

THE OPTIMIZATION PROCESS OF MULTIPLEX PCR TO DETECT AND IDENTIFY THE GENOTYPES OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS IN VIETNAM

Vo Thi Bích Thủy*, Bui Thuy Linh, Vu Minh Thuong, Nghiem Ngoc Minh

Institute of Genome Research - Vietnam Academy of Science and Technology

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 28/02/2023	Multiplex PCR is a widely used molecular biology method in many studies because of its superiority. A reaction that amplifies multiple DNA sequences in a single PCR reaction. Therefore, we have studied and applied the molecular biotechnology technique of Multiplex PCR to detect the presence of the ASF virus and identify which genotype is circulating in Vietnam. The objective is to design and optimize the multiplex PCR reaction as the basic kit for detecting and genotyping the ASF virus in Vietnam. The results showed that the multiplex PCR reaction was successfully designed and optimized, including the concentration of primers Buffer 1X; dNTP 0.5 μ M; 1.25 mM MgCl ₂ ; 0.05 U/ μ l Taq DNA polymerase, primers 0.1 – 0.4 μ M (p72-F, p72-R, p72-SNP, p72-g01, p72-g02, p72-g08, p72-g09, p72-g10, p72-g23); $\geq$ 150 pmol/ μ l DNA standard. Heat cycle is 95°C - 5 minutes; (95°C – 30 sec; 62°C – 15 sec; 72°C – 30 sec) x 30 cycles; 72°C - 7 minutes. This result can be used to develop a kit to detect and identify the ASF virus, which is meant for use in the Vietnamese livestock industry.
Revised: 29/4/2023	
Published: 04/5/2023	
KEYWORDS	
Multiplex PCR	
African Swine Fever virus	
P72 gene	
06 genotype	
Vietnam swine	

THIẾT KẾ VÀ TỐI ƯU HÓA PHẢN ỨNG MULTIPLEX PCR ĐỂ PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH DANH KIỂU GEN VIRUS GÂY BỆNH DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI Ở VIỆT NAM

Võ Thị Bích Thủy*, Bùi Thùy Linh, Vũ Minh Thương, NghiêM Ngọc Minh

Viện Nghiên cứu Hệ gen – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 28/02/2023	Multiplex PCR là phương pháp sinh học phân tử nhằm khuếch đại nhiều trình tự DNA chỉ trong một phản ứng và được ứng dụng phổ biến trong nhiều nghiên cứu vì tính ưu việt của nó. Vì vậy, chúng tôi đã nghiên cứu và ứng dụng kỹ thuật Multiplex PCR để phát hiện sự có mặt của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi, đồng thời định danh genotype đang lưu hành tại Việt Nam. Mục tiêu là thiết kế và tối ưu hóa phản ứng multiplex PCR làm cơ sở cho việc chế tạo một bộ kit phát hiện và định danh kiểu gen virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi ở Việt Nam. Kết quả đã thiết kế và tối ưu hóa thành công phản ứng multiplex PCR gồm: nồng độ Buffer 1X; dNTP 0,5 μ M; 1,25 mM MgCl ₂ ; 0,05 U/ μ l Taq DNA polymeraza, nồng độ các mồi là 0,1 – 0,4 μ M (p72-F, p72-R, p72-SNP, p72-g01, p72-g02, p72-g08, p72-g09, p72-g10, p72-g23); $\geq$ 150 pmol/ μ l DNA chuẩn. Chu trình nhiệt là 95°C - 5 phút; (95°C - 30 giây; 62°C - 15 giây; 72°C - 30 giây) x 30 chu kỳ; 72°C - 7 phút. Kết quả này sẽ được sử dụng để phát triển bộ kit phát hiện và định danh virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi với ý nghĩa sử dụng trong ngành chăn nuôi Việt Nam.
Ngày hoàn thiện: 29/4/2023	
Ngày đăng: 04/5/2023	
TỪ KHÓA	
Multiplex PCR	
Virus dịch tả lợn châu Phi	
Gen p72	
06 genotype	
Lợn Việt Nam	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7456>

* Corresponding author. Email: thuytbvo.igr@gmail.com

1. Giới thiệu

Virus dịch tả lợn châu Phi (African swine fever – ASFV) là tác nhân gây bệnh dịch tả lợn châu Phi (ASF). ASFV thuộc họ *Asfarviridae* [1], giống *Afivirusi* [2], [3], là virus DNA mạch kép, có vỏ bọc, hệ gen dài khoảng 170 – 193 kb và mã hóa cho 150 – 167 protein, bao gồm cả những protein cần thiết cho sự nhân lên của virus [4]. Trong đó, các gen mã hóa có vị trí gần nhau trên hệ gen. Việc phân tích dựa trên các trình tự đã công bố, khoảng 110 khung đọc mở (ORF) có mức độ bảo thủ cao giữa các genotype. Các protein được mã hóa trên hệ gen của ASFV đóng vai trò trong các giai đoạn khác nhau của chu kỳ lây nhiễm virus. Trong đó, protein p72 là loại phân bố trên bề mặt vỏ capsid và biểu hiện muộn trong quá trình lây nhiễm virus được xác định có tính kháng nguyên và miễn dịch cao. Các nhà khoa học đã xác định được 23 genotype ASFV dựa trên gen quy định protein capsid p72 của ASFV [4]. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây đã căn cứ vào sự biến đổi vùng C-terminus của gen *BL646L* mã hóa protein p72 nên các genotype ASFV được phân loại di truyền thành 24 genotype [5], [6]. Các genotype được phân bố chủ yếu như sau: vùng Đông và Nam Phi (genotypes I–XXII, XXIV); các nước Đông Phi và Cộng hòa Congo (genotype XXIII, có chung tổ tiên với genotype IX và X); Tây nam châu Âu (genotype I); châu Âu, châu Đại dương (Papua New Guinea), châu Á/ Đông Nam Á (Trung Quốc, Việt Nam, Philippines, Indonesia, Timor-Leste...), châu Mỹ (genotype II) [5], [7]. Genotype I và II hiện nay được coi là genotype “quốc tế” [8]. Genotype II gây bệnh dịch vùng Á - Âu có độc lực cao và gây ra một hình thức lâm sàng cấp tính có tỷ lệ tử vong lên đến 100% ở lợn.

Các xét nghiệm được OIE khuyến cáo hiện nay bao gồm phân lập virus, sàng lọc bằng kháng thể gắn huỳnh quang và kiểm tra bằng phương pháp PCR thường và real-time PCR [4]–[6], [9]. Trong đó, phân lập virus được coi là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán ASFV. Tuy nhiên, vì quá trình này tốn nhiều thời gian và công sức nên nó thường được sử dụng để kiểm tra lại các kết quả chẩn đoán và nghiên cứu bằng phân tử [9]. Đến nay, các kết quả giải trình tự gen của virus dịch tả lợn châu Phi ở Việt Nam cho thấy có sự tương đồng với virus gây bệnh ở Trung Quốc. Phân tích trình tự vùng gen *p72* nhận thấy các mẫu virus được phát hiện tại một số tỉnh miền Bắc như Hưng Yên, Thái Bình, Nam Định,... đều thuộc genotype II. Kết quả phân tích cây phả hệ và so sánh trình tự nucleotide vùng gen *p72* của virus dịch tả lợn châu Phi thuộc genotype II ở một số tỉnh miền Bắc Việt Nam và một số virus Dịch tả lợn châu Phi genotype II ở các nước trên thế giới cũng cho kết quả bất ngờ. Theo đó, các virus Dịch tả lợn châu Phi được phân lập ở Việt Nam có độ tương đồng 100% về nucleotide và amino acid so với virus dịch tả lợn Châu Phi genotype II khi so sánh với các chủng virus đã công bố tại Trung Quốc năm 2018 (MH722357; MK189456) [10]. Về mặt dịch tễ, các genotype của ASFV xuất hiện tại Việt Nam chủ yếu là genotype II, các genotype khác trong số 24 genotype còn lại chưa thấy xuất hiện tại Việt Nam. Tuy nhiên, có thể các đoạn DNA đích sử dụng trong các bộ kit nhập về Việt Nam là tuân thủ theo quy định của OIE, do vậy có những gen đích chưa phù hợp với biến đổi của ASFV tại Việt Nam, do đó rất cần thiết chế tạo những bộ kit có chứa nhiều hơn các đoạn gen đích, để cùng lúc có thể sàng lọc và định danh chính xác genotype của ASFV xuất hiện tại Việt Nam.

Bên cạnh đó, các nhà nghiên cứu cần tìm ra nhiều giải pháp phòng và chống bệnh (như thuốc hỗ trợ điều trị, nhiều loại vaccine đặc hiệu), đặc biệt tìm ra nhiều cách thức (như các bộ kit) để nhanh chóng phát hiện, dập dịch kịp thời và chính xác, từ đó giảm thiểu thiệt hại cho ngành chăn nuôi nói riêng và nền kinh tế hàng hóa tiêu dùng nói chung. Từ thực tế trên, nhóm nghiên cứu đã tiến hành thiết kế và tối ưu hóa phản ứng multiplex PCR với mục đích phát triển một bộ kit giúp phát hiện và định danh genotype virus gây dịch bệnh tả lợn châu Phi tại Việt Nam.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

Bộ DNA chuẩn mang trình tự nucleotide của 06 genotype ASFV gồm: g01, g02, g08, g09, g10, g23 (được tạo ra từ kết quả của Đề tài Độc lập cấp VAST 2019-2020 đã được nghiệm thu của Viện Nghiên cứu Hệ gen) làm DNA khuôn sử dụng cho tối ưu hóa phản ứng multiplex PCR.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thiết kế môi

Phân tích sơ bộ, các trình tự gen của protein p72 có tính hợp lý nhất, tăng tính chính xác cho các kết quả do số lượng trình tự phong phú. Dữ liệu cho thấy trình tự này ở các cá thể có sự khác biệt tương đối, nhưng ở mức độ giữa các chủng với nhau không có nhiều sự khác biệt. Vì vậy, sử dụng Single-nucleotide Polymorphism (SNP) đặc hiệu để thiết kế môi phân biệt các genotype có chứa SNP đặc trưng sử dụng trong phản ứng PCR.

Trình tự hệ gen virus ASF và các trình tự gen p72 của virus này trên cơ sở dữ liệu NCBI được sử dụng để phân tích, lựa chọn và xác định 6 vị trí SNP đặc thù cho 6 genotype. Kiểm tra bằng các công cụ tin sinh như PrimerBlast và xây dựng cây phát sinh chủng loại, các môi này đều đạt độ đặc hiệu cao, đảm bảo khuếch đại chính xác đoạn gen theo tính toán. Chúng tôi đã thiết kế được các môi như trong bảng 1 và bảng 2.

Bảng 1. Trình tự môi xác định genotype

Tên	Trình tự (5' -> 3')	Kích thước (bp)	Tm (°C)	SNP
p72-SNP	GTGTCCATAAAACGCAGGTG		57,39	
p72-g01	CGGATCATCGGGGGTTTAAAT	422	58,78	A
p72-g02	TTATCTCTGCGTGGTGAGTG	210	57,35	C
p72-g08	GGTTTAAATCGAATTGCCTCCA	410	57,29	T
p72-g09	GGAAATTTATCGATAAGATTGATACCG	352	56,81	C
p72-g10	ATGCCGATACCAAGATCG	573	57,85	C
p72-g23	GTGGTGATAGACCCACATAT	550	56,57	A

Bảng 2. Trình tự môi định danh sự có mặt của virus dịch tả lợn châu Phi

Tên	Trình tự (5' -> 3')	Kích thước (bp)	Tm (°C)
p72L	FW TTGGTATTCCCCAGTACGGA	760	57,75
	RV ATAGCAAGGTTACAGTTCTC		55,49

Ghi chú: Tm: Nhiệt độ nóng chảy của môi.

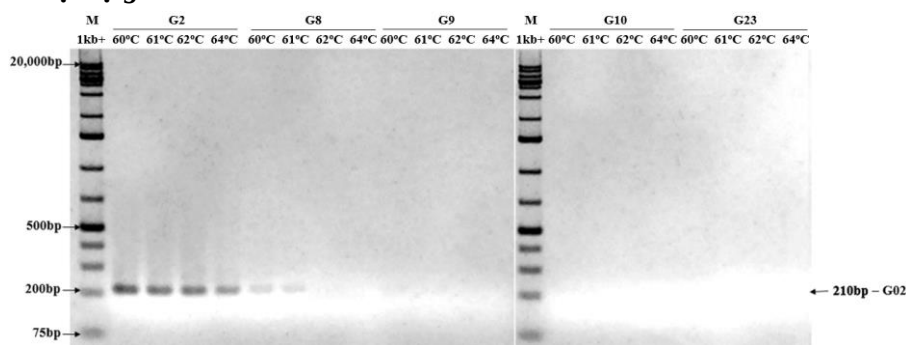
2.2.2. Thiết kế và tối ưu hóa phản ứng PCR

Thiết kế phản ứng PCR dựa trên phản ứng PCR tiêu chuẩn (được thực hiện với tổng thể tích là 10 µl, gồm các thành phần cơ bản là: buffer nồng độ 1X, dNTPs nồng độ 2,5 mM mỗi loại, MgCl₂ nồng độ 1 – 2 mM, môi nồng độ 0,05 – 0,2 µM mỗi loại, Taq polymerase nồng độ 0,05 U/µl, DNA template 100 – 300 pmol/µl. Nhiệt độ gắn môi được tối ưu bằng cách chạy gradient nhiệt độ, nhiệt độ trung gian được chia tự động trên máy từ 60 - 64°C.

Kiểm tra sản phẩm PCR bằng cách điện di 3 µl trên agarose 2% và nhuộm ethidium bromide. Quan sát bản gel trên máy GelDoc (BioRad) và phân tích kết quả.

3. Kết quả và bàn luận

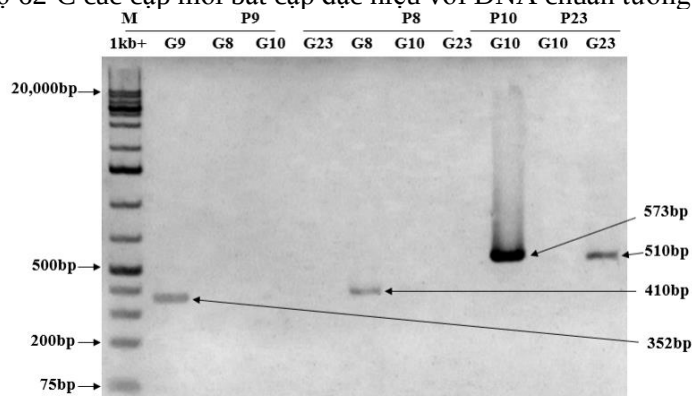
3.1. Tối ưu nhiệt độ gắn môi



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR môi genotype 2 ở các nhiệt độ (G2, G8, G9, G10, G23 là kí hiệu các phản ứng sử dụng DNA khuôn tương ứng các genotype 2, 8, 9, 10, 23)

Do trình tự đoạn môi nhận biết các genotype virus chỉ khác biệt một vị trí nucleotide duy nhất nên nhiệt độ môi cần phải được lựa chọn cẩn thận. Tiến hành thử nghiệm trên 4 nhiệt độ gần môi khác nhau là 60°C, 61°C, 62°C, 64°C với môi xác định genotype 2 và khuôn DNA chuẩn của tất cả các chủng virus hiện có, thu được kết quả tại Hình 1.

Ở nhiệt độ từ 60 - 64°C, môi genotype 2 đều bắt cặp đặc hiệu với khuôn genotype 2. Tiếp tục sử dụng nhiệt độ 60 - 64°C với các môi còn lại lần lượt với các mẫu DNA chuẩn khác. Kết quả cho thấy, ở nhiệt độ 62°C các cặp môi bắt cặp đặc hiệu với DNA chuẩn tương ứng (Hình 2).



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR môi genotype 8, 9, 10, 23 ở nhiệt độ 62°C (P8, P9, P10, P23 là các môi xác định các genotype 8, 9, 10, 23;

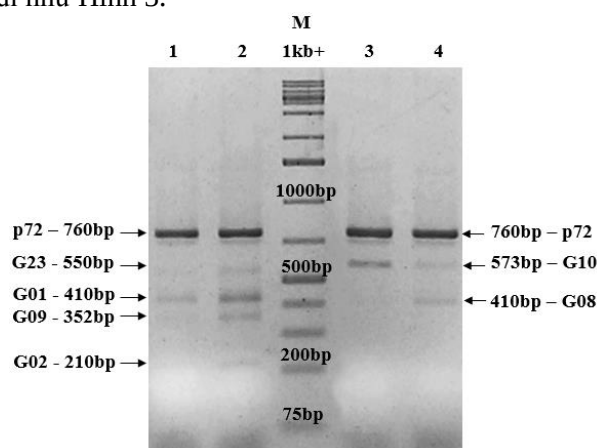
G8, G9, G10, G23 kí hiệu cho các khuôn là các chủng chuẩn genotype 8, 9, 10, 23 sử dụng trong phản ứng)

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, tại nhiệt độ 62°C là nhiệt độ tối ưu để các môi bắt cặp đặc hiệu.

3.2. Tối ưu hàm lượng DNA khuôn mẫu chuẩn và nồng độ môi

3.2.1. Tối ưu nồng độ môi

Môi p72-SNP được sử dụng làm môi xuôi chung cho tất cả các cặp môi dùng để định danh virus, môi này cần phải có lượng đủ để đảm bảo phản ứng PCR đặc hiệu xảy ra. Ngoài ra, môi p72L-F và p72L-R dùng để định danh sự có mặt của virus dịch tả lợn Châu Phi. Thử nghiệm lượng môi xuôi p72-SNP, p72L-F và p72L-R cho vào phản ứng ở 2 nồng độ 0,2μM và 0,4 μM thu được kết quả điện di như Hình 3.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR khảo sát môi p72-SNP, p72L-F và p72L-R ở các nồng độ (1, 2: hỗn hợp môi xác định genotype 1, 2, 9, 23 với môi p72-SNP, p72L-F, p72L-R ở nồng độ 0,2μM và 0,4μM;

3, 4: hỗn hợp môi xác định genotype 8, 10 với môi p72-SNP, p72L-F, p72L-R ở nồng độ 0,2μM và 0,4μM)

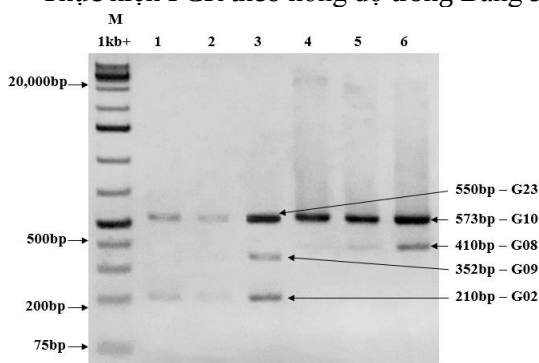
Kết quả thử nghiệm cho thấy băng DNA ở nồng độ môi p72-SNP, p72L-F, p72L-R 0,4 μM là tối ưu cho phản ứng vì rõ nét hơn khi sử dụng môi ở nồng độ 0,2 μM .

Trong phản ứng có mặt đầy đủ các genotype, đặc biệt là G01 ở nồng độ 0,1 μM là rõ band nhất, một số sản phẩm như G08 và G09 cho thấy xuất hiện band không đồng đều, mờ nhạt hơn các sản phẩm khác. Do đó, nồng độ các môi đơn lẻ còn lại trong hỗn hợp cũng cần được tính toán phù hợp. Các thử nghiệm được tiến hành với nồng độ môi như trong Bảng 3.

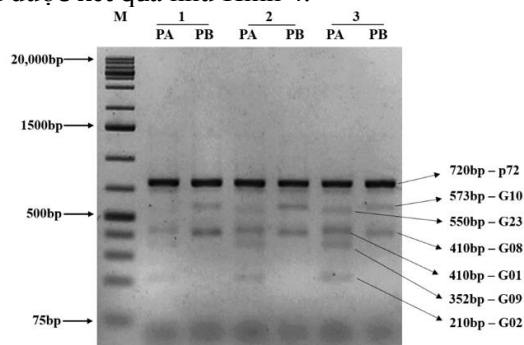
Bảng 3. Hỗn hợp nồng độ môi khác nhau

Môi hỗn hợp	Môi đơn	Nồng độ cuối (μM)
1	p72-g02	0,2
	p72-g09	0,2
	p72-g23	0,2
2	p72-g02	0,2
	p72-g09	0,3
	p72-g23	0,1
3	p72-g02	0,2
	p72-g09	0,4
	p72-g23	0,1
4	p72-g08	0,2
	p72-g10	0,1
5	p72-g08	0,2
	p72-g10	0,05
6	p72-g08	0,1
	p72-g10	0,1

Thực hiện PCR theo nồng độ trong Bảng 3 thu được kết quả như Hình 4.



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR thử nghiệm ở các nồng độ môi thành phần khác nhau (1, 2, 3, 4, 5, 6: phản ứng PCR với hỗn hợp môi theo bảng 3)



Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR thử nghiệm kiểm tra mẫu ở các nồng độ khác nhau (1, 2, 3: hỗn hợp môi xác định genotype 1, 2, 9, 23 với các nồng độ mẫu lần lượt là 100 pmol/ μL , 150 pmol/ μL , 300 pmol/ μL ; PA: phản ứng PCR với môi xác định genotype 2, 9, 23 và DNA chuẩn của genotype 2, 9, 23; PB: phản ứng PCR với môi xác định genotype 8, 10 và DNA chuẩn của genotype 8, 10)

Ở nồng độ các môi p72-g02, p72-g09, p72-g23 lần lượt là 0,2 μM , 0,4 μM và 0,1 μM trong hỗn hợp môi xác định các chủng genotype 2, 9, 23 và nồng độ các môi p72-g08, p72-g10 là 0,1 μM trong hỗn hợp môi xác định các chủng genotype 8, 10. Kết quả thu được các băng sản phẩm đồng đều, rõ nét và đúng kích thước.

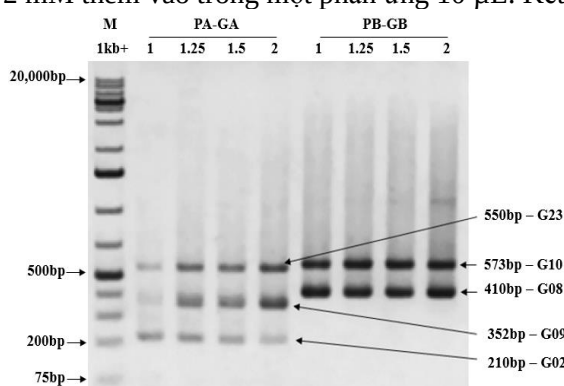
3.2.2. Tối ưu hàm lượng DNA khuôn mẫu chuẩn

Để tối ưu khả năng phát hiện sự có mặt của virus dịch tả lợn châu Phi, tiến hành thử nghiệm phản ứng với khuôn mẫu ở các nồng độ khác nhau là 100 pmol/ μ l, 150 pmol/ μ l và 300 pmol/ μ l.

Kết quả thử nghiệm (Hình 5) có thể thấy, ở nồng độ 100 pmol/ μ l, băng sản phẩm genotype 1, 2, 9 hiện tương đối rõ nét. Tuy nhiên, băng sản phẩm của genotype 23 không hiện rõ ràng. Trong khi đó, ở nồng độ 150 pmol/ μ l và 300 pmol/ μ l tất cả các băng sản phẩm đều hiện lên tương đối rõ ràng, có thể nhận biết bằng mắt thường. Như vậy, nồng độ DNA khuôn tối thiểu để nhận biết có thể phát hiện virus là trên 150 pmol/ μ l. Tiến hành lặp lại thí nghiệm 30 lần để khẳng định chắc chắn nồng độ mẫu chuẩn tối ưu là ≥ 150 pmol/ μ l. Kết quả kiểm tra thu được trong cả 30 lần thử nghiệm đều có kết quả hoàn toàn giống nhau.

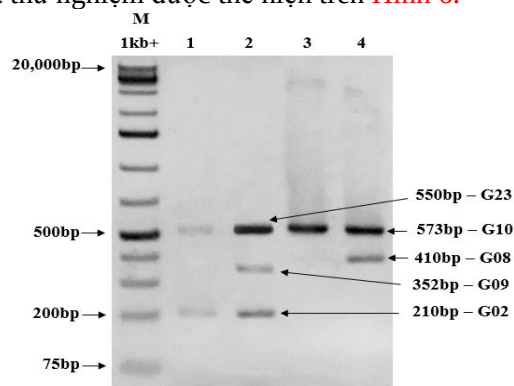
3.3. Tối ưu nồng độ $MgCl_2$

Nồng độ cuối cùng cho Mg^{2+} trong PCR thường nằm trong khoảng 1 – 4 mM. Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành thử nghiệm 4 mức nồng độ $MgCl_2$ 1 mM, 1,25 mM, 1,5 mM và 2 mM thêm vào trong một phản ứng 10 μ L. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Hình 6.



Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR thử nghiệm $MgCl_2$ ở các nồng độ khác nhau

(PA-GA: phản ứng PCR với mỗi xác định genotype 2, 9, 23 (PA) và DNA chuẩn của genotype 2, 9, 23 (GA) ở nồng độ $MgCl_2$ từ 1 mM, 1,25mM, 1,5 mM và 2 mM; PB-GB: phản ứng PCR với mỗi xác định genotype 8, 10 (PB) và DNA chuẩn của genotype 8, 10 (GB) ở nồng độ $MgCl_2$ từ 1 mM, 1,25 mM, 1,5 mM và 2 Mm)



Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm PCR thử nghiệm dNTP ở các nồng độ khác nhau

(1, 2: phản ứng PCR với mỗi xác định genotype 2, 9, 23 ở nồng độ dNTP 0,25 μ M và 0,5 μ M; 3, 4: phản ứng PCR với mỗi xác định genotype 8, 10 ở nồng độ dNTP 0,25 μ M và 0,5 μ M)

Kết quả thu được cho thấy, nồng độ $MgCl_2$ ở nồng độ 1,25 mM trong phản ứng, tất cả các band đều lên rõ nét, đủ khả năng nhận biết bằng mắt thường, đồng thời đảm bảo hiệu suất và tiết kiệm chi phí.

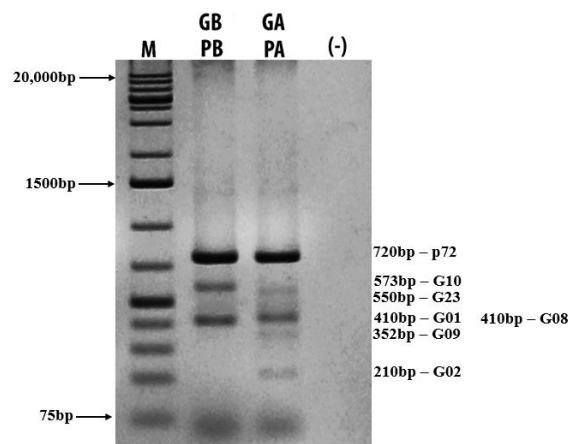
3.4. Tối ưu nồng độ dNTP

Thử nghiệm bổ sung dNTP ở các nồng độ 0,25 μ M và 0,5 μ M thu được kết quả như Hình 7.

Tại nồng độ dNTP 0,25 μ M genotype 9 ở nhóm A và genotype 8 không xuất hiện band. Nồng độ cho vào phản ứng PCR cần đạt 0,5 μ M là xuất hiện đầy đủ các band, để đảm bảo phản ứng xảy ra hiệu quả nhất.

3.5. Phản ứng multiplex PCR với thành phần và chu trình nhiệt đã tối ưu

Thực hiện phản ứng với chu trình nhiệt đã tối ưu: 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ (95°C, 30 giây; 62°C, 15 giây; 72°C, 30 giây); 72°C, 7 phút. Kiểm tra sản phẩm PCR bằng cách điện di trên agarose 2% và đọc kết quả bằng quan sát bản gel trên đèn UV, kết quả thu được như Hình 8.



Hình 8. Kết quả điện di sản phẩm PCR phản ứng multiplex PCR sau khi đã tối ưu PA-GA: phản ứng PCR với hỗn hợp mồi xác định genotype 2, 9, 23 (PA) và DNA chuẩn của genotype 2, 9, 23 (GA); PB-GB: phản ứng PCR với hỗn hợp mồi xác định genotype 8, 10 (PB) và DNA chuẩn của genotype 8, 10 (GB)

Kết quả thực hiện phản ứng multiplex PCR với thành phần và chu kỳ nhiệt đã tối ưu được thể hiện ở trên (Hình 7) cho thấy, xuất hiện đầy đủ các băng gen *p72* và các genotype nhóm A (1, 2, 9, 23), nhóm B (8, 10) và không có băng phụ.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã thiết kế và tối ưu thành công phản ứng multiplex PCR phát hiện và định danh virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi bằng cách khuếch đại đoạn gen *p72* và định danh 06 kiểu gen 1, 2, 8, 9, 10, và 23. Thành phần và nồng độ cuối của phản ứng gồm: PCR buffer 1X, dNTP 0,5 μ M; 1,25 mM $MgCl_2$; 0,05 U/ μ l Taq DNA polymeraza; các mồi lần lượt là 0,1 μ M (p72-g01, p72-g08, p72-g10, p72-g23), 0,2 μ M (p72-g02), 0,4 μ M (p72-F, p72-R, p72-SNP, p72-g09); ≥ 150 pmol/ μ l DNA chuẩn. Chu trình nhiệt phản ứng là 95°C - 5 phút; (95°C - 30 giây; 62°C - 15 giây; 72°C - 30 giây) x 30 chu kỳ; 72°C - 7 phút. Kết quả nghiên cứu là cơ sở phát triển bộ kit phát hiện và định danh virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi với ý nghĩa sử dụng trong chăn nuôi nhằm chẩn đoán hoặc sàng lọc các cá thể lợn nghi hoặc nhiễm bệnh tại các trang trại lợn Việt Nam.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số DL0000.04/21-23 do PGS.TS. Võ Thị Bích Thủy là chủ nhiệm đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] C. Alonso, M. Borca, L. Dixon, Y. Revilla, F. Rodriguez, and J. M. Escribano, "ICTV virus taxonomy profile: Asfarviridae," *Journal of General Virology*, vol. 99, no. 5, pp. 613-614, May 2018.
- [2] E. C. Anderson, G. H. Hutchings, N. Mukarati, and P. J. Wilkinson, "African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease," *Vet Microbiol*, vol. 62, no. 1, pp. 1-15, Apr. 1998.
- [3] S. B. Kleiboeker, G. A. Scoles, T. G. Burrage, and J.-H. Sur, "African swine fever virus replication in the midgut epithelium is required for infection of *Ornithodoros* ticks," *J Virol*, vol. 73, no. 10, pp. 8587-8598, Oct. 1999.
- [4] I. Galindo and C. Alonso, "African Swine Fever Virus: A Review," *Viruses* 2017, vol. 9, no. 5, p. 103, May 2017.
- [5] J. E. Achenbach *et al.*, "Identification of a New Genotype of African Swine Fever Virus in Domestic Pigs from Ethiopia," *Transbound Emerg Dis*, vol. 64, no. 5, pp. 1393-1404, 2017.

-
- [6] C. J. Quembo, F. Jori, W. Vosloo, and L. Heath, "Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype," *Transbound Emerg Dis*, vol. 65, no. 2, pp. 420-431, Apr. 2018.
 - [7] M. L. Penrith, "Current status of African swine fever," *CABI Agriculture and Bioscience 2020 1:1*, vol. 1, no. 1, pp. 1-26, Aug. 2020.
 - [8] S. Blome, K. Franzke, and M. Beer, "African swine fever – A review of current knowledge," *Virus Res*, vol. 287, Oct. 2020, Art. no. 198099.
 - [9] N. Jia, Y. Ou, Y. Zhang, and J. Zhang, "Roles of African swine fever virus structural proteins in viral infection," *J Vet Res*, vol. 61, no. 2, pp. 135-143, May 2017.
 - [10] T. B. N. Tran, V. T. Nguyen, T. T. H. Nguyen, V. X. Dang, and L. V. Phan, "Molecular and Biological Characteristics of African Swine Fever Virus Isolates in Some Northern Provinces of Vietnam (in Vietnamese)," *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, vol. 18, no. 10, pp. 803-811, 2020.