

KHẢO SÁT LƯU HÀNH BỆNH DỊCH TẢ HEO CHÂU PHI TẠI THÀNH PHỐ CẦN THƠ

*Nguyễn Đức Hiền¹, Lê Trung Hoàng¹,
Nguyễn Thanh Phương¹, Huỳnh Minh Trí²*

TÓM TẮT

Tình hình lưu hành bệnh dịch tả heo châu phi (ASF) tại thành phố Cần Thơ được đánh giá qua điều tra huyết thanh học tại các cơ sở chăn nuôi trước và sau khi xảy ra dịch ASF. Đồng thời xét nghiệm mẫu hạch bạch huyết heo tại lò mổ tập trung cũng được thực hiện để tăng độ tin cậy của kết quả xét nghiệm. Kết quả xét nghiệm huyết thanh bằng ab-ELISA cho thấy tỷ lệ heo có kháng thể kháng ASFV là 6,77% và tỷ lệ này không có sự khác biệt ở heo nuôi tại các trại từng xảy ra dịch và heo nuôi tại các trại chưa từng xảy ra dịch (6,67% so với 6,80%). Tuy nhiên, kết quả xét nghiệm 339 mẫu huyết tương và 52 mẫu hạch bằng xét nghiệm realtime-PCR cho thấy tất cả các mẫu đều âm tính, chứng tỏ rằng khả năng bộc phát dịch bệnh ASF tại thành phố Cần Thơ hiện đang ở mức độ thấp.

Nghiên cứu này cung cấp dữ liệu cần thiết cho các trang trại nuôi heo xây dựng kế hoạch tái đàn sau dịch bệnh ASF tại thành phố Cần Thơ.

Từ khóa: ASF, lưu hành bệnh, heo, thành phố Cần Thơ.

Investigation on prevalence of African swine fever in Can Tho city

*Nguyen Duc Hien, Le Trung Hoang,
Nguyen Thanh Phuong, Huynh Minh Tri*

SUMMARY

The prevalence of African swine fever (ASF) in Can Tho city was assessed through the serological investigation in the livestock establishments before and after ASF outbreak. At the same time, the lymph node samples of pigs at the slaughterhouses were also tested to obtain the reliability of the investigating result. The results of serum tests by ab-ELISA showed that the rate of pigs having ASFV antibodies was 6.77% and this rate was not different between the pigs raised in the farms where ASF epidemic had occurred and the pigs raised in farms that ASF epidemic had not occurred (6.67% versus 6.80%). However, the results of testing 339 plasma samples and 52 lymph node samples by the realtime-PCR assay were negative, indicating that the possibility of ASF re-occurrence in Can Tho city is currently in low level.

This study provides the necessary data for building up a pig re-herd plan after the ASF epidemic is over in Can Tho city.

Keywords: ASF, prevalence, pig, Can Tho city.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dịch tả heo châu Phi (African swine fever, ASF) được mô tả lần đầu năm 1921 từ heo rừng châu Phi và hiện đã được phát hiện trong chăn nuôi heo của hơn 50 quốc gia. Bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi heo do chưa có

vacxin phòng bệnh. Tại Việt Nam, ASF đã được xác nhận chính thức xảy ra vào tháng 2/2019 và đến tháng 11/2019 đã gây thành dịch tại 63 tỉnh/thành với số heo chết do bệnh và buộc phải giết hủy lên đến 6 triệu heo, gây thiếu hụt nguồn cung cấp cho thị trường; dẫn đến lần đầu tiên Việt Nam phải nhập heo thịt sống để đáp ứng nhu cầu thị trường. Hiện nay ngành chăn nuôi khuyến khích người chăn nuôi tái đàn, phục hồi lại đàn heo

¹ Chi cục Chăn nuôi và Thú y thành phố Cần Thơ

² Trung tâm Nghiên cứu và phát triển Vemedim

nhằm bình ổn giá cả thị trường. Tuy nhiên do ASF là một bệnh mới tại Việt Nam, nhiều vấn đề thực tiễn của dịch bệnh tại địa phương chưa được nghiên cứu nên việc tái đàn tiềm ẩn rất nhiều rủi ro.

Tại thành phố Cần Thơ (TPCT) bệnh ASF xảy ra từ tháng 5 -11/2019 gây thiệt hại đến 65.210 heo; chiếm 52,36% tổng đàn heo nuôi. Hiện nay tình hình bệnh đã ổn định nên một số cơ sở nuôi đã thực hiện việc tái đàn, và gần đây do lợi nhuận từ nuôi heo cao nên việc tái đàn càng được gia tăng với số lượng lớn. Tuy nhiên do không có vacxin phòng bệnh nên nguy cơ tái nhiễm ASF trên heo rất cao, và hiện cũng chưa có các nghiên cứu về hệ thống miễn dịch của vật chủ chống lại ASFV, cơ chế gây bệnh, sự xâm nhập, lẫn tránh và tương tác của ASFV với ký chủ ... nên việc thực hiện các biện pháp phòng bệnh cũng chưa đầy đủ và hiệu quả. Báo cáo này xác định tỷ lệ lưu hành bệnh ASF trên đàn heo tại TPCT nhằm cung cấp

thông tin cần thiết trong xây dựng kế hoạch tái đàn thời gian tới.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Khảo sát sự hiện diện của kháng thể kháng ASFV trên heo nuôi tại TPCT trong thời gian xảy ra dịch ASF và thời điểm điều tra bằng xét nghiệm ELISA.

- Khảo sát sự hiện diện của DNA-ASFV trên huyết tương heo nuôi tại các trại, hộ gia đình và trên hạch bạch huyết heo giết mổ tại các lò mổ tập trung tại TPCT bằng xét nghiệm realtime-PCR.

- Đánh giá sự lưu hành của ASF qua kết quả khảo sát.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Bảng 1. Sơ đồ phân bố mẫu xét nghiệm

Đơn vị	Tổng đàn heo trước khi xảy ra dịch ASF	Xét nghiệm ELISA huyết thanh			Realtime-PCR	
		Trong thời gian xảy ra ASF	Sau dịch ASF		Mẫu hạch ¹ (Lò mổ tập trung)	Mẫu huyết tương (Trại, hộ)
			Trại, hộ đã xảy ra ASF	Trại, hộ chưa xảy ra ASF		
Ninh Kiều - Bình Thủy ²	9.268	59	10	63	10	61
Cái Răng ³	4.011	35	-	20	2	10
Phong Điền	7.498	63	3	58	12	38
Ô Môn	11.893	33	3	52	8	55
Thốt Nốt	15.009	35	9	18	3	27
Cờ Đỏ	27.171	129	15	39	6	54
Thới Lai	19.321	111	10	24	5	34
Vĩnh Thạnh	30.191	115	25	35	6	60
Tổng cộng	124.362	580	75	309	52	339

Ghi chú: ¹. Mỗi mẫu xét nghiệm là mẫu gộp của 5 heo giết mổ tại cùng một thời điểm, ². Địa giới hành chính là 2 quận trung tâm, nhưng quản lý về công tác thú y chỉ có 1 đơn vị duy nhất là Trạm thú y liên quận Ninh Kiều- Bình Thủy, ³. Quận Cái Răng không có heo tái đàn tại thời điểm thu mẫu.

- Mẫu xét nghiệm ELISA:

Thực hiện theo hướng dẫn của thông tư 14/2016/TT-BNNPTNT của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, với ước lượng tỷ lệ heo có kháng thể là 50%, sai số 5%, nhóm nghiên cứu đã thu thập:

+ Giai đoạn xảy ra dịch ASF tại TPCT (5-11/2019): Thu mẫu tại các trại, hộ đang có dịch (lấy mẫu trong các ô chuồng chưa có bệnh lâm sàng) và tại các trại, hộ chăn nuôi chưa xảy ra dịch ASF. Tổng số là 580 mẫu được phân bố dựa theo tổng đàn và

tình hình dịch bệnh ASF tại thời điểm thu mẫu.

+ Giai đoạn sau dịch bệnh ASF (3-5/2020): Đối với trại, hộ chăn nuôi đã từng xảy ra dịch ASF đã xử lý hủy, nay thả nuôi lại (heo tái đàn): Khảo sát tại 10% số trại, hộ tái đàn/đơn vị, thu tối thiểu 3 mẫu/trại (heo con theo mẹ thu mẫu gộp 5 heo/mẫu). Đối với các trại, hộ chăn nuôi chưa từng xảy ra dịch ASF: Thu mẫu từ 5 trại, hộ/đơn vị. Tổng số 384 mẫu gồm 75 mẫu tại các trại heo tái đàn và 309 mẫu tại các trại chưa từng xảy ra dịch.

- Mẫu xét nghiệm realtime-PCR:

Thu mẫu theo căn cứ trên, với ước lượng tỷ lệ heo có mang ASFV từ 0,5-1% tổng đàn, thực hiện thu thập:

+ Mẫu huyết tương: Thu mẫu từ heo khỏe tại các trại, hộ chăn nuôi đã từng xảy ra bệnh (heo tái đàn) và trại, hộ nuôi chưa từng xảy bệnh. Tổng cộng 339 mẫu được phân bố theo tổng đàn heo từng đơn vị

+ Mẫu hạch (dưới hàm, dạ dày, thận): Thu mẫu từ heo giết mổ tại 8 lò giết mổ heo tập trung của TPCT. Tổng cộng 52 mẫu (mẫu gộp, 5 heo/mẫu) được phân bố theo công suất lò giết mổ.

2.3. Thời gian nghiên cứu

Tháng 5/2019 - tháng 6/2020

2.4. Phương pháp lấy mẫu và bảo quản

Thực hiện theo Quy chuẩn quốc gia QCVN 01-83:2011/BNNPTNT của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

- Mẫu huyết thanh: Lấy máu bằng ống tiêm tại tĩnh mạch cổ, sau đó bơm vào ống nghiệm, để nghiêng ống nghiệm khoảng 30 phút cho đến khi máu đông, đóng nút ống nghiệm và cho vào thùng bảo ôn (2-8°C), chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 24 giờ, chiết huyết thanh cho vào ống eppendorff (loại 2ml) và bảo quản 4°C đến 8°C tối đa trong 7 ngày.

- Mẫu huyết tương: Tương tự như lấy mẫu huyết thanh nhưng bơm máu vào ống nghiệm EDTA chống đông máu.

- Mẫu hạch: Lấy mẫu hạch dưới hàm, dạ dày, thận heo giết mổ (mẫu gộp). Mẫu được bảo quản trong túi nilon hoặc lọ đựng bệnh phẩm vô trùng. Mẫu được vận chuyển trong thùng bảo ôn (2°C đến 8°C) trong vòng 24 giờ. Lưu mẫu ở nhiệt độ -20°C đến -80°C.

2.5. Phương pháp xét nghiệm

2.5.1. Xét nghiệm ELISA

Xét nghiệm được thực hiện tại phòng Chẩn đoán bệnh động vật, Chi cục Chăn nuôi và Thú y thành phố Cần Thơ. Sử dụng kit E39011 (ASFV Ab Test) của Ring Biotechnology Co., Ltd (Trung Quốc), thực hiện các bước theo hướng dẫn của kit. Đọc kết quả trên máy quang phổ Epoch Microplate (BioTek Instruments, USA) ở bước sóng 450nm. Kết quả thử nghiệm chỉ có giá trị nếu giá trị OD của đối chứng âm <0,20 và chênh lệch OD giữa đối chứng dương và âm không nhỏ hơn 0,60.

Mẫu dương tính: OD trung bình của mẫu $\geq 0,35$;

Mẫu nghi ngờ: $0,2 < \text{OD trung bình của mẫu} < 0,35$;

Mẫu âm tính: OD trung bình của mẫu <0,2.

Mẫu nghi ngờ được xét nghiệm lần 2, nếu vẫn cho kết quả nghi ngờ thì kết luận heo đã từng tiếp xúc với ASFV (thuộc nhóm mẫu dương nhưng ở mức độ xâm nhiễm virus thấp).

2.5.2. Xét nghiệm realtime-PCR

Xét nghiệm được thực hiện tại Chi cục Thú y vùng VII và Trung tâm Nghiên cứu & phát triển Vemedim. Thực hiện trên hệ thống Bio-Rad CFX96 Touch RT-PCR. Quy trình xét nghiệm chẩn đoán bệnh dịch tả lợn châu Phi theo hướng dẫn của TCVN: 8400-41:2019 gồm các bước:

- Xử lý mẫu: Mẫu hạch được nghiền (hoặc đông hóa nếu là huyết tương) với dung dịch PBS vô trùng thành huyền dịch 10%. Huyền dịch 10% được ly tâm 2500 vòng trong 15 phút và thu dịch nổi để chiết tách DNA.

- Tách chiết DNA: Sử dụng kit tách chiết InviMag® Virus DNA/RNA Mini Kit/ KfmlSTRATEC (Molecular GmbH, Germany) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Huyền dịch bệnh phẩm sau khi tách chiết DNA được bảo quản ở 4°C nếu xét nghiệm ngay hoặc bảo quản -20°C trong thời gian dài.

- Chuẩn bị môi: Sử dụng cặp môi xuôi, môi ngược và đoạn dò theo bảng 2.

Bảng 2. Trình tự môi-mẫu dò phát hiện ASFV

Tên	Trình tự (5' – 3')
Môi xuôi ASFV	CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA
Môi ngược ASFV	GATACCACAAGATCRGCCGT
Đoạn dò ASFV	FAM-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-TAMRA

Môi sử dụng ở nồng độ 20 μ M. Đoạn dò sử dụng ở nồng độ 5 μ M

2.5.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Exel.

Tỷ lệ nhiễm (%) = (Số mẫu dương tính/số mẫu

xét nghiệm) x 100.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự hiện diện của kháng thể kháng ASFV trong thời gian xảy ra bệnh

Kết quả xét nghiệm được trình bày tại bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xét nghiệm kháng thể kháng ASFV trên heo TPCT trong thời gian xảy ra dịch (5-11/2019)

Đơn vị	Kết quả chung ¹		Trại đang xảy ra dịch		Trại không xảy ra dịch	
	Số mẫu XN ²	Mẫu dương (%)	Số mẫu XN ²	Mẫu dương (%)	Số mẫu XN ²	Mẫu dương (%)
Ninh Kiều-Bình Thủy	59	16,95	20	15,00	39	17,95
Cái Răng	35	31,43	15	66,67	20	05,00
Phong Điền	63	44,44	31	61,29	32	29,00
Ô Môn	33	27,27	13	38,46	20	20,00
Thốt Nốt	35	22,86	10	50,00	25	12,00
Cờ Đỏ	129	55,81	54	68,52	75	46,67
Thới Lai	111	60,36	58	87,93	53	30,19
Vĩnh Thạnh	115	50,43	30	20,00	85	61,18
Tổng cộng	580	45,34	231	58,87	349	36,39

Ghi chú: ¹ Mẫu xét nghiệm chung, không phân loại trại có dịch và không có dịch, ² Mẫu lấy trên heo không có dấu hiệu lâm sàng bệnh ASF

Kết quả xét nghiệm huyết thanh trong thời gian xảy ra dịch ASF tại TPCT (tháng 5 -11/2019) cho thấy tỷ lệ mẫu có huyết thanh dương tính là 45,34%. Kết quả này phản ánh đúng thực trạng dịch bệnh ASF xảy ra tại TPCT năm 2019 là rất nghiêm trọng, bệnh đã gây thiệt hại 65.210 heo, chiếm 52,36% tổng đàn heo nuôi trong toàn thành phố (Chi cục Chăn nuôi và Thú y TPCT, 2019).

Phân chia số mẫu xét nghiệm theo tình hình dịch bệnh ASF cho thấy mẫu thu tại các trại, hộ chăn nuôi đang xảy ra bệnh ASF có đến 58,87% dương tính. Tỷ lệ mẫu dương tính trong khảo sát

này thấp hơn so với tỷ lệ mẫu dương tính được khảo sát ở Quảng Ninh năm 2019 là 73,77% (Phan Thị Hồng Phúc và cs., 2020). Tuy nhiên sự sai khác có thể là do tại Quảng Ninh nhóm nghiên cứu đã lấy mẫu trên heo nghi bệnh và sử dụng xét nghiệm realtime-PCR để kiểm tra kháng nguyên gây bệnh, trong khi đó dù thu mẫu trong các trại đang xảy ra dịch ASF nhưng chúng tôi lấy mẫu heo khỏe mạnh về lâm sàng và sử dụng xét nghiệm ab-ELISA. Realtime-PCR xác định được virus ngay khi xâm nhiễm, trong khi xét nghiệm ab-ELISA cần thời gian sinh kháng thể nên chậm trễ hơn. Theo Giménez-Lirola và cs. (2016), xét

nghiệm ELISA có khả năng phát hiện được kháng thể kháng ASFV sau 8 ngày virus xâm nhiễm.

Kết quả xét nghiệm ở bảng 3 cũng cho thấy dù mẫu được thu trong các trại đang xảy ra dịch ASF nhưng vẫn có 41,13% mẫu âm tính với ab-ELISA. Như vậy với trạng thái lâm sàng khỏe mạnh, những heo có kết quả xét nghiệm âm tính này có thể xem xét chuyển sang hình thức xử lý giết mổ hoặc cách ly khi được phúc kiểm lại bằng realtime-PCR (thay cho hình thức xử lý giết và chôn hủy toàn đàn) để giảm thiệt hại kinh tế cho người nuôi theo hướng dẫn số 3708/HD-BNN-TY của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Ngược lại, tại các trại, hộ chăn nuôi không xảy ra ASF vẫn có 36,39% mẫu có kết quả dương tính ab-ELISA, kết quả này cho thấy đã có sự xâm nhiễm của ASFV vào đàn heo

ở các trại, hộ chăn nuôi nhưng heo không thể hiện bệnh lý lâm sàng. Do vậy để bảo đảm công tác phòng chống dịch ASF có hiệu quả thì trong thời gian xảy ra dịch cần kiểm soát tình trạng mang trùng của tất cả heo trong vùng dịch trước khi giết mổ bằng xét nghiệm realtime-PCR.

3.2. Khảo sát sự lưu hành của bệnh ASF trên đàn heo

3.2.1. Sự hiện diện của kháng thể ASFV sau thời gian xảy ra dịch bệnh ASF

Khảo sát sự lưu hành của ASF trên đàn heo sau dịch ASF được thực hiện thông qua điều tra huyết thanh học năm 2020. Kết quả được trình bày qua bảng 4.

Bảng 4. Kết quả xét nghiệm kháng thể kháng ASFV sau dịch bệnh (tháng 3- 5/2020)

Đơn vị	Trại đã xảy ra dịch ASF (tái đàn)			Trại không xảy ra dịch ASF		
	Số trại, hộ nuôi	Số mẫu XN	Mẫu dương (%)	Số trại, hộ nuôi	Số mẫu XN	Mẫu dương (%)
Ninh Kiều – Bình Thủy	3	10	0	5	63	0,00
Cái Răng		-	-	5	20	25,00
Phong Điền	1	3	0	5	58	0,00
Ô Môn	1	3	0	5	52	19,23
Thốt Nốt	3	9	0	5	18	16,67
Cờ Đỏ	3	15	33,33	5	39	0,00
Thới Lai	2	10	0	5	24	12,50
Vĩnh Thạnh	5	25	0	5	35	0,00
Tổng cộng	18	75	6,67	40	309	6,80

Ghi chú: Quận Cái Răng không có heo tái đàn tại thời điểm lấy mẫu

Kết quả xét nghiệm huyết thanh heo tại các trại đã từng xảy ra bệnh ASF có tỷ lệ dương tính là 6,67%. Do không có vacxin để phòng bệnh ASF và hiện chỉ có một serotype được công nhận (OIE, 2019) cho nên sự hiện diện của kháng thể trong huyết thanh cũng được xem là sự nhiễm ASFV. Tỷ lệ nhiễm này thấp hơn với kết quả giám sát lưu hành ASFV trên đàn heo ở Nghệ An và cao hơn tại Thừa Thiên-Huế (Võ Thị Hải Lê và Châu Thị Tâm, 2020). Tuy nhiên, số mẫu dương chỉ tập trung tại huyện Cờ Đỏ (33,33%) còn lại 6/7 đơn vị được lấy mẫu không phát hiện được kháng thể kháng ASFV trong huyết

thanh dù đây là các trại từng xảy ra dịch. Kết quả này cho thấy khâu xử lý heo trong ổ dịch ASF năm 2019 được ngành Thú y thành phố Cần Thơ thực hiện chặt chẽ, đồng thời trong quá trình thu mẫu chúng tôi cũng ghi nhận được các chuồng nuôi đã được bỏ trống 4 - 5 tháng sau khi xảy ra dịch ASF và được phun thuốc sát trùng liên tục 2-3 ngày trước khi tái đàn, đây cũng là lý do giúp giảm tỷ lệ dương tính tại các trại từng xảy ra bệnh ASF năm 2019.

Tuy nhiên, kết quả tại bảng 4 cũng ghi nhận tỷ lệ mẫu dương tính ở heo tại các trại chưa xảy ra dịch là 6,80%; tỷ lệ này tương đương với các trại

từng xảy ra dịch (6,67%). Kết quả này cho thấy dù chưa từng xảy ra dịch ASF trước đó nhưng đã có sự xâm nhiễm của ASFV vào đàn heo của trại, sự xâm nhiễm có thể qua heo mới nhập đàn hoặc qua các yếu tố trung gian như thức ăn, phương tiện vận chuyển, người chăn nuôi, công tác truyền giống.... Ngoài ra do kháng thể kháng ASFV có thời gian tồn tại dài trong huyết tương nên cũng có khả năng những heo mới đã mang sẵn kháng thể trước khi nhập đàn. Hiện nay tại nhiều quốc gia, xét nghiệm kháng thể kháng ASFV được thực hiện cùng lúc với xét nghiệm DNA -ASFV trong quá trình giám sát dịch bệnh (Arias *et al.*, 2012) vì xét nghiệm kháng thể ASFV đặc biệt có giá trị để phát hiện các trường hợp heo nhiễm chủng ASFV độc lực thấp không gây bệnh lâm sàng (Oura và

Arias, 2012). Tại Việt Nam dù chưa có báo cáo nào về sự hiện diện của chủng ASFV độc lực thấp, tuy nhiên thực tế các ổ dịch ASF từ đầu năm 2020 đến nay cho thấy bệnh chỉ xảy ra lẻ tẻ tại một số địa phương, cho thấy cần có nhiều nghiên cứu về ASF trong điều kiện thực tế tại Việt Nam để phục vụ cho công tác phòng chống dịch bệnh có hiệu quả hơn.

3.2.2. Sự hiện diện của ASFV trên đàn heo TPCT

Cùng lúc với kiểm tra sự hiện diện của kháng thể ASFV thì các mẫu huyết tương và hạch bạch huyết heo cũng được xét nghiệm sự hiện diện của DNA-ASFV bằng phương pháp realtime-PCR. Kết quả được trình bày qua bảng 5.

Bảng 5. Kết quả xét nghiệm ASFV trên heo TPCT (tháng 3-5/2020)

Đơn vị	Máu ¹ (huyết tương)			Hạch bạch huyết ² (dưới hàm, dạ dày, thận)		
	Số mẫu XN	Mẫu dương	Tỷ lệ (%)	Số mẫu XN	Mẫu dương	Tỷ lệ (%)
Ninh Kiều- Bình Thủy	61	0	0	10	0	0
Cái Răng	10	0	0	2	0	0
Phong Điền	38	0	0	12	0	0
Ô Môn	55	0	0	8	0	0
Thốt Nốt	27	0	0	3	0	0
Cờ Đỏ	54	0	0	6	0	0
Thới Lai	34	0	0	5	0	0
Vĩnh Thạnh	60	0	0	6	0	0
Tổng cộng	339	0	0	52	0	0

Ghi chú: ¹ Lấy mẫu trên heo đang nuôi tại các trại, hộ chăn nuôi; ² Lấy mẫu trên heo giết mổ tại lò mổ tập trung (mẫu gộp 5 heo/mẫu)

Kết quả xét nghiệm 339 mẫu huyết tương và 52 mẫu hạch bạch huyết bằng realtime-PCR đều cho kết quả âm tính. Do phương pháp realtime-PCR có thể phát hiện chính xác ASFV ở thời kỳ đầu nhiễm bệnh và bệnh ASF thể mạn, đây là các trường hợp được xem là mức độ nhiễm virus huyết thấp (Gallardo *et al.*, 2015) nên kết quả tại bảng 5 cho thấy rằng đàn heo được thu mẫu không nhiễm ASFV hoặc có thể nhiễm các chủng ASFV độc lực thấp, các chủng này được hệ thống miễn dịch bẩm sinh nhận ra và loại bỏ nhanh chóng khỏi cơ thể (Lacasta *et al.*, 2015). Kết quả xét nghiệm này cũng

phù hợp với kết quả giám sát lưu hành ASFV trên heo Hà Tĩnh vào tháng 7-9/2020 (Võ Thị Hải Lê và Châu Thị Tâm, 2020). Ngoài ra do heo nhà không phải là vật chủ tự nhiên của ASFV nên việc không phát hiện được ASFV trong hạch bạch huyết và máu ở những heo không biểu hiện bệnh lý lâm sàng được thu mẫu trong khảo sát này là phù hợp. Giải thích về khả năng này Oura Cal và cs. (1998) cho rằng ở heo rừng (*Potamochoerus larvatus*) ASFV sao chép nhân bản tại các hạch bạch huyết sau đó đi vào máu, tuy nhiên ở heo rừng (ký chủ tự nhiên của ASFV) thì sự tiêu tế bào chỉ xảy ra ở mức độ

vừa phải, hạch bạch huyết heo rừng không bị phá hủy hoàn toàn vẫn sản sinh được kháng thể bảo vệ, do đó heo rừng vẫn có khả năng sống sót nhưng là ổ chứa virus. Trong khi đó ở loài heo nhà, sự nhân lên của virus trong mô bạch huyết làm tế bào lympho bị phá hủy hoàn toàn, hệ miễn dịch heo bị suy giảm nghiêm trọng dẫn đến heo chết trong 5-7 ngày sau khi nhiễm ASFV.

Tuy nhiên trong thực tế ASFV có thể tồn tại trong heo nhà sống sót sau bệnh hoặc heo bệnh thể mạn, những heo này là nguyên nhân gây dịch tái phát hoặc gây thành ổ dịch mới tại nơi chưa từng xảy ra dịch (Gallardo *et al.*, 2015); do đó trong giám sát dịch tễ những heo dương tính ASFV qua xét nghiệm realtime-PCR cần được loại bỏ nhanh chóng để ngăn ngừa sự lây lan trong đàn (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2015).

IV. KẾT LUẬN

Tỷ lệ lưu hành ASF trên đàn heo TPCT dựa trên kết quả xét nghiệm huyết thanh bằng ab-ELISA là 6,77% (6,67% - 6,80%). Kết quả này cho thấy đàn heo hiện tại đã từng tiếp xúc với ASFV và hình thành kháng thể. Tuy nhiên dựa trên kết quả xét nghiệm huyết tương và hạch bạch huyết heo bằng realtime-PCR thì tỷ lệ hiện diện của DNA-ASFV trong mẫu xét nghiệm là 0%, cho thấy khả năng lây nhiễm và bộc phát thành dịch ASF trên đàn heo TPCT đang ở mức thấp, đây cũng là điều kiện thuận lợi cho việc tái đàn phục hồi sản xuất chăn nuôi khi kết hợp với thực hiện nghiêm các nguyên tắc an toàn sinh học trong chăn nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arias M, Sánchez-Vizcaíno JM, 2012. African swine fever In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. 10th ed. Diseases of Swine. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell; 2012. pp. 396–404.
- Gallardo MC, de la Torre Reoyo A, Fernández-Pinero J, Iglesias I, Muñoz MJ, Arias ML, 2015. African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Manage* 2015. 1 :1–21
- Gallardo MC, Soler A, Delicado V, Nurmoja I, Simon A, Nieto R, Arias M. 2016. *In vivo* experimental studies of genotype II African swine fever virus (ASFV) isolates currently circulating in two Estonian counties. *Proc. 10th Annu Meet EPIZONE*. Madrid, Sept 2016. pp. 81
- Lacasta A, Monteagudo P, Jiménez-Marin A, Accensi F, Ballester M, Argilagué J, Galindo-Cardiel I, Segalés J, Salas ML, Dominguez J, Moreno A, Garrido JJ, Rodríguez F., 2015. Live attenuated African swine fever viruses as ideal tools to dissect the mechanisms involved in viral pathogenesis and immune protection. *Vet Res*. 2015; 46 :135
- Luis G. Giménez-Lirola, Lina Mur, Belen Rivera, Mark Mogler, Yaxuan Sun, Sergio Lizano, Christa Goodell, D.L. Hank Harris, Raymond R. Rowland, Carmina Gallardo, José Manuel Sánchez-Vizcaíno, and Jeff Zimmerman, 2016. Detection of African swine fever virus antibodies in serum and oral fluid specimens using a recombinant protein 30 (p30) dual matrix indirect ELISA. *PLoS One*. 2016; 11(9)
- Oura CAL, PP Powell, E. Anderson and RME Parkhouse, 1998. The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig. *Journal of General Virology*, 1998, 79 , 1439–1443.
- Oura CAL, Arias M, 2012. African swine fever. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, World Organisation for Animal Health. Accessed 26 May 2015.
- Phan Thị Hồng Phúc, Nguyễn Thị Thùy Dương, Trần Xuân Đông, Đặng Thị Thư, 2020. Nghiên cứu tình hình mắc bệnh dịch tả lợn châu Phi tại tỉnh Quảng Ninh. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, tập XXVII. Số 5-2020. Trang 12-19.
- Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Gomez-Villamandos JC, Carrasco L, 2015. An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J Comp Path*. 2015; 152: 9–21.
- Võ Thị Hải Lê, Châu Thị Tâm, 2020. Giám sát sự lưu hành của virus dịch tả lợn châu Phi (ASFV) tại lò mổ trên các địa bàn các tỉnh Nghệ An, Hà Tĩnh, Thừa Thiên- Huế. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, tập XXVII. Số 5-2020. Trang 5-11.

Ngày nhận 8-9-2020

Ngày phản biện 28-9-2020

Ngày đăng 1-1-2021

PHÁT TRIỂN PHƯƠNG PHÁP LAMP KẾT HỢP SỬ DỤNG CHỈ THỊ MÀU KÉP TRONG CHẨN ĐOÁN PHÁT HIỆN VIRUS GÂY TIÊU CHẢY CẤP Ở LỢN

*Mai Thị Ngân¹, Nguyễn Văn Giáp¹,
Cao Thị Bích Phượng¹, Huỳnh Thị Mỹ Lệ¹, Satoshi Sekiguchi²*

TÓM TẮT

Đánh giá kết quả của các phản ứng LAMP trong chẩn đoán virus gây tiêu chảy cấp ở lợn (PEDV) hiện tại là tốn thời gian và làm tăng nguy cơ tạp nhiễm cho các phản ứng tiến hành sau đó. Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đã phát triển phương pháp LAMP kết hợp sử dụng chỉ thị màu kép cho chẩn đoán phát hiện PEDV. Với việc bổ sung thêm chỉ thị màu kép trong thành phần phản ứng LAMP, kết quả của quá trình khuếch đại này có thể quan sát bằng mắt thường. Bằng việc bổ sung thêm cặp mồi vòng lặp, thời gian của phương pháp LAMP trong chẩn đoán PEDV đã được tối ưu hóa ở 63°C trong 40 phút. Kết quả xét nghiệm từ 91 mẫu thực địa cho thấy đây là một phương pháp nhân gen đẳng nhiệt nhanh, đơn giản, có độ nhạy và độ đặc hiệu cao và kết quả của phản ứng có thể dễ dàng đánh giá bằng mắt thường. Do đó, kết quả nghiên cứu của chúng tôi có tính ứng dụng cao trong công tác chẩn đoán nhanh PEDV cũng như các tác nhân gây bệnh khác.

Từ khóa: Phương pháp LAMP, PEDV, chỉ thị màu kép, RT-PCR.

Development of LAMP method incorporating the use of double color indicator in diagnosing and detecting porcine epidemic diarrhea virus

*Mai Thi Ngan, Nguyen Van Giap,
Cao Thi Bích Phượng, Huynh Thi My Le, Satoshi Sekiguchi*

SUMMARY

Current LAMP assays for detecting PEDV are time-consuming and carry contamination risk for the following reactions. In this study, we developed the LAMP method combining a dual-color indicator for the detection of PEDV. With the addition of a dual-color indicator in the LAMP reaction, the results of this amplification process could be observed by the naked eyes. In addition, by adding loop primer pairs, the LAMP assay for the detection of PEDV was optimized in 40 minutes at 63°C. The result of testing 91 field samples showed that this was a method of simple, sensitive, fast isothermal gene multiplication, and the result of reaction could be easily judged by the naked eyes. Therefore, our research results can be highly applicable in the quick PEDV diagnosis as well as other pathogen detection.

Keywords: LAMP assay, PEDV, dual-color indicator, RT-PCR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh tiêu chảy cấp tính trên lợn (Porcine epidemic diarrhea - PED) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm do một loại virus thuộc họ *Coronaviridae* gây ra, với các triệu chứng lâm sàng đặc trưng là nôn mửa, tiêu chảy

và mất nước. Dịch PED xảy ra ở mọi lứa tuổi, tỷ lệ chết cao ở lợn con dưới 7 ngày tuổi (90-100%). Dịch PED xuất hiện lần đầu tiên ở châu Âu vào năm 1971, sau đó bệnh lây lan ra nhiều quốc gia khác ở châu Á như Trung Quốc, Đài Loan, Nhật, Hàn Quốc và Thái Lan (D. Song và cs., 2015).

Tại Việt Nam, dịch PED lần đầu tiên được phát hiện vào năm 2009 (Tien Duy Do và cs., 2011) và từ đó đến nay dịch bệnh thường xuyên

¹. Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

². Khoa Nông nghiệp, Đại học Miyazaki, Nhật Bản