

GHI NHẬN MỚI TRONG CHẨN ĐOÁN BỆNH DỊCH TẢ HEO CHÂU PHI TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Ngọc Hải^{*}, Nguyễn Thị Phương Bình²,
Trần Hoàng Anh Thu² và Nguyễn Trung Quân²

Tóm tắt

Bệnh Dịch tả heo châu Phi (DTHCP) xuất hiện ở Việt Nam từ tháng 02/2019 và đã gây nên thiệt hại kinh tế rất lớn do việc tiêu hủy một số lượng lớn heo ở các ổ dịch. Bệnh vẫn liên tục xuất hiện trên đàn heo trong thời gian gần đây với những biểu hiện về lâm sàng không giống như giai đoạn trước đây: heo bệnh không sốt cao, da không xuất huyết, lách không sưng to sậm màu... Nái bị sảy thai, chết thai, thai khô hàng loạt. Các xét nghiệm PRRS, Dịch tả heo cổ điển, Parvovirus và Aujeszky đều cho kết quả âm tính, đồng thời xét nghiệm vi-rút DTHCP bằng realtime PCR cũng cho kết quả âm tính. Tuy nhiên, nghiên cứu đã ghi nhận kết quả dương tính với vi-rút DTHCP bằng kỹ thuật PCR thông thường trên các loại mẫu thu nhận từ những heo có các biểu hiện bất thường nói trên. Kết quả nghiên cứu cho thấy vi-rút DTHCP ở Việt Nam đang lưu hành ở một dạng khác, đặt ra yêu cầu mới trong chẩn đoán bệnh DTHCP cho người chăn nuôi heo, cũng như các phòng xét nghiệm.

Từ khóa: Bệnh DTHCP, PCR thông thường, rối loạn sinh sản.

NEW RECORD IN DIAGNOSIS OF AFRICAN SWINE DISEASE IN VIETNAM

Abstract

African Swine Fever (ASF) has appeared in Vietnam since February 2019 and has caused huge economic losses due to the stamping out of a large number of pigs in outbreaks. The disease has continuously appeared in the swine recently with clinical changes unlike the previous period: infected pigs do not have high fever, hemorrhagic on the skin; the spleen is not swollen and dark ... The sows have reproductive problems with abortion, fetal death, mummy all of the litter. RT-PCR tests for PRRS, classical swine fever, or PCR tests for Parvovirus and Aujeszky were all negative, moreover ASFV test by realtime PCR was negative, too. However, the study recorded positive results for ASF virus by conventional PCR on all types of samples from pigs with the aforementioned abnormalities. Research results show that ASFV in Vietnam is circulating under a other form of the disease and posing the new question in diagnosis of ASF for pig farmers, as well as laboratories.

Keywords: African Swine Fever disease, conventional PCR, reproductive problem.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dịch tả heo châu Phi (DTHCP) là bệnh truyền nhiễm rất nguy hiểm trên heo do virus thuộc họ Asfarviridae, giống Asfivirus gây ra. Ở Việt Nam, 3 ổ dịch đầu tiên của bệnh DTHCP trên đàn heo nuôi ở Hưng Yên và Thái Bình đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn thông báo chính thức vào ngày

20/2/2019 và chỉ trong thời gian ngắn, bệnh đã xuất hiện trên toàn bộ 63 tỉnh thành của Việt Nam.

Ở giai đoạn trước, từ ổ dịch DTHCP đầu tiên xuất hiện tại Việt Nam đến khi bệnh lan rộng khắp cả nước, các dấu hiệu lâm sàng của bệnh được ghi nhận đều ở thể quá cấp

¹ Bộ môn Bệnh truyền nhiễm và Thú y Cộng đồng, Khoa Chăn nuôi - Thú y, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM;

² Phòng Chẩn đoán - Xét nghiệm Thú Y Hàn Việt, Khoa Chăn nuôi - Thú y, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM;

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Ngọc Hải; Email: nguyenngochai@hcmuaf.edu.vn; ĐT: 090884076

hoặc cấp, với biểu hiện heo bệnh sốt cao, bỏ ăn, xuất huyết da (tai, đầu chi, bụng, mông), xuất huyết nội tạng (phôi, thận, ruột, tim, hạch...), đặc biệt lách sưng rất to và sậm màu. Heo bệnh chết rất nhanh trong vòng 3 - 5 ngày. Việc chẩn đoán bệnh DTHCP tại các ổ dịch để làm cơ sở cho công tác kiểm soát dịch dựa vào các dấu hiệu lâm sàng nói trên và xét nghiệm khẳng định sự hiện diện ADN của vi-rút DTHCP bằng kỹ thuật realtime PCR. Chẩn đoán xác định ADN của vi-rút với các mẫu máu kháng đông, hay lách, các hạch bạch huyết, hạch amidan của heo đang sốt trong giai đoạn đầu được thực hiện bằng kỹ thuật realtime PCR (Bộ NN&PTNT, 2053/TY - DT, 2018).

Tuy nhiên, giai đoạn gần đây, tại một số trại có tiền sử DTHCP, xuất hiện nhiều trường hợp nái có những biểu hiện rối loạn sinh sản tương tự như bệnh PRRS, bệnh Giả dại, Dịch tả heo cổ điển hay do Parvovirus,... bao gồm khô thai cả ổ, sảy thai mọi giai đoạn, chết heo sơ sinh cả ổ, heo con sơ sinh có biểu hiện thần kinh,... và chết toàn ổ. Heo cai sữa, heo choai bị bệnh cũng chết nhanh nhưng không có biểu hiện sốt quá cao (41 - 42°C), không xuất huyết da, xuất huyết nội tạng, đặc biệt không có bệnh tích lách sưng to, sậm đen. Các xét nghiệm PRRS, bệnh Giả dại, Dịch tả heo cổ điển hay do Parvovirus,... đều cho kết quả âm tính. Quan trọng hơn, xét nghiệm realtime PCR xác định vi-rút DTHCP trong các trường hợp này cũng cho kết quả âm tính. Đã có những công bố về kết quả âm tính giả của xét nghiệm vi-rút DTHCP bằng kỹ thuật realtime PCR theo quy trình OIE tại Việt Nam (Truong và cs., 2020; Ha Thi Thanh Tran và cs., 2020).

Dựa trên các dữ liệu đã được công bố và thực tế dịch tễ, lâm sàng bệnh DTHCP, nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật PCR thông thường để chẩn đoán phát hiện sự hiện diện của vi-rút DTHCP trong các mẫu mô bệnh phẩm từ heo bệnh, từ đó giúp hiểu rõ hơn đặc điểm của vi-rút DTHCP trên đàn heo trong giai đoạn mới, góp phần hiệu quả hơn trong kiểm soát sự lưu nhiễm và truyền lây vi-rút DTHCP trên đàn heo nuôi tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vật liệu, hóa chất dùng cho phản ứng PCR: GeneJET Viral DNA/ ARN Purification Kit (Thermo, Mỹ), GoTaq G2 Green Master Mix (Promega, Mỹ), Tinh sạch ADN từ gel sau khi điện di bằng bộ kit GenJET Gel Extraction and DNA Micro Kit (Thermo, Mỹ), kit GenJET.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Xét nghiệm vi-rút DTHCP bằng PCR thông thường: Tổng cộng 15 mẫu gồm 5 mẫu thai heo sảy, thai heo lưu ở các giai đoạn mang thai; 5 heo sơ sinh có biểu hiện run rẩy, co giật toàn ổ và 5 heo cai sữa, choai bệnh không rõ nguyên nhân. Tất cả các trại được lấy mẫu đều có tiền sử bệnh DTHCP. Heo nái không có biểu hiện sốt, bỏ ăn trước và sau khi sảy thai, đẻ.

Tất cả các mẫu máu, thai sảy, heo sơ sinh có biểu hiện thần kinh, heo cai sữa, heo choai đều được xét nghiệm âm tính với virus PRRS, Dịch tả heo cổ điển, Parvovirus, Aujeszky và PCV2 bằng kỹ thuật RT-PCR hoặc PCR tùy loại vi-rút trước khi xét nghiệm PCR và realtime PCR xác định vi-rút DTHCP.

Xét nghiệm PCR thông thường và realtime PCR xác định vi-rút DTHCP được thực hiện song song trên 5 mẫu.

Loại mẫu sử dụng cho xét nghiệm PCR và realtime PCR xác định vi-rút DTHCP:

- Thai sảy, thai heo lưu, heo sơ sinh có biểu hiện run rẩy, co giật: mẫu não, gan, tim, lách, hạch.

- Heo cai sữa, heo choai: mẫu máu, mẫu lách, hạch.

Mẫu các cơ quan khác mẫu não được gộp lại thành 1 mẫu/ heo, gọi chung là mẫu nội quan (gan, tim, lách, hạch).

PCR xét nghiệm vi-rút DTHCP sử dụng cặp mồi PPA1, 5-AGTTATGGGAAACCCGACCC-3 và PPA2, 5-CC CTGAATCGGAGCATCCT-3, nhân bản đoạn ADN kích thước 257 bp, trên

gien VP73 (p72) (Augero và cs., 2003) theo quy trình khuyến cáo của OIE, 2019. Phản ứng PCR được thực hiện tại Phòng Chẩn đoán xét nghiệm Thú y Hàn Việt, Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh. Kỹ thuật realtime PCR theo quy trình của OIE được thực hiện tại 2 phòng xét nghiệm khác (trong đó có 1 phòng xét nghiệm được chỉ định của Cục thú y trong xét nghiệm vi-rút DTHCP).

Sản phẩm PCR thông thường của 5 mẫu được gửi đi giải trình tự nucleotide tại Công ty Nam Khoa, TP. Hồ Chí Minh. Trình tự nucleotide sản phẩm PCR được xử lý bằng phần mềm Sequencher 5.4.6 (Genecodes) và so sánh trình tự nucleotide với các trình tự ASFV tham khảo bằng phần mềm BioEdit 7.2.6 để xác nhận đúng trình tự của vi-rút DTHCP. Trình tự nucleotide của 5 chủng vi-rút DTHCP trong nghiên cứu đã được đăng ký trên ngân hàng gien với các mã số MW648548, MW648549, MW648550, MW648551, MW648552.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hiện tượng thai khô, thai chết lưu, chết tươi toàn ổ, sảy thai ở các giai đoạn mang thai khác nhau, phối nhiều lần không đậu,... ở nái, gia tăng mức độ đáng báo động tại nhiều trại chăn nuôi heo ở Việt Nam, nhưng nái đều không có biểu hiện lâm sàng đặc biệt nào (không ghi nhận sốt cao, không bỏ ăn...). Khi xét nghiệm xác định các tác nhân phổ biến liên quan đến rối loạn sinh sản ở nái (PRRSV, vi-rút Dịch tả heo cổ điển, vi-rút Aujeszky...) đều cho kết quả âm tính. Trong nghiên cứu này, 5 mẫu thai sảy, thai lưu, thai chết tươi đều được lấy từ những nái có vẻ ngoài bình thường và không có biểu hiện lâm sàng đặc biệt nào trong thời gian khảo sát. Kết quả PCR cho thấy tất cả đều dương tính với vi-rút DTHCP. Một trong những bệnh lý quan trọng do vi-rút DTHCP đó là gây sảy thai ở các giai đoạn tuổi thai khác nhau ở nái nhiễm vi-rút mạn tính (Beltrán-Alcrudo và cs., 2017; Schlafer DH và cs., 1987), tuy nhiên tình trạng thai chết lưu, chết tươi toàn ổ là dấu hiệu lâm sàng bất thường chưa được cập nhật trong mô tả chẩn đoán bệnh DTHCP tại

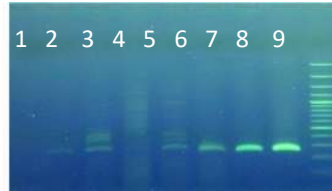
Việt Nam, cũng như trên thế giới. Do vậy, sẽ là một thách thức quan trọng trong chẩn đoán phát hiện bệnh DTHCP trên đàn nái tại các trại heo.

Trên heo sau cai sữa, heo choai, quan sát lâm sàng bên ngoài của những heo trong nghiên cứu đều không ghi nhận tình trạng xuất huyết da, nhưng có tình trạng viêm khớp. Biểu hiện lâm sàng gần với mô tả trong chẩn đoán bệnh DTHCP thể mãn (Bộ NN&PTNT, 2053/ TY – DT, 2018). Tuy nhiên, bệnh tích mổ khám hoàn toàn không ghi nhận tình trạng xuất huyết nghiêm trọng ở các nội quan như trong các mô tả chẩn đoán trước đây. Trong các cơ quan nội tạng, chỉ ghi nhận bệnh tích xuất huyết điểm ở mức độ nhẹ trên võ thận. Đặc biệt, lách ở tất cả các heo mổ khám đều có kích thước, màu sắc bình thường, không xuất huyết, khác biệt hoàn toàn với bệnh tích lách sưng to, sậm đen được mô tả trong chẩn đoán heo bệnh DTHCP. Heo bệnh DTHCP giai đoạn hiện nay có thể biểu hiện lâm sàng mới tương đồng với thể mãn của bệnh DTHCP, nhưng không có bệnh tích lách sưng to, sậm đen như nhiều người chăn nuôi vẫn nghĩ. Đây là điều quan trọng cần ghi nhận trong chẩn đoán phát hiện heo nghi bệnh DTHCP trên heo sau cai sữa, heo choai.

Biểu hiện lâm sàng liên quan đến bệnh DTHCP mới nhất được chẩn đoán trong nghiên cứu đó là heo sơ sinh có biểu hiện run rẩy, co giật toàn ổ và chết trong vòng 1 - 2 ngày sau sinh. Tình trạng này được ghi nhận ở nhiều trại heo có tiền sử bệnh DTHCP, và đã chẩn đoán nhầm sang các bệnh khác, chủ yếu là Giả dại (Aujeszky) và bệnh do liên cầu khuẩn gây nên. Điều lưu ý là heo bị run toàn ổ, không sốt và chết nhanh sau 1 - 2 ngày. Heo bệnh không có dấu hiệu xuất huyết da cũng như nội tạng. Bệnh tích đặc biệt nhất ở những heo này đó là tình trạng não úng thủy (hydrocephalus). Mổ khám não heo bệnh, nghiên cứu đã ghi nhận tình trạng mô não hoá thành nước. Bệnh tích não úng thủy cũng được ghi nhận ở thai chết lưu. Xét nghiệm mẫu dịch não bằng kỹ thuật PCR thông thường đã ghi nhận kết quả dương tính với vi-rút DTHCP.

Như vậy, rõ ràng là vi-rút DTHCP có thể tấn công vào bào thai, gây chết thai, nhiễm vào não gây rối loạn thần kinh và não úng thủy ở thai cũng như ở heo sơ sinh. Đây là dạng bệnh tích mới hoàn toàn chưa được mô tả trong các

tài liệu chẩn đoán bệnh DTHCP. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở chẩn đoán lâm sàng bệnh DTHCP không nên bỏ sót trong các ca heo sơ sinh có triệu chứng thần kinh.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR xét nghiệm vi-rút DTHCP

Giếng 1: Đối chứng âm

Giếng 2 - 7: Mẫu nội quan 1 (+), não 1 (+); nội quan 2 (-), não

2 (+); nội quan 3 (+), não 3 (+),

Giếng 8: Đối chứng dương ASFV (257 bp)

Giếng 9: Thang DNA 100 bp

Kết quả PCR xét nghiệm vi-rút DTHCP được minh họa qua Hình 1 cho thấy, mẫu xét nghiệm có đoạn ADN tương ứng với kích thước của mẫu đối chứng dương (257bp) của vi-rút DTHCP. Cả 3 mẫu não (giếng 3, 5 và 7) được trình bày kết quả trong Hình 1 dương tính với ASFV. Trong khi đó chỉ có 2/3 mẫu nội quan dương tính với ASFV (giếng 2 và 6).

Kỹ thuật realtime PCR được chỉ định là kỹ thuật chính thức sử dụng xét nghiệm chẩn đoán vi-rút DTHCP (TCVN, 2018). Tuy nhiên, theo báo cáo của CISA-INIA (2017), trong các trường hợp nhiễm vi-rút DTHCP mạn tính hoặc nhiễm cận lâm sàng, hàm lượng vi-rút trong mẫu thấp ($Ct \geq 35$) quy trình realtime PCR của OIE cho kết quả âm tính giả hơn

50%. Vấn đề thực tế là hiện nay có hiện tượng nhiều trại heo có tiền sử nhiễm vi-rút DTHCP, heo nái có những vấn đề về rối loạn sinh sản (sẩy thai, thai khô, thai chết toàn ổ...), nhưng đều có vẻ ngoài bình thường và không có biểu hiện lâm sàng đặc biệt nào trước và sau khi sẩy thai hay có vấn đề rối loạn sinh sản.

Vấn đề đặt ra là xét nghiệm vi-rút DTHCP bằng kỹ thuật realtime PCR (OIE) có cho kết quả âm tính giả trong các trường hợp lâm sàng được mô tả trong nghiên cứu? Xét nghiệm song song bằng kỹ thuật PCR (OIE, 2019) và realtime PCR (OIE, 2019) tại 2 phòng xét nghiệm khác với 5 mẫu bệnh phẩm từ heo nghi bệnh DTHCP đã được thực hiện và kết quả được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả xét nghiệm vi-rút DTHCP bằng kỹ thuật PCR (OIE) và realtime PCR (OIE)

Mẫu	Kết quả (PCR - OIE)	Kết quả xét nghiệm 1 Realtime PCR - OIE)	Kết quả xét nghiệm 2 (Realtime PCR - OIE)
1	Dương tính	Âm tính	Âm tính
2	Dương tính	Âm tính	Âm tính
3	Dương tính	Âm tính	Âm tính
4	Dương tính	Âm tính	Âm tính
5	Dương tính	Âm tính	Âm tính

Kết quả của PCR xét nghiệm vi-rút DTHCP trong nghiên cứu được khẳng định với việc giải trình tự nucleotide và so sánh độ

tương đồng với trình tự tham chiếu của vi-rút DTHCP trên GenBank. Kết quả sự phù hợp trình tự nucleotide của chủng trong nghiên

cứu với chủng vi-rút DTHCP tham khảo là 100%, được minh họa qua Hình 1. Trình tự nucleotide của 5 chủng trong nghiên cứu đã được đăng ký trên ngân hàng gen với các mã số: MW648548, MW648549, MW648550, MW648551 và MW648552.

Kết quả của nghiên cứu cho phép khẳng định xét nghiệm vi-rút DTHCP trong các trường hợp bệnh lý nghi ngờ bệnh DTHCP hiện nay là hoàn toàn chính xác và phù hợp trong thực tế diễn biến của bệnh DTHCP.

Kết quả của nghiên cứu cho thấy, quy trình realtime PCR theo OIE xét nghiệm vi-rút DTHCP đã cho kết quả âm tính giả. Hiện tượng này cũng đã được đề cập bởi A. D. Truong và ctv. (2020); Ha Thi Thanh Tran và ctv. (2020). Kỹ thuật realtime PCR theo quy trình của OIE có thể bỏ sót các trường hợp heo nhiễm vi-rút DTHCP hiện nay tại

Việt Nam, nhất là trong các trường hợp mạn tính (CISA-INIA, 2017).

4. KẾT LUẬN

Theo những diễn tiến ghi nhận trong thực tế chăn nuôi heo hiện nay, vi-rút DTHCP đang lưu nhiễm trên đàn heo, cùng với thể cấp tính, thể mạn tính và cận lâm sàng đang gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho người chăn nuôi heo, nhất là trên đàn nái sinh sản. Những thay đổi của bệnh DTHCP hiện nay đang đặt ra yêu cầu mới đối với người chăn nuôi và các phòng xét nghiệm trong chẩn đoán bệnh DTHCP. Cần có thêm những nghiên cứu đánh giá tình hình lưu hành vi-rút DTHCP trên đàn heo, nhất là trên đàn nái ở Việt Nam; hoàn thiện quy trình chẩn đoán, xét nghiệm vi-rút DTHCP, qua đó có những chỉ dẫn xét nghiệm phù hợp, nâng cao hiệu quả kiểm soát bệnh DTHCP tại Việt Nam.

Description [P/vdl2555...](#)
Molecule type dna
Query Length 237

Descriptions

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
African swine fever virus isolate HBNH-2019 structural protein p72 (B646L) gene, complete cds	431	431	98%	9e-117	100.00%	MN207061.1
African swine fever virus isolate ASFV Wuhan 2019-1, complete genome	431	431	98%	9e-117	100.00%	MN393476.1
African swine fever virus strain ASFV_HU_2018, complete genome	431	431	98%	9e-117	100.00%	MN715134.1
African swine fever virus strain ASFV/pig/China/CAS19-01/2019, complete genome	431	431	98%	9e-117	100.00%	MN172368.1
African swine fever virus isolate ASFV/LT14/1490, complete genome	431	431	98%	9e-117	100.00%	MK628478.1

Hình 2. Sự phù hợp trình tự nucleotide của chủng vi-rút DTHCP trong nghiên cứu và vi-rút DTHCP tham khảo trên Ngân hàng gen

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aguero M., Fernandez J., Romero L., Sanchez Mascaraque C., Arias M. and Sanchez-Vizcaino J. M., (2003). Highly sensitive PCR assay for the routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4431-4434.
Beltrán-Alcrudo, D., Arias, M., Gallardo, C., Kramer, S. and Penrith, M.L. (2017).

African swine fever: detection and diagnosis - A manual for veterinarians. FAO Animal Production and Health Manual No. 19. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 88.

Bộ NN&PTNT, 2053/ TY - DT (2018). Chủ động triển khai các biện pháp ngăn chặn nguy cơ xâm nhiễm bệnh Dịch tả lợn châu Phi vào Việt Nam.



- Gallardo C., Okoth E., Pelayo V., Anchuelo R., Simon E. M. A., Llorente A., Nieto R., Soler A., Martin R., Arias M. and Bishop R. P., (2011). African swine fever viruses with two different genotypes, both of which occur in domestic pigs, are associated with ticks and adult warthogs, respectively, at a single geographical site. *Journal of General Virology*, 92, 432-444.
- CISA-INIA (2017). Evaluation of the PCR kit for African Swine Fever Virus (ASFV) genome Detection. Report performed in Valdeolmos (Madrid) at 8 th May 2017. Centro de Investigación en Sanidad Animal, European Union reference laboratory for ASF.
- OIE Terrestrial manual (2019). Chapter 3.8.1 African swine fever (infection with African swine fever virus).
- Schlafer D. H and Mebus C. A. (1987). Abortion in sows experimentally infected with African swine fever virus: pathogenesis studies. *Am. J. Vet. Res.* 48(2):246-54. PMID: 3826864.
- Ha Thi Thanh Tran, Anh Kieu Dang, Duc Viet Ly, Hao Thi Vu, Tuan Van Hoang, Chinh Thi Nguyen, Nhu Thi Chu, Vinh The Nguyen, Huyen Thi Nguyen, Anh Duc Truong, Ngoc Thi Pham, and Hoang Vu Dang (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-Australas J. Anim. Sci.* 33:1683-1690.
- Anh Duc Truong, Duc Viet Ly, Thi Hao Vu, Van Tuan Hoang, Thi Chinh Nguyen, Thi Nhu Chu, Huyen Thi Nguyen, The Vinh Nguyen, Ngoc Thi Pham, Ha Thi Thanh Tran and Hoang Vu Dang (2020). Unexpected cases in field diagnosis of African swine fever virus in Vietnam: The needs consideration when performing molecular diagnostic tests. *Open Veterinary Journal*, 10(2): 189-197.