Oura và cs., 2013). Đây là các phương pháp đang được sử dụng rộng rãi tại Việt Nam để chẩn đoán bệnh ASF và CSF. Tuy nhiên, hiện nay các quy trình xét nghiệm thường chỉ xét nghiệm riêng lẻ từng bệnh điều này dẫn tới tốn kém về mặt thời gian, nguyên liệu, hóa chất... Phương pháp multiplex Real-time RT-PCR đã được nghiên cứu phát triển trước đây và đã được áp dụng ở nhiều nước trên thế giới (Haines và cs., 2013; Liu và cs., 2022). Ở Việt Nam, phương pháp này cũng đã được áp dụng để phát hiện nhiều tác nhân khác nhau. Tuy nhiên, việc việc nghiên cứu áp dụng phương pháp này trong các phòng thí nghiệm để xét nghiệm đồng thời hai bệnh trên còn hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu tối ưu hóa phương pháp multiplex Real-time RT-PCR để phát hiện đồng thời virus gây bệnh dịch tả lợn Châu Phi và virus gây bệnh dịch tả lợn cổ điển. Đây là một trong những giải pháp góp phần

nâng cao hiệu quả công tác chẩn đoán xét nghiệm cũng như phòng chống các dịch bệnh này tại Việt Nam.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu này tập trung vào nội dung đánh giá hiệu quả của phương pháp multiplex Real-time RT-PCR để phát hiện virus gây bệnh dịch tả lợn Châu Phi và virus gây bệnh dịch tả lợn cổ điển. Hiệu quả của phương pháp được đánh giá bằng các chỉ tiêu như: Hiệu suất của phản ứng, giới hạn phát hiện, độ đặc hiệu phân tích (độ chọn lọc), độ nhạy, độ đặc hiệu chẩn đoán, độ lặp lại và tái lập. Các thí nghiệm với phản ứng Multiplex Real-time RT-PCR được thực hiện tại phòng thí nghiệm, thuộc Trạm Chẩn đoán xét nghiệm bệnh động vật, Chi cục Thú y vùng IV. Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 5 đến tháng 10 năm 2022.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu virus ASF và CSF là các mẫu thực địa (được thu thập trong đợt dịch trước đây) đã được chẩn đoán là dương tính và âm tính bằng phương pháp sRealtime RT-PCR. Các mẫu (dạng đã tách chiết DNA/RNA) hiện đang được lưu giữ tại Trạm chẩn đoán xét nghiệm bệnh động vật, Chi cục Thú y vùng IV. Bên cạnh đó các RNA của các virus như: Lở mồm long

móng (FMDV), Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV), cúm lợn (SIV) thu thập được từ các mẫu đã xét nghiệm trước đây cũng được sử dụng để kiểm tra độ đặc hiệu của mReal-time RT-PCR. Đối chứng dương chuẩn là các plasmid tái tổ hợp có chứa trình tự của đoạn gene mục tiêu để phát hiện ASFV và CSFV (p-ASFV và p-CSFV có nồng độ là $1,25 \times 10^{10}$ copies/ μ L mỗi loại) được cung cấp bởi công ty cổ phần công nghệ TBR (Bình Tân, thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp tách chiết RNA/DNA

Các mẫu từ các địa phương gửi đến để xét nghiệm bệnh ASF và CSF có thể là máu, gan, lách, hạch bẹn... Mẫu được xử lý thành huyền dịch 10% với dung dịch Phosphate-Buffered Saline (PBS, pH = 7,4) vô trùng. Sau đó ly tâm 1000 g trong 5 phút, thu dịch nổi. Dịch nổi sẽ được sử dụng để tách DNA/RNA bằng kit MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) chạy trên máy KingFisher™ Purification System (Thermo Fisher, Phần Lan), các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi tách chiết DNA/RNA đã được bảo quản ở 4-8°C.

2.3.2. Đoạn môi, đầu dò, thành phần và chu kỳ nhiệt của mReal-time RT-PCR

Bảng 1. Trình tự môi, mẫu dò sử dụng trong phản ứng mReal-time RT-PCR

Môi/dò	Trình tự (5'-3')	Nguồn tham khảo
ASFV-F	CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA	
ASFV-Probe	FAM-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-TAMRA	King và cs. (2003)
ASFV-R	GATACCACAAGATCAGGCCGT	
CSFV-F	CCCTGGGTGGTCTAAG	
CSFV-Probe	TET-CCTGAGTACAGGACAGTCGTCAGTAGTT-BHQ1	Risatti và cs. (2003)
CSFV-R	CATGCCCTCGTCCAC	

Phản ứng mReal-time RT-PCR được thực hiện bằng cách sử dụng kit nhân gene Sensifast Probe No-Rox (Median, Anh), các bước thực hiện theo hướng dẫn nhà sản. Thành phần phản ứng mReal-time RT-PCR

xuất gồm: Nước không có Dnase/Rnase 2,4 μ L; 2X Buffer 10 μ L; 0,5 μ L mỗi môi đặc hiệu cho ASFV và CSFV (nồng độ 20 pmol/ μ L); 0,5 μ L đoạn dò (nồng độ 6 pmol/ μ L); 0,4 μ L Ribosafe Rnase Inhibitor;

0,2 μ L Reverse transcriptase và 4 μ L mẫu. Phản ứng mRealtimeRT-PCT được chạy trên máy Real-time PCR (CFX96 Touch

Real-time System, Singapore) với chu kỳ nhiệt và thời gian cho mỗi bước được mô tả ở Bảng 2.

Bảng 2. Chương trình nhiệt cho phản ứng mReal-time RT-PCR

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ	Nguồn tham khảo
45°C	10 phút	1 chu kỳ	Tổng cục Tiêu chuẩn
95°C	2 phút		
95°C	15 giây	45 chu kỳ	Đo lường Chất lượng (2019a; b).
60°C	45 giây		

2.3.3. Tối ưu hóa phương pháp mReal-time RT-PCR

Plasmids của ASFV và CSFV được pha loãng bậc 10 (chọn từ nồng độ $1,25 \times 10^9$ đến $1,25 \times 10^0$ copies/ μ L) để xây dựng đường chuẩn và khảo sát giới hạn phát hiện của phương pháp. Trong nội dung này, phương pháp Real-time RT-PCR đơn môi (sReal-time RT-PCR) được sử dụng như phương pháp tham chiếu. Độ ổn định của đường chuẩn được đánh giá qua (1) hệ số tương quan R^2 , đánh giá độ chính xác thao tác thực hiện là phải đạt từ 0,975 (Pestana và cs., 2010) hoặc 0,99 (Phạm Hùng Vân, 2009); (2) Hiệu quả khuếch đại E, trong điều kiện lý tưởng giá trị $E = 100\%$, tuy nhiên trong thực tế thì giá trị E chấp nhận được ở mức 80-110 (Pestana và cs., 2010) hoặc 90-105% (Phạm Hùng Vân, 2009). Giới hạn phát hiện được xác định tại nồng độ cuối cùng còn cho kết quả dương tính ở cả 3 lần lặp lại. Sau đó giá trị Ct ở cùng 1 nồng độ giữa hai phương pháp sReal-time RT-PCR và mReal-time RT-PCR được so sánh.

Độ lặp lại và tái lặp của mReal-time RT-PCR được đánh giá bằng cách sử dụng 03 nồng độ (cao, trung bình, thấp) của hỗn hợp p-ASFV và p-CSFV tiến hành chạy lặp lại 3 lần của cùng 1 nồng độ trong cùng 1 lần chạy để đánh giá độ lặp lại và tiến hành chạy lặp lại 03 lần chạy khác nhau để đánh giá độ tái lặp.

Độ đặc hiệu phân tích (hay mức độ phản ứng chéo với một số virus tương đồng) của phương pháp mReal-time RT-PCR được đánh giá bằng cách thực hiện trên mẫu DNA/RNA của các virus ASF (5 mẫu dương và 5 mẫu âm), CSF (5 mẫu dương và

5 mẫu âm); FMD (Foot and mouth Disease, 5 mẫu), PRRS (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, 5 mẫu), SIV (swine influenza virus, 5 mẫu).

Độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán của mReal-time RT-PCR được đánh giá bằng cách sử dụng các mẫu DNA/RNA của virus ASF và CSF đã có kết quả xét nghiệm dương tính và âm tính bằng phương pháp sReal-time PCR và sReal-time RT-PCR. Trong nghiên cứu này, 75 mẫu thực địa (10 mẫu dương tính với CSFV, 15 mẫu dương tính với ASFV và 50 mẫu âm tính với cả CSFV và ASFV bằng phương pháp sReal-time RT-PCR) đã được sử dụng để đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán.

Xét nghiệm mReal-time RT-PCR trên mẫu thực địa: Các mẫu máu, mẫu mô được gửi đến xét nghiệm tại Chi cục Thú y vùng IV. Các mẫu này được tách chiết và chạy nhân gene theo phương pháp sRealtime RT-PCR và phương pháp mReal-time RT-PCR. Trong quá trình tách chiết DNA/RNA thì sử dụng mẫu đối chứng dương đã biết trước giá trị Ct để kiểm tra quá trình tách chiết. Tương tự khi chạy phản ứng nhân gene cũng sử dụng mẫu đối chứng dương DNA/RNA đã biết trước giá trị Ct.

2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu

Giới hạn phát hiện của phương pháp được đánh giá trên mẫu đối chứng dương được xác định qua giá trị Ct tại nồng độ pha loãng thấp nhất vẫn cho kết quả dương tính. Độ đặc hiệu được xác định qua xác định mức độ phản ứng chéo với một số virus khác FMD, PRRS, SIV.

Cách tính độ nhạy và độ đặc hiệu của mReal-time RT-PCR.

Bảng 3. Kết quả giả định để áp dụng trong công thức tính độ nhạy của phương pháp

Kết quả	Mẫu chứng (+)	Mẫu chứng (-)
Mẫu có kết quả dương tính (+)	TP	FP
Mẫu có kết quả âm tính (-)	FN	TN

Trong đó:

TP (True Positive): Dương tính đúng (Mẫu chứng có kết quả dương tính, kết quả phân tích cho kết quả dương tính); FP (False Positive): Dương tính giả (Mẫu chứng có kết quả âm tính, kết quả phân tích cho kết quả dương tính); FN (False Negative): Âm tính giả (Mẫu chứng có kết quả dương tính, kết quả phân tích cho kết quả âm tính); TN (True Negative): Âm tính đúng (Mẫu chứng có kết quả âm tính, kết quả phân tích cho kết quả âm tính).

Độ nhạy của phương pháp được tính

$$\text{theo công thức: } SE = \frac{TP}{TP + FN} \times 100$$

Độ đặc hiệu của phương pháp được

$$\text{tính theo công thức: } SP = \frac{TN}{TN + FP} \times 100$$

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

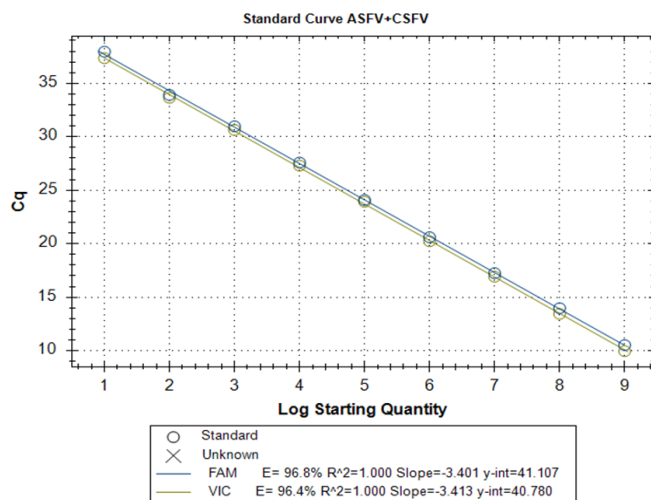
3.1. Kết quả đánh giá hiệu quả của phương pháp mReal-time RT-PCR

3.1.1. Đường chuẩn và giới hạn phát hiện của phương pháp

Bảng 4. Giá trị Ct khi thực hiện mReal-time RT-PCR với p-ASFV và p-CSFV ở các mức pha loãng khác nhau

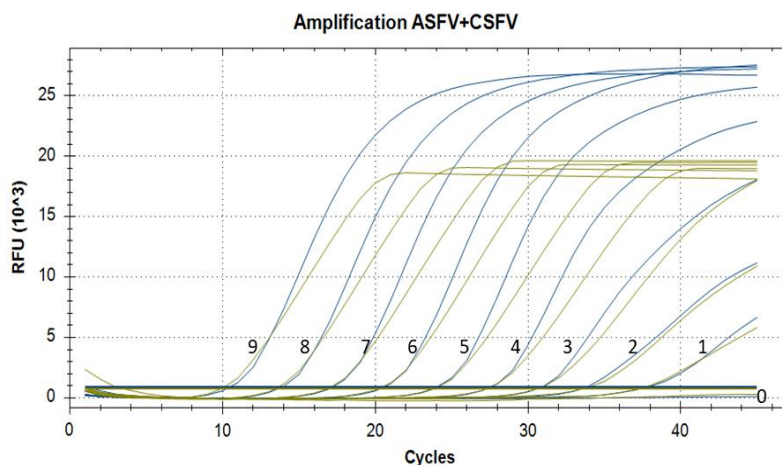
Phương pháp	Nồng độ pha loãng p-ASFV (1,25 × copies/μL)										Lần chạy thứ
	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	
sRT-PCR	9,15	13,02	16,33	19,75	23,30	26,05	29,19	33,01	37,06	-	1
mRT-PCR	10,52	13,97	17,25	20,25	24,09	27,6	30,98	33,92	37,97	-	1
	10,40	14,05	17,78	21,11	25,45	28,96	31,66	34,03	38,10	-	2
	10,74	13,84	17,2	20,6	24,16	27,57	30,78	34,25	38,12	-	3
Mean	10,55	13,95	17,41	20,65	24,57	28,04	31,14	34,07	38,06	-	
SD	0,141	0,087	0,262	0,353	0,625	0,648	0,377	0,137	0,066	-	
Phương pháp	Nồng độ pha loãng p-CSF (1,25 × copies/μL)										Lần chạy thứ
	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	
sRT-PCR	9,06	13,58	16,56	19,22	23,11	26,56	29,35	33,11	37,19	-	1
mRT-PCR	9,26	13,53	17,59	20,77	24,27	28,82	31,35	34,53	37,4	-	1
	9,96	13,44	16,92	20,24	23,93	27,31	30,64	33,66	37,36	-	2
	10,17	13,39	16,59	20,43	23,81	27,53	30,96	34,06	38,2	-	3
Mean	9,80	13,45	17,03	20,48	24,00	27,89	30,98	34,08	37,65	-	
SD	0,389	0,058	0,416	0,219	0,195	0,666	0,290	0,356	0,387	-	

Mean và SD: trung bình và độ lệch chuẩn giá trị Ct của 3 lần lặp lại khi chạy bằng phương pháp Realtime RT-PCR



Hình 1: Đường chuẩn của phương pháp mReal-time RT-PCR thể hiện mối quan hệ số copies trong các mẫu chuẩn (trục hoành) và chu kỳ ngưỡng (trục tung).

Nồng độ của *p*-ASFV và *p*-CSFV được pha loãng từ $(1,25 \times 10^9$ đến $1,25 \times 10^0$). Giới hạn phương pháp ở mức $1,25 \times 10^1$ copies/ μ L; *FAM: đường chuẩn khi sử dụng *p*-ASFV; VIC: đường chuẩn khi sử dụng *p*-CSFV



Hình 2. Mối quan hệ giữa chu kỳ ngưỡng (trục hoành) và mức tín hiệu huỳnh quang (trục tung) từ các ống phản ứng.

Nồng độ *p*-ASFV và *p*-CSFV được pha loãng từ $(1,25 \times 10^9$ đến $1,25 \times 10^0$ copies/ μ L). Các đường số 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 tương ứng với các mức pha loãng plasmid là $1,25 \times 10^0$, $1,25 \times 10^1$, $1,25 \times 10^2$, $1,25 \times 10^3$, $1,25 \times 10^4$, $1,25 \times 10^5$, $1,25 \times 10^6$, $1,25 \times 10^7$, $1,25 \times 10^8$, $1,25 \times 10^9$. Đường cong màu vàng là kết quả khi chạy với *p*-CSFV, đường màu xanh là kết quả khi chạy với *p*-ASFV.

Trong nghiên cứu này 2 plasmid (*p*-CSFV và *p*-ASFV) biết trước số bản copies đã được pha loãng theo bậc 10 (từ $1,25 \times 10^9$ đến $1,25 \times 10^0$) để đánh giá giới hạn phát hiện của phương pháp mReal-time RT-PCR. Kết quả cho thấy ở mức nồng độ $1,25 \times 10^1$ copies/ μ L phương pháp vẫn phát hiện được cả hai plasmid, tương đương với giới

hạn phát hiện của phương pháp sReal-time RT-PCR. Kết quả giá trị Ct ở phương pháp mReal-time RT-PCR và sReal-time RT-PCR tương đương nhau (mReal-time RT-PCR là 38,06 với ASFV và 37,65 với CSFV so với sReal-time RT-PCR là 37,06 và 37,19) (Bảng 4).

Kết quả xây dựng đường chuẩn cho phương pháp mReal-time RT-PCRT cho thấy cả hệ số tương quan (R) và hiệu quả của PCR (E%) đều thỏa mãn cho phản ứng Real-time để xét nghiệm. Trong đó, hệ số tương quan áp dụng với cả ASFV và CSFV là 1; hiệu quả phản ứng tương ứng là 96,8 và 96,4 %; với độ dốc của đường chuẩn tương ứng là -3,401 và -3,413 (hình 1). Trong phản ứng Real-time RT-PCR, mẫu có giá trị Ct < 40 được coi là dương tính, giá

trị Ct từ 40 – 45 được coi là nghi ngờ và không có giá trị Ct được xem là âm tính (Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng, 2019a; b). Nhưng trong nghiên cứu này, sử dụng mRealtimeRT-PCR mẫu dương tính chỉ cho giá trị Ct < 39, kết quả này tương đương với kết quả của một số nghiên cứu trước đây (Haines và cs., 2013; Liu và cs., 2022).

3.1.2. Độ lặp lại của phương pháp

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ lặp và độ tái lặp của phương pháp

Lần chạy	Plasmid	Nồng độ (copies/ μ L)	Giá trị Ct			Mean	SD	CV
1	p-ASFV	$1,25 \times 10^7$	17,41	17,21	17,29	17,30	0,101	0,58
		$1,25 \times 10^5$	23,64	23,46	23,11	23,40	0,27	1,15
		$1,25 \times 10^3$	29,91	29,49	30,27	29,89	0,39	1,31
	p-CSFV	$1,25 \times 10^7$	17,06	17,35	17,14	17,18	0,15	0,87
		$1,25 \times 10^5$	23,57	23,79	23,22	23,53	0,29	1,22
		$1,25 \times 10^3$	30,24	29,62	29,75	29,87	0,33	1,09
2	p-ASFV	$1,25 \times 10^7$	16,34	16,55	16,24	16,38	0,16	0,97
		$1,25 \times 10^5$	23,68	23,16	23,51	23,45	0,27	1,13
		$1,25 \times 10^3$	30,62	30,13	30,02	30,26	0,32	1,06
	p-CSFV	$1,25 \times 10^7$	16,16	16,24	16,33	16,24	0,09	0,52
		$1,25 \times 10^5$	23,51	23,89	23,35	23,58	0,28	1,18
		$1,25 \times 10^3$	30,95	30,41	31,19	30,85	0,40	1,29
3	p-ASFV	$1,25 \times 10^7$	16,19	16,21	16,09	16,16	0,064	0,40
		$1,25 \times 10^5$	23,29	23,55	23,11	23,32	0,22	0,95
		$1,25 \times 10^3$	30,18	30,65	30,83	30,55	0,34	1,10
	p-CSFV	$1,25 \times 10^7$	16,48	16,28	16,31	16,36	0,11	0,66
		$1,25 \times 10^5$	23,3	23,14	23,57	23,34	0,22	0,93
		$1,25 \times 10^3$	30,93	31,03	30,42	30,79	0,33	1,06

p-ASFV-plasmide African Swine fever virus: plasmide của virus dịch tả lợn Châu Phi; p-CFSV-plasmide Classical Swine fever virus: plasmide của virus dịch tả lợn cổ điển

Độ lặp lại của phương pháp là chỉ tiêu được áp dụng nhằm đánh giá sự sai khác giữa các lần thực hiện phản ứng, hay sự đồng đều giữa các lần thực hiện của phản ứng và được thực hiện bởi ba kỹ thuật viên khác nhau. Kết quả ở Bảng 5, cho thấy phản ứng sau khi được lặp lại 3 lần ở mỗi nồng

độ của từng p-ASFV và p-CSFV, được lặp lại với ba lần chạy không có sự sai khác của giá trị Ct và giá trị độ biến động (CV) ở các lần lặp đều thấp hơn 2% đúng theo khuyến cáo của OIE (OIE, 2019a; b) và TCVN do Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng công bố (Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng, 2019a; b).

3.1.3. Độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp

Bảng 6. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu phân tích của phương pháp

	Loại mẫu	Số mẫu	Kết quả mRT-PCR	
			Dương tính	Âm tính
Kết quả tham chiếu sRT-PCR	Mẫu dương tính ASF	5	5	0
	Mẫu âm tính ASF	5	0	5
	Mẫu dương tính CSF	5	5	0
	Mẫu âm tính CSF	5	0	5
	Dương tính FMD (âm tính ASF và CSF)	5	0	5
	Dương tính PRRS (âm tính ASF và CSF)	5	0	5
	Dương tính SIV (âm tính ASF và CSF)	5	0	5
	Độ đặc hiệu phân tích (chọn lọc) ASF		100	
	Độ đặc hiệu phân tích (chọn lọc) CSF		100	

ASF-African Swine fever: bệnh dịch tả lợn Châu Phi; CFS- Classical Swine fever: bệnh dịch tả lợn cổ điển; FMD-Food and mouth disease: bệnh lở mồm long móng; PRRS- Porcine reproductive and respiratory syndrome: Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp; SIV-Swine influenza: bệnh cúm lợn

Bảng 7. Kết quả đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán của phương pháp

	Số mẫu	Kết quả của mReal-time RT-PCR	
		Dương tính	Âm tính
<i>Phát hiện CSFV</i>			
Kết quả của sRealtime RT-PCR	Dương tính	10	0
	Âm tính	50	50
Độ nhạy chẩn đoán (%)		100	
Độ đặc hiệu chẩn đoán (%)		100	
<i>Phát hiện ASFV</i>			
Kết quả của sRealtime RT-PCR	Dương tính	15	0
	Âm tính	50	49
Độ nhạy chẩn đoán (%)		100	
Độ đặc hiệu chẩn đoán (%)		98,0	

ASF-African Swine fever: bệnh dịch tả lợn Châu Phi; CFS- Classical Swine fever: bệnh dịch tả lợn cổ điển

Độ đặc hiệu phân tích được sử dụng để đánh giá mức độ đặc hiệu với virus cần phát hiện và các virus khác (Diaz, 2014; Minakshi và cs., 2016). Các mẫu khác nhau gồm 5 mẫu dương tính và 5 mẫu âm tính với ASF, 5 mẫu dương tính và 5 mẫu âm tính với CSFV. Ngoài ra 5 mẫu dương tính FMDV, 5 mẫu dương tính PRRSV và 5 mẫu dương tính SIV đã được khẳng định là những mẫu âm tính với ASF và CSF bằng phương pháp tham chiếu sReal-time RT-PCR được thử nghiệm trong phản ứng mReal-time RT-PCR để đánh giá độ đặc hiệu. Kết quả cho thấy cả 10 mẫu đối chứng dương (gồm 5 mẫu CSFV và 5 mẫu ASFV) đều cho kết quả dương tính, ngược lại 10 mẫu đối chứng âm (5 mẫu ASFV và 5 mẫu CSFV) đều có kết quả âm tính và 15 mẫu

(gồm 5 mẫu FMDV, 5 mẫu PRRSV và 5 mẫu SIV) cũng cho kết quả âm tính (bảng 6). Điều này cho thấy phương pháp mReal-time RT-PCR này không đặc hiệu với các virus FMD, PRRS và SIV; đồng thời phản ứng cũng không bị ảnh hưởng (ức chế) bởi sự có mặt của các thành phần khác. Từ đó dẫn đến hạn chế được hiện tượng âm tính giả và dương tính giả khi áp dụng phản ứng trong chẩn đoán mẫu thực địa (Haines và cs., 2013).

Độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán được xác định bằng cách sử dụng các mẫu đối chứng đã được xác định là dương tính hoặc âm tính bằng phương pháp tham chiếu sReal-time RT-PCR. Những mẫu thu thập từ thực địa âm tính (khi chạy sRealtime RT-PCR) cũng được sử dụng để thiết lập các

ước tính về độ nhạy hoặc độ đặc hiệu chẩn đoán của phản ứng (Diaz, 2014; Minakshi và cs., 2016). Kết quả ở bảng 7 cho thấy, trong 60 mẫu kiểm tra sự hiện diện của CSFV bằng mReal-time RT-PCR cho kết quả tương đồng 100% với phương pháp sReal-time RT-PCR (cả mẫu âm tính và mẫu dương tính). Trong khi, với 65 mẫu kiểm tra sự hiện diện của ASFV bằng mReal-time RT-PCR thì có mức độ tương đồng 100% với 15 mẫu dương tính, nhưng trong số 50 mẫu âm tính bằng kiểm tra sReal-time RT-PCR thì có 1 mẫu dương

tính giả khi kiểm tra bằng mReal-time RT-PCR. Với kết quả này, áp dụng mReal-time RT-PCR để phát hiện đồng thời CSFV và ASFV, cho độ nhạy chẩn đoán là 100%; trong khi đó, độ đặc hiệu chẩn đoán là 100% với phát hiện CSFV và 98,0% đối với phát hiện ASFV. Độ đặc hiệu chẩn đoán của phương pháp này tương đương với phương pháp triplex RT-PCR (97,3%) để phát hiện CSFV và ASFV được phát triển bởi Haines và cs. (2013).

3.2. Ứng dụng mReal-time RT-PCR với mẫu lâm sàng

Bảng 8. Kết quả áp dụng phương pháp mReal-time RT-PCR trên mẫu thực địa

Năm	Số mẫu	ASFV		CSFV		ASFV + CSFV	
		+	Tỷ lệ (%)	+	Tỷ lệ (%)	+	Tỷ lệ (%)
2019	30	10	33,33	5	16,67	1	3,33
2020	20	10	50,00	2	10,00	1	5,00
2021	20	8	40,00	0	0,00	0	0,00
2022	20	10	50,00	1	5,00	0	0,00
Tổng	90	38	42,22	8	8,89	2	2,22

ASFV-African Swine fever virus: Virus gây bệnh dịch tả lợn Châu Phi; CFVS- Classical Swine fever virus: virus bệnh dịch tả lợn cổ điển

Tổng số 90 mẫu được thu thập từ năm 2019 đến tháng 06 năm 2022, trong các đợt bùng phát dịch bệnh dịch tả lợn cổ điển và dịch tả lợn Châu Phi ở khu vực Nam Trung bộ đã được sử dụng để phát hiện CSFV và ASFV bằng mReal-time RT-PCR được phát triển trong nghiên cứu này. Kết quả cho thấy tỷ lệ mẫu dương tính với ASFV và CSFV tương ứng là 42,22% (38/90) và 8,89% (8/90), trong khi tỷ lệ đồng nhiễm là 2,22% (2/90) (bảng 7). Diễn biến qua các năm cho thấy tỷ lệ mẫu dương tính với ASFV cao nhất ở các năm 2020 và 2022 (10/20, 50%); thấp nhất ở năm 2019 với tỷ lệ nhiễm chỉ là 33,33% (10/30). Trong khi đó mẫu dương tính với CSFV cao nhất ở năm 2019 (5/30, 16,67%) và năm 2021 không có mẫu nào dương tính với CSFV. Kết quả này tương đồng với một số kết quả nghiên cứu trước đây, khi áp dụng phương pháp mới vào chẩn đoán mẫu thực địa để phát hiện CSFV và ASFV của Haines và cs. (2013); (Liu và cs., 2022). Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu về tỷ lệ mắc bệnh ASFV và CSFV trên lợn ở một số nước trên thế giới và Việt Nam (Choe và cs.,

2020; Le và cs., 2019; Lee và cs., 2021; Tran và cs., 2020)

4. KẾT LUẬN

Phương pháp mReal-time RT-PCR được đánh giá trong nghiên cứu này có hiệu suất phản ứng mReal-time RT-PCR cho ASFV và CSFV là 96,8 % và 96,4%; giới hạn phát hiện là 12,5 copies/μL đối với ASFV và CSFV. Phương pháp mReal-time RT-PCR có độ nhạy chẩn đoán đối với xét nghiệm ASFV và CSFV là 100%. Độ đặc hiệu chẩn đoán của phương pháp với ASFV và CSFV là 98,0% và 100% theo thứ tự. Kết quả thí nghiệm được từ phân tích các chỉ tiêu đánh giá và phân tích mẫu thực địa cho thấy phương pháp mReal-time RT-PCR có đủ điều kiện để áp dụng xét nghiệm phát hiện đồng thời virus CSF và ASF.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn sự quan tâm giúp đỡ của lãnh đạo và các cán bộ Chi cục Thú y vùng IV đã tạo mọi điều kiện thuận lợi trong suốt quá trình thực hiện đề tài. Nhóm tác giả cũng xin ghi nhận một phần hỗ trợ của Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế theo Chương trình Nhóm nghiên cứu mạnh cấp trường mã số

NCM.DHNL2022.02 “An toàn thực phẩm có nguồn gốc động vật”, theo quyết định số 139/QĐ-ĐHNL ngày 10/03/2022.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng (2019a). Tiêu chuẩn quốc gia, TCVN 8400-41:2019. Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán: Phần 41: Bệnh dịch tả lợn Châu phi. Trung tâm Thông tin – Truyền thông (ISMQ), Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng. TCVN 8400-41:2019

Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng (2019b). Tiêu chuẩn quốc gia, TCVN 8400-47:2019. Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán: Phần 47: Bệnh dịch tả lợn cổ điển. Trung tâm Thông tin – Truyền thông (ISMQ), Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng. TCVN 8400-47:2019 .

Phạm Hùng Vân. (2009). “Polymerase Chain Reaction- Các vấn đề cơ bản”, *PCR và real-time PCR các vấn đề cơ bản và các ứng dụng thường gặp*, Nhà xuất bản Y học, 9- 24.

Tài liệu tiếng nước ngoài

Aliro, T., Chenais, E., Odongo, W., Okello, D. M., Maseembe, C. & Ståhl, K. (2022). Prevention and Control of African Swine Fever in the Smallholder Pig Value Chain in Northern Uganda: Thematic Analysis of Stakeholders' Perceptions. *Frontiers Veterinary Science*, 8, 707819. doi: 10.3389/fvets.2021.707819.

Blome, S., Franzke, K. & Beer, M. (2020). African swine fever – A review of current knowledge. *Virus Research*, 287, 198099. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198099>.

Brown, V. R., Miller, R. S., McKee, S. C., Ernst, K. H., Didero, N. M., Maison, R. M., Grady, M. J. & Shwiff, S. A. (2021). Risks of introduction and economic consequences associated with African swine fever, classical swine fever and foot-and-mouth disease: A review of the literature. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(4), 1910-1965. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13919>.

Choe, S., Le, V. P., Shin, J., Kim, J. H., Kim, K. S., Song, S., Cha, R. M., Park, G. N., Nguyen, T. L., Hyun, B. H., Park, B. K. & An, D. J. (2020). Pathogenicity and Genetic Characterization of Vietnamese Classical

Swine Fever Virus: 2014-2018. *Pathogens*, 9(3). DOI: 10.3390/pathogens9030169.

Diaz, F. (2014). *OIE Standard on principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases*. Proceedings of the OIE Regional Workshop for OIE National Focal Points for Veterinary Products, Tokyo, Japan.

Dixon, L. K., Sun, H. & Roberts, H. (2019). African swine fever. *Antiviral Research*, 165, 34-41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.018>.

Galindo, I., & Alonso, C. (2017). African Swine Fever Virus: A Review. *Viruses*, 9(5), 103-113. DOI: 10.3390/v9050103.

Gallardo, C., Soler, A., Nurmoja, I., Cano-Gómez, C., Cvetkova, S., Frant, M., Woźniakowski, G., Simón, A., Pérez, C., Nieto, R. & Arias, M. (2021). Dynamics of African swine fever virus (ASFV) infection in domestic pigs infected with virulent, moderate virulent and attenuated genotype II ASFV European isolates. *Transbound Emerging Diseases*, 68(5), 2826-2841. DOI: 10.1111/tbed.14222.

Haines, F. J., Hofmann, M. A., King, D. P., Drew, T. W. & Crooke, H. R. (2013). Development and validation of a multiplex, real-time RT PCR assay for the simultaneous detection of classical and African swine fever viruses. *PLoS One*, 8(7), e71019. doi: 10.1371/journal.pone.0071019.

King, D. P., Reid, S. M., Hutchings, G. H., Grierson, S. S., Wilkinson, P. J., Dixon, L. K., Bastos, A. D. S. & Drew, T. W. (2003). Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *Journal of Virological Methods*, 107(1), 53-61. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00189-1](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00189-1).

Le, V. P., Jeong, D. G., Yoon, S. W., Kwon, H. M., Trinh, T. B. N., Nguyen, T. L., Bui, T. T. N., Oh, J., Kim, J. B., Cheong, K. M., Van Tuyen, N., Bae, E., Vu, T. T. H., Yeom, M., Na, W. & Song, D. (2019). Outbreak of African Swine Fever, Vietnam, 2019. *Emerging Infectious Diseases*, 25(7), 1433-1435. DOI: 10.3201/eid2507.190303.

Lee, H. S., Bui, V. N., Dao, D. T., Bui, N. A., Le, T. D., Kieu, M. A., Nguyen, Q. H., Tran, L. H., Roh, J.-H., So, K.-M., Hur, T.-Y. & Oh, S.-I. (2021). Pathogenicity of an African

- swine fever virus strain isolated in Vietnam and alternative diagnostic specimens for early detection of viral infection. *Porcine Health Management*, 7(1), 36-47. DOI: 10.1186/s40813-021-00215-0.
- Linda, K. D., Charles C. Abrams, Dave G. Chapman & Fuquan Zhang (2008). *Animal Viruses: Molecular Biology*. Animal virus, Caister Academic Press: UK.
- Liu, H., Shi, K., Zhao, J., Yin, Y., Chen, Y., Si, H., Qu, S., Long, F. & Lu, W. (2022). Development of a one-step multiplex qRT-PCR assay for the detection of African swine fever virus, classical swine fever virus and atypical porcine pestivirus. *BioMed Central Veterinary Research*, 18(1), 43. DOI: 10.1186/s12917-022-03144-4.
- Mahy, B. W. J. (2008). *Animal Viruses: Molecular Biology*. Molecular Biology, Emerg Infect Dis.: Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Minakshi, P., Lambe, U., Madusudan, R. K., Pawan, K. & Joshi, V., Eds (2016). Principles and Methods of Validation of a Molecular Diagnostic Assay for Infectious Diseases. *Course Director*. Department of Veterinary medicine. Microbiology, LUVAS, Hisar.
- Moormann, R. J. & Hulst, M. M. (1988). Hog cholera virus: identification and characterization of the viral RNA and the virus-specific RNA synthesized in infected swine kidney cells. *Virus Research*, 11(4), 281-291. DOI: 10.1016/0168-1702(88)90002-0.
- Nguyen, T. T., Pham, T. N., Nguyen, N. L., Q., Dang, X. S., Lee, H. S., Nguyen, V., H., Padungtod, P., Nguyen, T. T., Nguyen, T. T., Tran, C. T. & Rich, K. M. (2021). An Assessment of the Economic Impacts of the 2019 African Swine Fever Outbreaks in Vietnam. *Front Veterinary Science*, 8, 686038. DOI: 10.3389/fvets.2021.686038.
- OIE. (2019a). *African swine fever*. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. C. A. L. Oura. World organisation for animal health.
- OIE. (2019b). *Classical swine fever* Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. P. Becher. World organisation for animal health.
- Oura, C., Edwards, L. & Batten, C. (2013). Virological diagnosis of African swine fever—comparative study of available tests. *Virus Research*, 173(1), 150-158. DOI: 10.1016/j.virusres.2012.10.022.
- Penrith, M. & Vosloo, W. (2009). Review of African swine fever: Transmission, spread and control. *Journal of the South African Veterinary Association*, 80(2), 58-62. DOI: 10.4102/jsava.v80i2.172.
- Pestana, E. A., Belak, S., Diallo, A., Crowther, J. R. & Viljoen, G. J. (2010). *Disease Diagnosis Using Real-Time PCR Specific Procedures for Important Veterinary Pathogens*. Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics - real time PCR applications. E. Pestana, S. Belak, A. Diallo, J. R. Crowther & G. J. Viljoen. Dordrecht, Springer Netherlands, 73-234.
- Risatti, G. R., Callahan, J. D., Nelson, W. M. & Borca, M. V. (2003). Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 500-505. DOI: 10.1128/jcm.41.1.500-505.2003.
- Tran, H. T. T., Dang, A. K., Ly, D. V., Vu, H. T., Van, H. T., Nguyen, C. T., Chu, N. T., Nguyen, V. T., Nguyen, H. T. & Truong, A. D. (2020). An improvement of real-time polymerase chain reaction system based on probe modification is required for accurate detection of African swine fever virus in clinical samples in Vietnam. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(10), 1683. DOI: 10.5713/ajas.19.0525.
- Zhou, X., Li, N., Luo, Y., Liu, Y., Miao, F., Chen, T., Zhang, S., Cao, P., Li, X. & Tian, K. (2018). Emergence of African swine fever in China, 2018. *Transboundary and emerging diseases*, 65(6), 1482-1484. DOI: 10.1111/tbed.12989.