

NGHIÊN CỨU THIẾT LẬP PHẢN ỨNG RT-PCR VÀ ỨNG DỤNG PHÁT HIỆN SỰ CÓ MẶT CỦA VIRUS GÂY BỆNH SỐT BA NGÀY (BEFV) Ở ĐÀN BÒ NUÔI TẠI VIỆT NAM

*Nguyễn Văn Giáp, Đặng Hữu Anh, Huỳnh Thị Mỹ Lệ
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

TÓM TẮT

Bệnh sốt ba ngày ở bò (three-day sickness) là một bệnh truyền nhiễm, lây qua động vật chân đốt hút máu, do Bovine ephemeral fever virus (BEFV) gây ra. Cho tới nay, BEFV đã được phát hiện ở châu Phi, châu Á, Trung Đông, châu Úc; và được nhận định có nguy cơ phát tán đến những khu vực trước đây chưa từng xuất hiện. Đứng trước nguy cơ dịch bệnh mới có thể xâm nhập bất kỳ lúc nào, rất cần thiết có sự chuẩn bị về phương pháp chẩn đoán xét nghiệm. Do đó, nghiên cứu này đã phân tích nhằm chọn được bộ mồi phù hợp dùng trong phản ứng RT-PCR phát hiện BEFV. Kết quả đã xác định được 2/6 bộ mồi dùng phát hiện BEFV phù hợp nhất về trình tự nucleotide (sai khác 0%- 0,7% so với các chủng virus có trình tự công bố ở GenBank); có giới hạn phát hiện từ $4,07 \times 10^2$ đến $8,11 \times 10^2$ bản sao bộ gen BEFV trong mẫu. Với các bộ mồi phù hợp đã được lựa chọn, có 2/152 mẫu huyết thanh bò thu thập tại Việt Nam (mẫu gộp) được xác định dương tính với BEFV.

Từ khóa: Phương pháp phát hiện, RT-PCR, bovine ephemeral fever virus, Việt Nam.

Establishment of RT-PCR method and application for detecting bovine ephemeral fever virus in cattle in Viet Nam

Nguyen Van Giap, Dang Huu Anh, Huynh Thi My Le

SUMMARY

Bovine ephemeral fever (three-day sickness) is an arthropod-borne disease that affects cattle. The etiology is bovine ephemeral fever virus (BEFV). Up to date, BEFV has been known circulating in Africa, Asia, Middle East, Australia; and continues to threaten cattle populations in the previously BEFV-free areas. Facing the risk that a new disease can occur at any time, it is essential to prepare the diagnostic testing methods. Therefore, in this study, bioinformatic and experiment-based analyses in order to choose the most suitable primers used in RT-PCR for BEFV detection were carried out. As a result, 2/6 primer sets for BEFV were determined to be the most suitable in terms of nucleotide sequence match (differ 0% - 0.7%, compared to BEFV strains in GenBank). The detection limit of the two primer sets was from 4.07×10^2 to 8.11×10^2 copies. By using suitable primers, 2/152 pooled samples collected in Viet Nam were detected to be positive with BEFV.

Keywords: Detection method, RT-PCR, bovine ephemeral fever virus, Viet Nam.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh sốt ba ngày ở bò (three-day sickness) là một bệnh truyền lây qua động vật chân đốt hút máu (hematophagous arthropod), do Bovine ephemeral fever virus (BEFV) gây ra. Mặc dù bệnh có tiến triển nhanh (con vật mắc bệnh thường qua khỏi trong vòng 3 ngày) nhưng để

lại những hậu quả khá nặng nề và dai dẳng, thể hiện ở các khía cạnh: (i) tỷ lệ mắc bệnh cao (80-100%) (Walker và Klement, 2015); (ii) giảm ít nhất 50% sản lượng sữa, giảm sức sinh sản ở bò đực do tình dịch bị mất khả năng thụ tinh kéo dài hàng tháng sau khi khỏi triệu chứng (Yeruham và cs., 2003); (iii) giảm sức kéo, giảm tăng trọng, sảy thai giai đoạn cuối, v.v... (Lee, 2019).

BEFV là virus thuộc giống *Ephemerovirus*, họ *Rhabdovirus* có bộ gen là ARN sợi đơn với kích thước 14,9 kb. Bộ gen BEFV mã hóa 5 protein cấu trúc (N, P, M, G và L), 1 glycoprotein phi cấu trúc (GNS) và một số protein phụ ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, β , và γ) (Walker, 2005). Về mặt di truyền, dựa vào trình tự gen mã hóa protein G, BEFV được chia thành 3 nhóm tương ứng với vùng địa lý mà virus lưu hành, đó là nhóm châu Úc (Australia), Trung Đông (Middle East) và Đông Á (East Asia) (Walker, 2005). Trong đó BEFV thuộc nhóm Đông Á tiếp tục tiến hóa thành ít nhất 3 dưới nhóm (Chaisirirat và cs., 2018).

Về phạm vi phân bố, cho tới nay BEFV đã được phát hiện ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới bao gồm châu Phi, châu Á, Trung Đông và châu Úc; nơi các đợt bùng phát dịch bệnh theo mùa, đặc biệt là sau các đợt mưa (Geoghegan và cs., 2014; Lee, 2019). Ở châu Á, BEFV xuất hiện khá sớm từ năm 1953 (Shirakawa và cs., 1994). Cho đến nay, virus đã hiện diện ở một số quốc gia/ vùng lãnh thổ như: Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc, Đài Loan, Thái Lan, v.v... (Zheng và Qiu, 2012; Ting và cs., 2016; Chaisirirat và cs., 2018). Đáng chú ý, đặc điểm phân bố của BEFV biến động theo thời gian thể hiện ở sự xâm nhập và xuất hiện mới những nhóm di truyền (Ting và cs., 2016) và sự tái xuất hiện của virus sau hàng chục năm vắng bóng (Hirashima và cs., 2017). Chính vì vậy, bệnh do BEFV được nhận định tiếp tục là mối đe dọa cho chăn nuôi trâu, bò ở các nước khu vực châu Á (Lee, 2019). Không chỉ có BEFV mà nhiều loại arthropod-borne virus có nguy cơ phát tán đến những khu vực trước đây chưa từng xuất hiện (Yanase và cs., 2020).

Cho tới thời điểm hiện tại, ở Việt Nam chưa có công bố về bệnh sốt ba ngày cũng như sự hiện diện của BEFV. Tuy nhiên, đứng trước nguy cơ dịch bệnh mới có thể xâm nhập bất kỳ lúc nào, mà mình chứng là sự xuất hiện và lan rộng của bệnh viêm da nổi cục ở nước ta vào cuối năm 2020, rất cần thiết có sự chuẩn bị về phương pháp chẩn đoán xét nghiệm để sàng lọc BEFV ở Việt Nam. Để phát hiện BEFV, ngoài các phương pháp như phân lập virus và xét nghiệm huyết thanh, một số kỹ thuật sinh học phân tử đã được phát triển bao gồm RT-PCR, nested RT-PCR, RT-LAMP, realtime RT-PCR, v.v... (Zheng và cs.,

2011; Ting và cs., 2016). Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi xác định đặc điểm về sự phù hợp trình tự, độ nhạy và độ đặc hiệu của một số bộ mồi dùng trong phản ứng RT-PCR được dùng để phát hiện BEFV.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Phân tích *in silico* bằng phần mềm tin sinh học kiểm tra sự phù hợp trình tự giữa cặp mồi với các chủng BEFV công bố ở GenBank
- Xác định nhiệt độ gắn mồi tối ưu của phản ứng RT-PCR tương ứng với mỗi cặp mồi
- Xác định độ nhạy của phản ứng RT-PCR tương ứng với mỗi cặp mồi
- Xác định tính đặc hiệu của các cặp mồi dùng phát hiện BEFV thông qua phân tích trình tự nucleotide của sản phẩm PCR nhân lên bởi mỗi cặp mồi
- Ứng dụng phản ứng RT-PCR tối ưu để phát hiện BEFV ở mẫu thực địa.

2.2. Nguyên liệu

Sợi khuôn tổng hợp nhân tạo (IDT, Mỹ): đoạn ADN gen G (nucleotide 847- 1840) và đoạn ADN gen N (nucleotide 106- 545) của chủng BEFV tham chiếu MH105245.

Mẫu huyết thanh bò: 152 mẫu gộp (từ 582 mẫu huyết thanh đơn), thu thập ở 18 cơ sở chăn nuôi bò tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam.

Kit Patho Gene-spin DNA/RNA extraction (iNtRON, 17154.2)

Kit tổng hợp cDNA (Maxime RT PreMix (iNtRON, 25082)

SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, 12574026)

Sinh phẩm dùng phân tích kết quả phản ứng PCR: UltraPure Agarose (Invitrogen, 16500500); đệm TAE buffer 50X (Công ty TNHH giải pháp y sinh ABT, DD-035, Việt Nam); 100bp DNA ladder (Invitrogen, 15628019).

Các cặp mồi dùng trong nghiên cứu:

Bảng 1. Trình tự mồi phát hiện BEFV dùng trong nghiên cứu

Gen đích	Tên mồi*	Trình tự mồi (5'-3')**	Kích thước (bp)	Nguồn gốc
G	BEF.G693oF	CCAGGTTTCAGAATGCACAC	693	Behar và cs. (2022)
	BEF.G693oR	CTCTCACTATATCAGTTCTG		
	BEF.420iF	GAGCTTGGTGTGAATAC	420	Gao và cs. (2020)
	BEF.420iR	CCAACCTACAACAGCAGATA		
	BEF.G153iF	GAATCATTATGGGATMGGATC	153	Erster và cs. (2017)
	BEF.G153iR	CCTCCTGCTGGTGTCTGTTTC		
	BEF.G201F	TAGTCACMACVTATGCDATYTAC	201	Gao và cs. (2020)
	BEF.G201R	GTTTACTYCCACYTTGATGCT		
N	BEF.N440oF	CCTACATTGAGAGTGCCACA	440	Shin và cs. (2009)
	BEF.N440oR	CTTCCGTGAACAGCAACATC		
	BEF.N328iF	TGAGAGTGCCACAAGGTAAA	328	
	BEF.N328iR	GCAGAGCGACCTAATCTATA		

Ghi chú: * Tên mồi được đặt lại trong nghiên cứu này, cách kết hợp mồi và kích thước sản phẩm PCR tương ứng được trình bày ở hình 1; ** M = A hoặc C, V = không phải T (A, C hoặc G), D = không phải C (A, G hoặc T), Y = C hoặc T

2.3. Phương pháp nghiên cứu

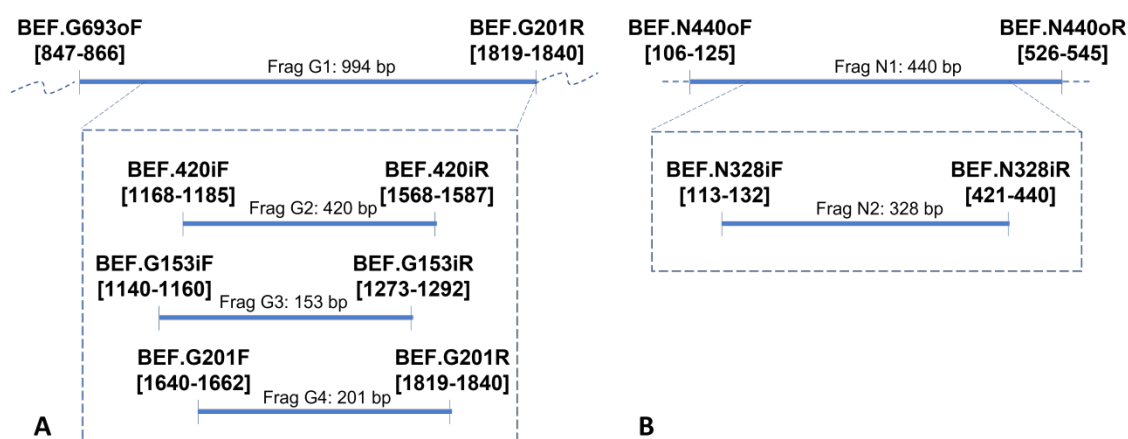
2.3.1. Phân tích in silico sự phù hợp vị trí gắn mồi

Thu thập trình tự gen mã hóa protein G (gen G) và mã hóa protein N (gen N) của BEFV từ GenBank (truy cập tháng 7 năm 2022). Căn chỉnh trình tự (alignment) nucleotide riêng rẽ cho gen G và gen N dưới dạng bộ ba mã hóa bằng phần mềm

COBALT và PAL2NAL. Phần mềm MAFFT dùng so sánh bắt cặp từng mồi với các trình tự gen G hoặc N đã được căn chỉnh trình tự phía trên.

2.3.2. Phân tích trình tự nucleotide của sản phẩm RT-PCR

Sơ đồ các cặp mồi phát hiện gen G và gen N của BEFV được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ các cặp mồi phát hiện BEFV dùng trong nghiên cứu

Vị trí nucleotide [] của mồi phát hiện gen G (A) và gen N (B) được xác định theo trình tự chủng BEFV tham chiếu MH105245. Kích thước của sản phẩm RT-PCR (Frag G1-G4 của gen G, Frag N1-N2 của gen N) không được vẽ theo tỷ lệ.

Để kiểm tra tính đặc hiệu của các cặp mồi (chỉ nhân lên gen của BEFV), sản phẩm RT-PCR gen G (Frag G1- G4) và gen N (Frag N1- N2) (hình 1A- 1B) được giải trình tự 2 chiều bằng phương pháp Sanger's (1st BASE, Malaysia). Phân tích trình tự nucleotide bằng phần mềm BioEdit và công cụ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.3.3. Tối ưu nhiệt độ gắn mồi của phản ứng RT- PCR

Nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho mỗi cặp mồi (sơ đồ kết hợp ở hình 1) được xác định bằng gradient PCR. Cố định nhiệt độ các bước biến tính và kéo dài, trong khi thiết lập nhiệt độ bước gắn mồi dao động trong khoảng 50°C- 60°C (máy PCR Agilent SureCycler 8800). Nhiệt độ gắn mồi tối ưu được xác định là nhiệt độ mà ở đó sản phẩm PCR thu được không có vạch phụ và với đậm độ cao nhất.

2.3.4. Xác định độ nhạy của cặp mồi của phản ứng RT- PCR

Quy đổi nồng độ ADN sợi khuôn từ đơn vị ng/μl sang số lượng bản sao/μl bằng công cụ DNA copy number calculator (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>). Sợi khuôn ADN gen G (kích thước 994 bp) có nồng độ 43,7 ng/μl tương ứng với số lượng bản sao là $4,07 \times 10^{10}$. Sợi khuôn ADN gen N (kích thước 440 bp) có nồng độ 38,5 ng/μl tương ứng với số lượng bản sao là $8,11 \times 10^{10}$.

Sợi khuôn ADN đã biết trước số lượng bản sao được pha loãng trong đệm TE (pH 8,0) theo cơ số 10 để tạo thành dãy nồng độ tương ứng từ 10^{-1} đến 10^{-9} . Thực hiện phản ứng PCR với mỗi cặp mồi ở điều kiện nhiệt độ gắn mồi tối ưu và đảm bảo tính đồng đều về thành phần và điều kiện phản ứng, ngoại trừ nồng độ sợi khuôn thay đổi. Độ nhạy của cặp mồi dùng trong phản ứng được xác định là độ pha loãng sợi khuôn cao nhất vẫn cho sản phẩm PCR đặc hiệu.

2.3.5. RT-PCR phát hiện BEFV ở mẫu bệnh phẩm

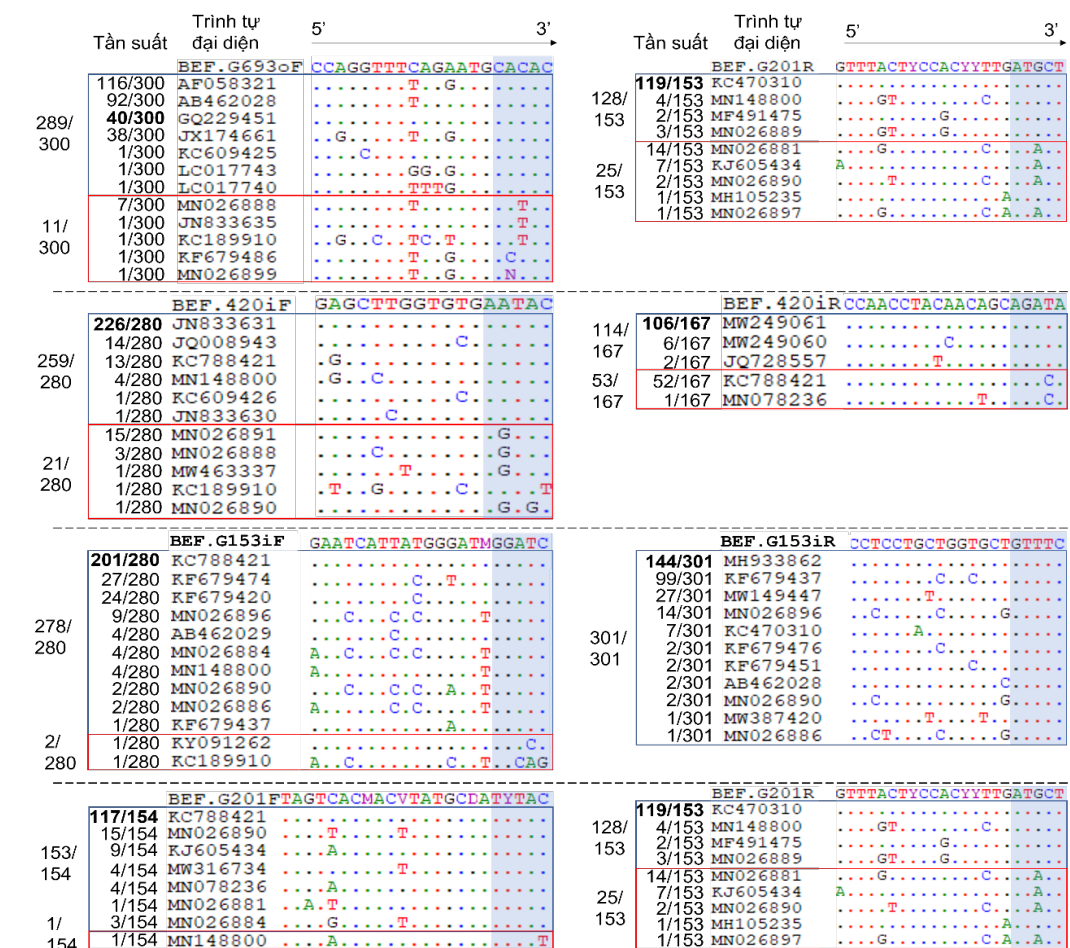
ARN/ADN tổng số của mẫu huyết thanh được tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất (kit Patho Gene-spin DNA/RNA extraction). Chuyển ARN thành cDNA bằng kit Maxime RT PreMix với thành phần và chương trình nhiệt theo hướng dẫn. Phản ứng PCR được thực hiện bằng kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase với thành phần và thể tích phản ứng theo khuyến cáo. Chu trình nhiệt của phản ứng được thiết lập như sau: 94°C/ 2 phút, 45 chu kỳ (94°C/ 15 giây, nhiệt độ gắn mồi tối ưu/ 30 giây, 68°C/ 60 giây). Sản phẩm PCR được điện di bằng gel agarose 2% trong dung dịch 0,5X TAE ở 100V trong 20 phút. Đọc kết quả điện di bằng bộ chụp hình GelPic100 (Công ty PHUSA Biochem, Việt Nam).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân tích *in silico* sự phù hợp trình tự mồi và sợi khuôn

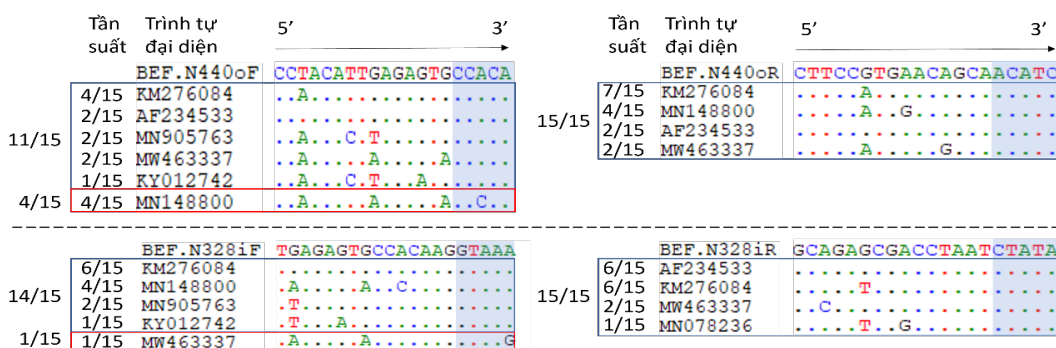
Cho đến nay, có nhiều bộ mồi phát hiện BEFV đã được sử dụng (bảng 1). Theo hiểu biết của nhóm tác giả, hiện chưa có thông tin so sánh sự phù hợp giữa trình tự mồi với trình tự gen của các chủng BEFV công bố ở GenBank. Hơn nữa, việc phân tích nhằm tìm được cặp mồi có trình tự nucleotide phù hợp với phần lớn các chủng BEFV có ý nghĩa quan trọng (góp phần giảm thiểu kết quả âm tính giả), nhất là khi sàng lọc virus ở các quốc gia mà BEFV chưa từng xuất hiện. Kết quả phân tích được trình bày ở hình 2 và 3.

Hình 2, 3 cho thấy có sự sai khác giữa trình tự mồi và trình tự gen G của các chủng BEFV công bố ở GenBank. Đáng chú ý là những sai khác trong phạm vi 5 nucleotide phía đầu 3' (trình tự đóng khung màu đỏ, hình 2 và 3). Sai khác ở những vị trí này ảnh hưởng lớn tới độ bền liên kết giữa mồi- sợi khuôn, làm giảm hiệu suất, thậm chí làm mất hoàn toàn phản ứng tổng hợp sợi ADN bổ sung (Stadhouders và cs., 2010). Vì vậy, có thể dẫn tới kết quả âm tính giả. Bảng 2 tổng hợp tỷ lệ sai khác trình tự nucleotide ở phía 3' của mỗi mồi so với các chủng BEFV.



Hình 2. Sự phù hợp trình tự môi- sợi khuôn của các cặp môi phát hiện gen G

5 nucleotide đầu tiên ở đầu 3' của mỗi môi được đánh dấu màu xám. Dấu "." biểu thị vị trí có nucleotide giống với môi. Phía trước mỗi trình tự BEFV đại diện (ký hiệu bởi mã số GenBank) là tần suất của trình tự trên tổng số các trình tự được so sánh. Do trình tự gen G công bố trên GenBank không hoàn toàn là trình tự hoàn chỉnh (bị khuyết thiếu ở đầu 5' hoặc 3', với vị trí nucleotide khuyết thiếu khác nhau) nên tổng số trình tự gen so sánh với mỗi môi là không giống nhau.



Hình 3. Sự phù hợp trình tự môi- sợi khuôn của các cặp môi phát hiện gen N

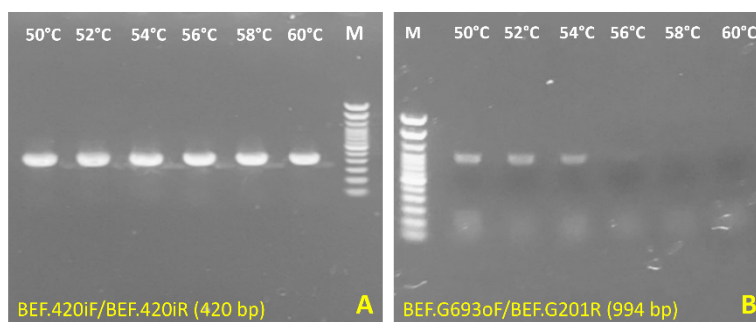
Bảng 2. Tỷ lệ các chủng BEFV có trình tự sai khác so với môi

Gen đích	Tên môi	Tần suất (tỷ lệ) sai khác ở đầu 3'
G	BEF.G693oF	11/300 (3,7%)
	BEF.420iF	21/280 (7,5%)
	BEF.420iR	53/167 (31,7%)
	BEF.G153iF	2/280 (0,7%)
	BEF.G153iR	0/301 (0%)
	BEF.G201F	1/154 (0,6%)
	BEF.G201R	25/153 (16,3%)
N	BEF.N440oF	4/15 (26,7%)
	BEF.N440oR	1/15 (6,7%)
	BEF.N328iF	0/15 (0%)
	BEF.N328iR	0/15 (0%)

Các kết quả phân tích nêu trên cho thấy cả môi phát hiện gen G và gen N đều có tỷ lệ sai khác so với các chủng BEFV được công bố, dao động từ 0,6% đến 31,7% (môi phát hiện gen G) và từ 6,7% - 26,7% (môi phát hiện gen N). Trong số này, môi BEF.G153iF/ BEF.G153iR và môi BEF.N328iF/ BEF.N328iR được xác định không có/ hoặc có sai khác rất thấp (< 1%) so với trình tự gen các chủng BEFV công bố ở GenBank. Kết quả trên cho thấy sự cần thiết sử dụng một số cặp môi trong sàng lọc BEFV.

3.2. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn môi

Hình 4 tóm tắt kết quả tối ưu nhiệt độ gắn môi dùng trong nghiên cứu.

**Hình 4. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn môi**

Có 4/6 cặp môi (đại diện ở hình 4A) không có sự thay đổi rõ về đậm độ sản phẩm PCR khi nhiệt độ gắn môi biến thiên trong khoảng 50°C tới 60°C. Trong nghiên cứu của Erster và cs. (2017), nhiệt độ bắt môi đối với cặp BEF.G153iF/BEF.G153iR là 60°C, với cặp môi BEF.N440Fo/BEF.N440Ro và BEF.N328iF/BEF.N328iR là 58°C (Shin và cs., 2009). Ngược lại, có 2/6 cặp môi (đại diện ở hình 4B) có độ sáng từ đậm đến mờ dần tương ứng với sự tăng dần của nhiệt độ gắn môi. Hai cặp môi BEF.G693oF/BEF.G201R và BEF.G201F/BEF.G201R được xác định có nhiệt độ gắn môi tối ưu là 50°C. Tuy nhiên trong nghiên cứu trước đây, cặp môi BEF.G201F/BEF.G201R được dùng ở nhiệt độ gắn môi là 60°C (Gao và cs., 2020). Kết quả đó ngược với kết quả nghiên cứu này, ở đó nhiệt độ

60°C không cho ra kết quả dương tính (không trình bày). Hiện có một số kit PCR với buffer đặc biệt (kit Platinum-dna-polymerase, Thermo Scientific) cho phép thiết lập nhiệt độ gắn môi 60°C với nhiều cặp môi. Sử dụng kit PCR khác nhau có thể là lý do dẫn tới sự sai khác nhiệt độ gắn môi giữa các nghiên cứu. Ở khía cạnh khác, kết quả cho thấy sự cần thiết khảo sát lại các điều kiện tối ưu của các cặp môi trước khi sàng lọc BEFV.

3.3. Kết quả xác định độ nhạy của cặp môi dùng trong phản ứng

Với độ pha loãng tăng dần từ 10^{-1} đến 10^{-9} , đậm độ sản phẩm phản ứng RT-PCR giảm dần. Giới hạn phát hiện của mỗi cặp môi được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Giới hạn phát hiện 6 cặp mồi dùng trong nghiên cứu

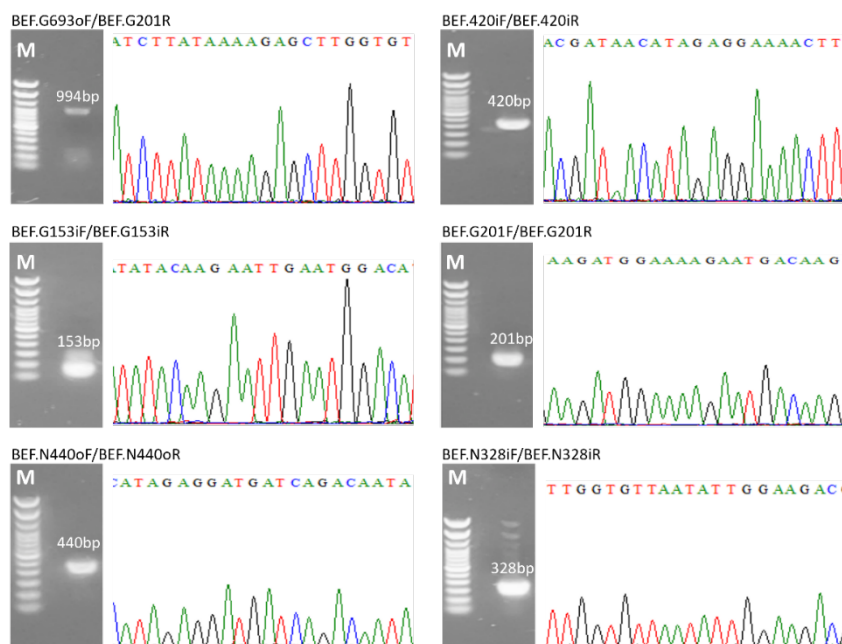
TT	Cặp mồi	Độ pha loãng*	Số bản sao/ μ l
1	BEF.G693oF/BEF.G201R	10^{-3}	$4,07 \times 10^7$
2	BEF.420iF/BEF.420iR	10^{-6}	$4,07 \times 10^4$
3	BEF.G153iF/BEF.G153iR	10^{-8}	$4,07 \times 10^2$
4	BEF.G201F/BEF.G201R	10^{-6}	$4,07 \times 10^4$
5	BEF.N440oF/BEF.N440oR	10^{-4}	$8,11 \times 10^6$
6	BEF.N328iF/BEF.N328iR	10^{-8}	$8,11 \times 10^2$

Ghi chú: * độ pha loãng sợi khuôn cao nhất vẫn cho kết quả dương tính

Kết quả ở bảng 3 cho thấy giới hạn phát hiện BEFV là khác nhau giữa các cặp mồi, trong đó cặp BEF.G153iF/BEF.G153iR (phát hiện gen G) và BEF.N328iF/BEF.N328iR (phát hiện gen N) có độ nhạy cao nhất so với các cặp mồi khác. Ngưỡng phát hiện của 2 cặp mồi kể trên là tương đương so với các nghiên cứu khác khi có khả năng phát hiện khoảng 10^3 bản sao bộ gen của BEFV (Gao và cs., 2020).

3.4. Kết quả xác định tính đặc hiệu của các cặp mồi

Các cặp mồi phát hiện BEFV trong nghiên cứu này thừa hưởng từ các công bố trên thế giới. Trong khuôn khổ của nghiên cứu này, tính đặc hiệu của các cặp mồi được kiểm chứng lại thông qua giải trình tự và phân tích trình tự nucleotide của sản phẩm. Kết quả thu được ở hình 5.

**Hình 5. Giải đồ giải trình tự sản phẩm PCR của 6 cặp mồi**

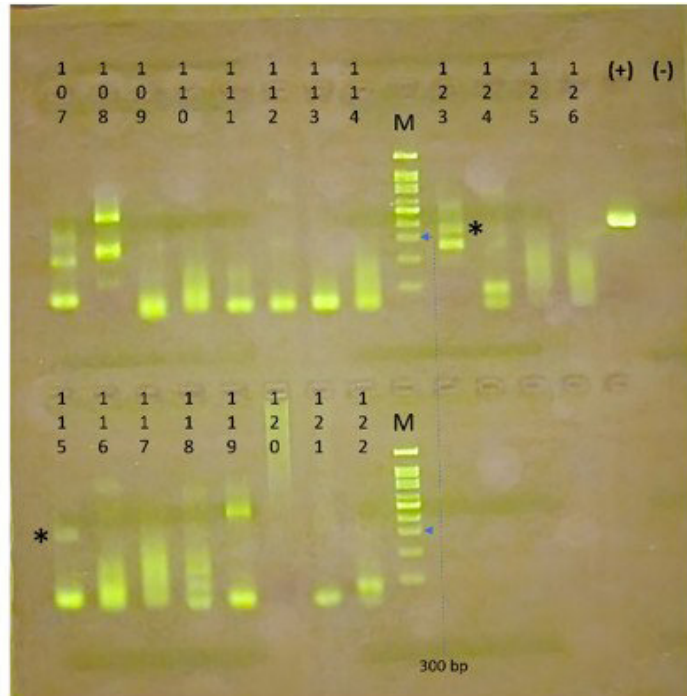
Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR cho các tín hiệu rõ ràng (hình 5). Tìm kiếm trình tự tương đồng bằng công cụ BLAST cho thấy 6/6 trình tự nucleotide của sản phẩm PCR đều là BEFV và có

mức tương đồng so với các chủng có trình tự công bố ở GenBank là 90,7% đến 99,1% (gen G) và 92,3% đến 99,31% (gen N). Như vậy, các cặp mồi được khảo sát trong nghiên cứu này là đặc hiệu.

3.5. Kết quả sàng lọc BEFV ở mẫu huyết thanh

Trên cơ sở phân tích sự phù hợp trình tự mỗi (bảng 2) và độ nhạy (bảng 3), nghiên cứu này

sử dụng cặp mồi BEF.N328iF/BEF.N328iR để sàng lọc 152 mẫu gộp. Kết quả được minh họa ở hình 6.



Hình 6. Kết quả RT-PCR phát hiện BEFV ở mẫu huyết thanh

Kết quả xét nghiệm đối với mẫu 107-126, (+) đối chứng dương có kích thước sản phẩm khoảng 328 bp, (-) đối chứng âm, * đánh dấu vạch sản phẩm có kích thước khoảng 328 bp.

Từ 152 mẫu gộp được sàng lọc, đã phát hiện 2 mẫu là 115, 123 (dấu *, hình 6) có vạch sản phẩm với kích thước khoảng 328 bp giống đối chứng. Với kết quả như vậy, hai mẫu này được kết luận dương tính.

IV. KẾT LUẬN

Đã phân tích và xác định được 2/6 bộ mồi dùng phát hiện BEFV có sự phù hợp nhất về trình tự nucleotide (sai khác 0%- 0,7% so với các chủng virus có trình tự công bố ở GenBank), có giới hạn phát hiện từ $4,07 \times 10^2$ đến $8,11 \times 10^2$ bản sao bộ gen virus. Sử dụng cặp mồi đặc hiệu gen N (BEF.N328iF/BEF.N328iR) đã phát hiện 2/152 mẫu dương tính BEFV. Đây là nghiên cứu bước đầu về BEFV ở đàn bò nuôi tại Việt Nam, tuy nhiên cần có các nghiên cứu tiếp theo

để khẳng định sự lưu hành của BEFV và tính gây bệnh của virus.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Behar A., Friedgut, O., Rotenberg, D., Zalesky, O., Izhaki, O., Yulzary, A., Rot, A., Wolkomirsky, R., Zamir, L., Hmd, F. và Brenner, J., 2022. Insights on transmission, spread, and possible endemization of selected arboviruses in Israel-interim results from five-year surveillance. *Vet Sci*, 9(2).
2. Chaisirirat T., Sangthong, P., Arunvipas, P., Petcharat, N., Thangthamniyom, N., Chumsing, W. và Lekcharoensuk, P., 2018. Molecular characterization of bovine ephemeral fever virus in Thailand between 2013 and 2017. *Vet Microbiol*, 227: 1-7.

3. Erster O., Stram, R., Menasherow, S., Rubinstein-Giuni, M., Sharir, B., Kchinich, E. và Stram, Y., 2017. High-resolution melting (HRM) for genotyping bovine ephemeral fever virus (BEFV). *Virus Res*, 229: 1-8.
4. Gao S., Du, J., Tian, Z., Niu, Q., Huang, D., Wang, J., Luo, J., Liu, G. và Yin, H., 2020. A SYBR green I-based quantitative RT-PCR assay for bovine ephemeral fever virus and its utility for evaluating viral kinetics in cattle. *J Vet Diagn Invest*, 32(1): 44-50.
5. Geoghegan J. L., Walker, P. J., Duchemin, J.-B., Jeanne, I. và Holmes, E. C. J. P. N. T. D., 2014. Seasonal drivers of the epidemiology of arthropod-borne viruses in Australia. *PLoS Negl Trop Dis* 8(11): e3325.
6. Hirashima Y., Nojiri, M., Ohtsuka, Y., Kato, T., Shirafuji, H., Kurazono, M., Imafuji, T. và Yanase, T., 2017. Resurgence of bovine ephemeral fever in mainland Japan in 2015 after a 23-year absence. *J Vet Med Sci*, 79(5): 904-911.
7. Lee F., 2019. Bovine ephemeral fever in Asia: recent status and research gaps. *Viruses*, 11(5): 412.
8. Shin Y. K., Oem, J. K., Yoon, S., Hyun, B. H., Cho, I. S., Yoon, S. S. và Song, J. Y., 2009. Monitoring of five bovine arboviral diseases transmitted by arthropod vectors in Korea. *Journal of Bacteriology and Virology*, 39(4): 353-362.
9. Shirakawa H., Ishibashi, K. và Ogawa, T., 1994. A comparison of the epidemiology of bovine ephemeral fever in South Korea and south-western Japan. *Aust Vet J*, 71(2): 50-2.
10. Stadhouders R., Pas, S. D., Anber, J., Voermans, J., Mes, T. H. và Schutten, M., 2010. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J Mol Diagn*, 12(1): 109-17.
11. Ting L. J., Lee, M. S., Lin, Y. L., Cheng, M. C. và Lee, F., 2016. Invasion of exotic bovine ephemeral fever virus into Taiwan in 2013-2014. *Vet Microbiol*, 182: 15-7.
12. Walker P. J., 2005. Bovine ephemeral fever in Australia and the world. *Curr Top Microbiol Immunol*, 292: 57-80.
13. Walker P. J. và Klement, E., 2015. Epidemiology and control of bovine ephemeral fever. *Vet Res*, 46(1): 124.
14. Yanase T., Murota, K. và Hayama, Y., 2020. Endemic and emerging arboviruses in domestic ruminants in East Asia. *Front Vet Sci*, 7: 168.
15. Yeruham I., Sharir, B., Yadin, H., Tiomkin, D. và Chai, D., 2003. Bovine ephemeral fever in beef cattle herds in the Jordan Valley, Israel. *Vet Rec*, 152(3): 86-8.
16. Zheng F., Lin, G., Zhou, J., Wang, G., Cao, X., Gong, X. và Qiu, C., 2011. A reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification assay for detection of bovine ephemeral fever virus in the blood of infected cattle. *J Virol Methods*, 171(1): 306-9.
17. Zheng F. và Qiu, C., 2012. Phylogenetic relationships of the glycoprotein gene of bovine ephemeral fever virus isolated from mainland China, Taiwan, Japan, Turkey, Israel and Australia. *Virol J*, 9(1): 268.

Ngày nhận 20-9-2022

Ngày phản biện 2-10-2022

Ngày đăng 1-11-2022