

Nghiên cứu khoa học

PHÂN LẬP VIRUS DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI TRÊN MÔI TRƯỜNG TẾ BÀO PORCINE ALVEOLAR MACROPHAGES (PAM)

*Trần Thị Thanh Hà¹, Trương Anh Đức¹, Lý Đức Việt¹,
Vũ Thị Hảo¹, Hoàng Văn Tuấn¹, Nguyễn Thị Chinh¹,
Chu Thị Như¹, Nguyễn Thế Vinh², Phạm Thị Ngọc³, Đặng Vũ Hoàng¹*

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, môi trường tế bào Porcine Alveolar Macrophages (PAM) bước đầu đã được ứng dụng để nuôi cấy, phân lập virus dịch tả lợn châu Phi (DTLCP) từ mẫu bệnh phẩm thu ở thực địa. Lợn nghi mắc bệnh DTLCP có các triệu chứng và bệnh tích điển hình được sử dụng để làm vật liệu nghiên cứu. Virus DTLCP được phát hiện bằng phương pháp PCR truyền thống kết hợp giải trình tự gen sử dụng cặp mồi đặc hiệu PPA1 và PPA2. Kết quả nghiên cứu cho thấy mẫu bệnh phẩm cho kết quả PCR dương tính với virus DTLCP và chủng DTLCP có trình tự gen tương đồng 100% so với các chủng tương ứng tham chiếu đã công bố trước đây. Virus DTLCP sau đó đã được phân lập trên tế bào PAM và được giám định lại bằng 2 phương pháp: phương pháp hấp phụ hồng cầu (HAD test) và phương pháp PCR, theo khuyến cáo của OIE/FAO. Các kết quả nghiên cứu thu được cho thấy, chủng virus phân lập được dương tính với cả hai phương pháp HAD test và PCR. Thành công của nghiên cứu này là đã phân lập được chủng virus DTLCP từ mẫu bệnh phẩm thực địa.

Từ khóa: Dịch tả lợn châu Phi, ASFV, phân lập virus, hấp phụ hồng cầu.

Isolation of African swine fever virus on Porcine alveolar macrophages (PAM) cells

*Tran Thi Thanh Ha, Trương Anh Đức, Lý Đức Việt,
Vu Thi Hao, Hoàng Văn Tuấn, Nguyễn Thị Chinh,
Chu Thị Như, Nguyễn Thế Vinh, Phạm Thị Ngọc, Đặng Vũ Hoàng*

SUMMARY

In this study, the porcine alveolar macrophages (PAM) cell medium was used for culturing and isolating the African swine fever virus (ASFV) from the field samples. The ASFV suspected pigs with the typical clinical signs and pathological lesions, was used as the studied material. The ASFV was detected by conventional PCR technique in combination with sequence analysis using specific primers, PPA1 and PPA2. As a result, the samples were positive with ASFV by PCR and ASFV strain presented 100% of the nucleotide sequence similarity level in comparison with those of the previous isolation ASFV. Furthermore, the isolation of ASFV was conducted using PAM cell system and this isolate was further confirmed by haemadsorption (HAD) test and PCR technique according to the recommendation of OIE/FAO. The studied result showed that the isolated virus strain was positive in both HAD test and PCR technique. It is concluded that ASFV was successfully isolated on PAM cells from the field samples in Viet Nam.

Keywords: ASFV, PAM cell, isolate, HAD.

¹. Bộ môn Hóa sinh miễn dịch - Viện Thú y

². Bộ môn Virus - Viện Thú y

³. Phòng Thí nghiệm tổng hợp và bảo tồn quỹ gen - Viện Thú y

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dịch tả lợn châu Phi (DTLCP) là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, virus chỉ gây bệnh cho lợn nuôi và lợn rừng; không gây bệnh cho người và các loài động vật khác. Lợn bệnh có khả năng chết lên đến 100% và có tác động lớn đến kinh tế các nước phát triển và đang phát triển [3, 4]. Bệnh DTLCP có khả năng lây lan nhanh, gây thiệt hại lớn cho ngành chăn nuôi lợn. Virus có sức đề kháng cao, tồn tại lâu ở ngoài môi trường và trong các sản phẩm của lợn; bệnh lây lan trực tiếp từ lợn bệnh sang lợn chưa mắc bệnh, sản phẩm lợn mang mầm bệnh hoặc gián tiếp qua các loài vật chủ trung gian mang mầm bệnh (ve, mòng, côn trùng, gặm nhấm, chim di cư...) [14], các phương tiện vận chuyển, thức ăn chăn nuôi, dụng cụ chăn nuôi và cả yếu tố con người [2, 3, 12, 14]. Hiện nay trên thế giới chưa có vaccin phòng bệnh, và cũng chưa có thuốc điều trị bệnh. Tác nhân gây bệnh là virus DTLCP, đây là một loại ADN virus, thuộc họ *Asfarviridae* [3, 4]. Bệnh do virus DTLCP lần đầu tiên được ghi nhận đã xảy ra vào năm 1907, tuy nhiên ca bệnh DTLCP được mô tả lần đầu tiên vào năm 1921 tại Kenya và sau đó bệnh lan rộng ra các nước châu Âu, Nam Mỹ và vùng Caribbean vào giữa thế kỷ trước [3]. Tại châu Á, bệnh DTLCP lần đầu tiên được phát hiện tại Trung Quốc vào đầu tháng 8/2018 [13] và sau đó là tại Mông Cổ vào đầu tháng 1/2019 (OIE/FAO). Tại Việt Nam, từ ngày 1/2 - 20/3/2019, bệnh DTLCP xảy ra tại 310 xã, 62 huyện của 20 tỉnh, thành phố (Hưng Yên, Thái Bình, Hải Phòng, Thanh Hóa, Hà Nội, Hải Dương, Hà Nam, Hòa Bình, Điện Biên, Thái Nguyên, Quảng Ninh, Ninh Bình, Nam Định, Lạng Sơn, Bắc Kạn, Sơn La, Nghệ An, Bắc Ninh, Thừa Thiên Huế và Lai Châu); tổng số lợn bị mắc bệnh và tiêu hủy là hơn 37 nghìn con (Cục Thú y). Theo thông tin từ OIE [7], tính từ năm 2017 đến ngày 19/3/2019, đã có hơn 20 quốc gia báo cáo có bệnh DTLCP. Cho đến nay, chủng virus DTLCP đã xác định được tổng cộng 24 genotype [13].

Hiện nay theo khuyến cáo của OIE, các phương pháp sinh học phân tử dùng trong chẩn đoán bệnh DTLCP như PCR, Realtime PCR, ELISA, phản ứng miễn dịch huỳnh quang (IFT hoặc DIFT), mỗi phương pháp đều có ưu điểm và nhược điểm riêng [7, 8]. Phương pháp Realtime PCR là phương pháp

nhANH, độ đặc hiệu cao. Đây là phương pháp đang được sử dụng rộng rãi tại Việt Nam để chẩn đoán DTLCP. Tuy nhiên đây không phải là phương pháp hoàn hảo. Những nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng, nếu có sự sai khác giữa trình tự mỗi đặc hiệu và mẫu dò (probe) với trình tự gen chủng thực địa, có thể gây ra kết quả Realtime PCR âm tính giả. Khả năng gây âm tính giả của phương pháp Realtime PCR trong chẩn đoán phát hiện virus thực địa có thể lên tới 60% [5, 11]. Các phương pháp nghiên cứu chẩn đoán virus học được OIE/FAO khuyến cáo sử dụng để xác định virus DTLCP là phương pháp phân lập virus DTLCP trên tế bào đại thực bào (PAM) kết hợp với phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD) [7]. Phương pháp phân lập virus trên tế bào PAM kết hợp với phản ứng HAD là "phương pháp vàng" thường được dùng để khẳng định lại các kết quả dương tính của các phương pháp sinh học phân tử khác dùng trong chẩn đoán như PCR, Realtime PCR hay ELISA [1, 7-9]. Hiện nay, tại Việt Nam chưa có phòng thí nghiệm nào thực hiện thành công việc phân lập virus trên tế bào PAM kết hợp với phản ứng HAD trong nghiên cứu virus DTLCP. Để phục vụ công tác chẩn đoán bệnh DTLCP nhằm khống chế và kiểm soát bệnh, chúng tôi tiến hành nghiên cứu phân lập virus DTLCP sử dụng tế bào macrophages từ phổi lợn (PAM).

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là hạch màng treo ruột, lách và thận lợn nghi nhiễm virus DTLCP được thu thập theo tiêu chuẩn của OIE [7]. Bệnh phẩm được nghiền trong cối chày sứ, tạo huyền dịch 10% trong MEM 1X có bổ sung kháng sinh như thường quy, bảo quản ở -70°C cho đến khi xét nghiệm.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Phương pháp PCR truyền thống sử dụng cặp mồi PPA1/PPA2 xác định sự có mặt của virus DTLCP từ mẫu bệnh phẩm thu thập tại thực địa theo hướng dẫn của OIE [7].

- Thiết lập hệ thống nuôi cấy tế bào Porcine alveolar macrophages (PAM) dùng trong phân lập virus DTLCP từ thực địa và phản ứng hấp phụ hồng

cầu (HAD) dùng trong giám định virus DTLCP theo khuyến cáo của FAO và OIE [7].

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp PCR truyền thống phát hiện DNA virus DTLCP

Mẫu DNA được tách từ huyền dịch bệnh phẩm 10% trong MEM 1X sử dụng kit PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất; thu DNA trong 50µl nước (nuclease free water).

PCR nhân gen sử dụng bộ kit GoTaq Green 2X Master Mix (Promega, Hoa Kỳ) với cặp mồi đặc hiệu theo hướng dẫn của OIE cho virus DTLCP, PPA1 và PPA2 cho sản phẩm PCR 257 bp.

ASFV-PPA1

5'-AGTTATGGGAAACCCGACCC-3'

ASFV-PPA2

5'-CCCCTGAATCGGAGCATCCT-3'

Chu trình nhiệt bao gồm 94°C trong 10 phút; 40 chu kỳ của 94°C trong 15 giây, 62°C trong 30 giây và 72°C trong 30 giây; và sau cùng 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên agarose 2% và hiển thị dưới đèn UV.

- Phương pháp giải trình tự gen sử dụng cặp mồi PPA1/PPA2

Sản phẩm PCR khoảng 257bp được điện di và tinh khiết bằng kit (Qiagen, QIAEX II, Gel Extraction Kit, Đức). Giải trình tự được thực hiện theo hướng dẫn của nhà cung cấp kit Bigdye terminator V3.1 (ABI, Hoa Kỳ), điện di và đọc trình tự nucleotide tự động trên máy sequencer ABI 3100 (Hoa Kỳ) được thực hiện tại Công ty Gentis (Tây Hồ, Hà Nội).

Phân tích trình tự dựa vào sự hỗ trợ của phần mềm chuyên dụng: So sánh trình tự bằng phần mềm Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), so sánh đa chuỗi sử dụng ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) và DNASTAR Lasergene (DNASTAR, Inc., Hoa Kỳ).

- Phương pháp nuôi cấy tế bào PAM dùng trong phân lập virus DTLCP từ thực địa và phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD) dùng trong giám định virus DTLCP theo khuyến cáo của FAO và OIE.

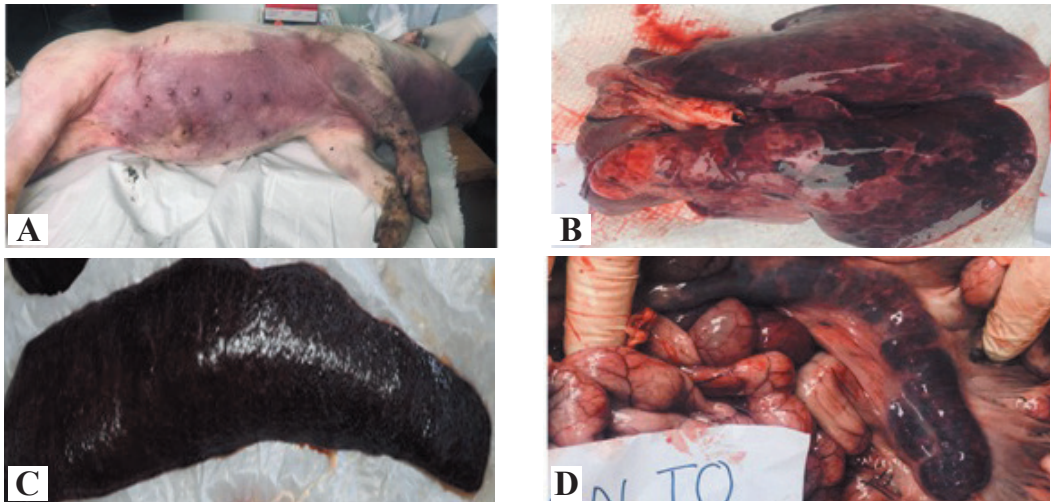
Đại thực bào phẩy nang của lợn (PAM) sử dụng để phân lập virus DTLCP được lấy từ phổi lợn sạch âm tính với virus DTLCP, dịch tả lợn cổ điển, PCV2 và PRRS như đã mô tả trước đây [1] và theo khuyến nghị của OIE [7]. Tế bào được thu và hoàn nguyên trong môi trường Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher, Hoa Kỳ) được bổ sung streptomycin (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ), ampicillin (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) và huyết thanh bào thai bê 5% (FCS, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) với nồng độ tế bào cuối cùng là: 1×10^6 tế bào/ml. Virus DTLCP được phân lập trên đĩa nuôi cấy tế bào 6 giếng/đĩa (Thermo Fisher, Hoa Kỳ), mỗi giếng chứa 2 ml huyền dịch tế bào và 50µl huyền dịch 10% bệnh phẩm. Đĩa phân lập được nuôi cấy trong 3 ngày ở 37°C, 5% CO₂, virus DTLCP thu hoạch bằng cách đóng băng và giải đông tan. Sau đó được tiếp đời lần 2, sử dụng 50 µl huyền dịch tế bào-virus phân lập lần 1 được nuôi cấy trong 2ml môi trường tế bào PAM (1×10^6 tế bào/ml), sau đó được nuôi cấy và thu hoạch như mô tả cho lần phân lập đầu tiên. Virus DTLCP tiếp đời lần 3, sử dụng 50µl huyền dịch tế bào-virus phân lập lần 2 được nuôi cấy trong 2ml môi trường tế bào PAM (1×10^6 tế bào/ml) ở 37°C, 5% CO₂. Sau 24 giờ nuôi cấy, bổ sung vào giếng tiếp đời virus 20µl 1% hồng cầu lợn (RBC) để kiểm tra khả năng hấp phụ hồng cầu (HAD) của các tế bào PAM nhiễm virus DTLCP sau 5-6 ngày gây nhiễm theo hướng dẫn của OIE [7].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Triệu chứng và bệnh tích lợn nghi nhiễm bệnh DTLCP

Việc xác định các triệu chứng lâm sàng và các tổn thương bệnh lý là bước quan trọng để chẩn đoán bệnh DTLCP. Như thể hiện trong hình 1, lợn nghi mắc bệnh DTLCP được thu thập và đánh giá các triệu chứng lâm sàng điển hình như sốt cao và xuất huyết ở da vùng chân và bụng. Ngoài ra, bệnh tích điển hình là các hạch bạch huyết bị xuất huyết và lách sưng to, sẫm màu và xuất huyết, gần như có màu đen (hình 1).

Theo OIE, các nốt xuất huyết thường xuyên xuất hiện trên cơ thể, hạch bạch huyết, lách, phổi, tim, gan, thận và bàng quang. Trong trường hợp mạn tính, có thể có viêm khớp, viêm màng



Hình 1. Bệnh tích lợn nghi nhiễm virus DTLCP

A: Các nốt xuất huyết xanh, tím trên da; B: Phổi sung huyết; C: Lách sưng to, đen và xuất huyết; D: Hạch màng treo ruột sưng to, xuất huyết

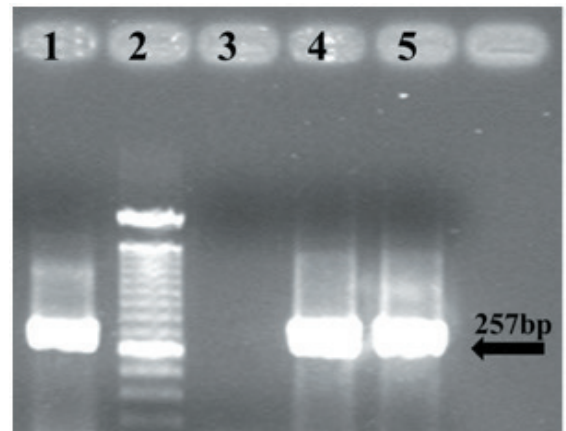
phổi, viêm phổi và loét da. Với những dấu hiệu lâm sàng và triệu chứng bệnh tích điển hình này cho thấy khả năng lợn bị nhiễm virus DTLCP là rất cao [7].

3.2. Phản ứng PCR truyền thống và giải trình tự gen xác định sự có mặt của virus DTLCP

Để xác định sự có mặt của virus DTLCP trong mẫu bệnh phẩm, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR truyền thống theo hướng dẫn của OIE, sử dụng cặp mồi đặc hiệu là PPA1, PPA2. Kết quả PCR với sản phẩm nhân gen đặc hiệu được mô tả ở hình 2.

Ở hình 2, đối chứng dương là mẫu DNA chuẩn do TS. Takehiro Kokuho (Viện Thú y Nhật Bản) cung cấp, đối chứng âm là mẫu hạch lâm ba từ lợn không nhiễm virus DTLCP hồi cứu từ nghiên cứu trước đây có nguồn gốc từ Nghệ An (2015). Đối với 2 mẫu xét nghiệm gồm hạch màng treo ruột và lách của lợn nghi mắc bệnh DTLCP, sản phẩm PCR cho vạch hơn 250 bp (257 bp theo thiết kế của mồi đặc hiệu), chứng tỏ mẫu xét nghiệm có chứa DNA của virus DTLCP.

Để xác định chính xác mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm virus DTLCP, chúng tôi tiến hành giải trình tự đoạn gen p72 sử dụng cặp mồi đặc hiệu



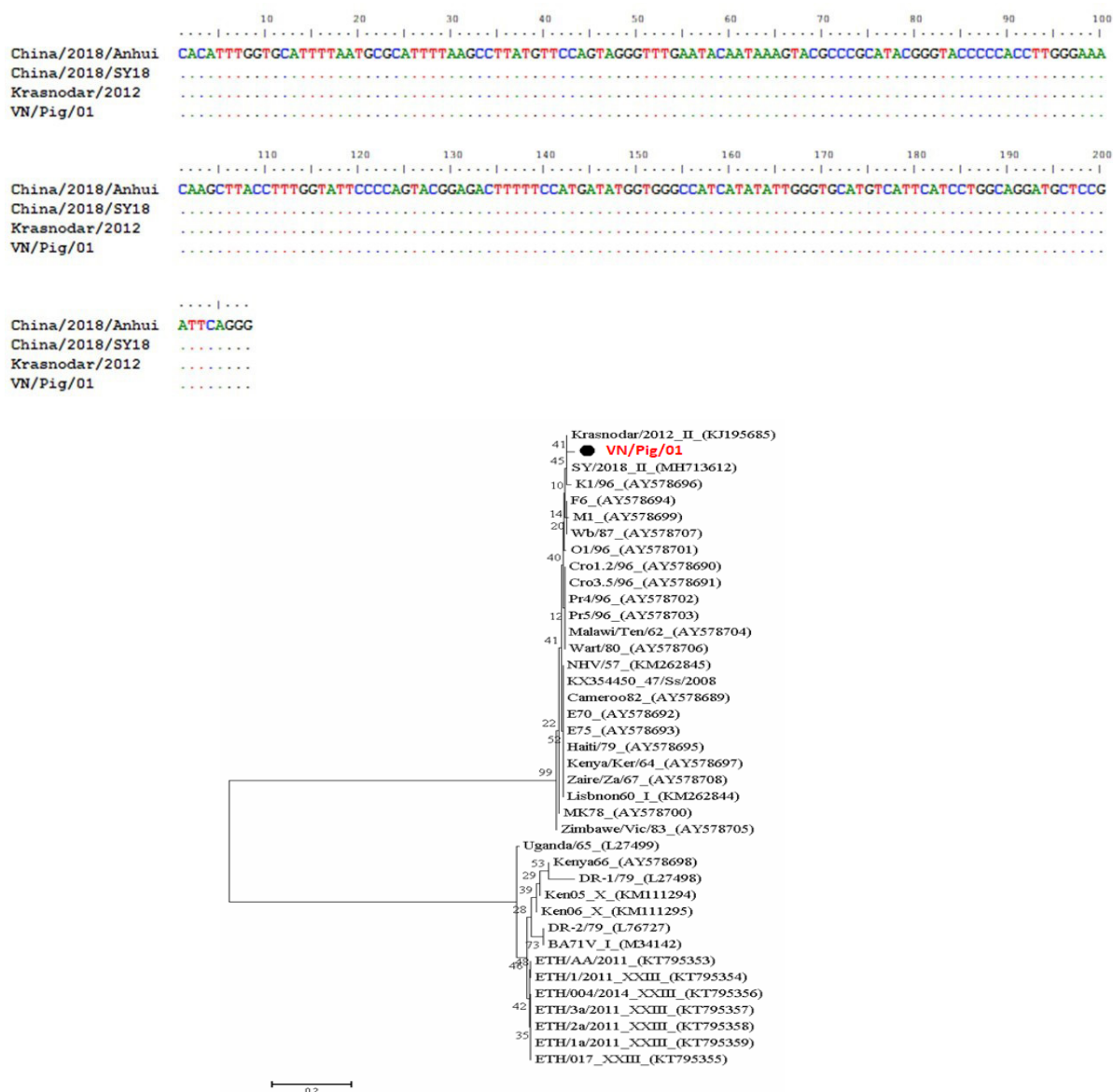
Hình 2. Kết quả phản ứng PCR truyền thống chẩn đoán mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm virus DTLCP với cặp mồi PPA1/PPA2

Giếng 1: DNA marker 50bp DNA ladder; Giếng 2: đối chứng dương DTLCP DNA chuẩn; Giếng 3: đối chứng âm tính (hạch lâm ba lợn không nhiễm DTLCP); Giếng 4-5 hạch màng treo ruột và lách lợn nghi nhiễm DTLCP

là PPA1 và PPA2. Kết quả giải trình tự gen virus DTLCP sử dụng cặp mồi đặc hiệu PPA1 và PPA2 được thể hiện qua hình 3. Qua phân tích trình tự nucleotide của virus DTLCP thu

thập từ thực địa cho thấy, trình tự nucleotide của các virus DTLCP ở Việt Nam có độ tương đồng rất cao (100%) với chủng virus DTLCP công bố lần đầu tiên tại Trung Quốc (ASFV-SY18) [13] và chủng Krasnodar 2012 của Nga phân lập năm 2012 [6]. Từ kết quả PCR và giải

trình tự gen, chúng tôi bước đầu kết luận mẫu bệnh phẩm lợn nhiễm virus DTLCP. Để xác định chắc chắn hơn, chúng tôi tiếp tục sử dụng phương pháp phân lập virus trên môi trường tế bào đại thực bào (PAM) theo khuyến cáo của OIE/FAO.

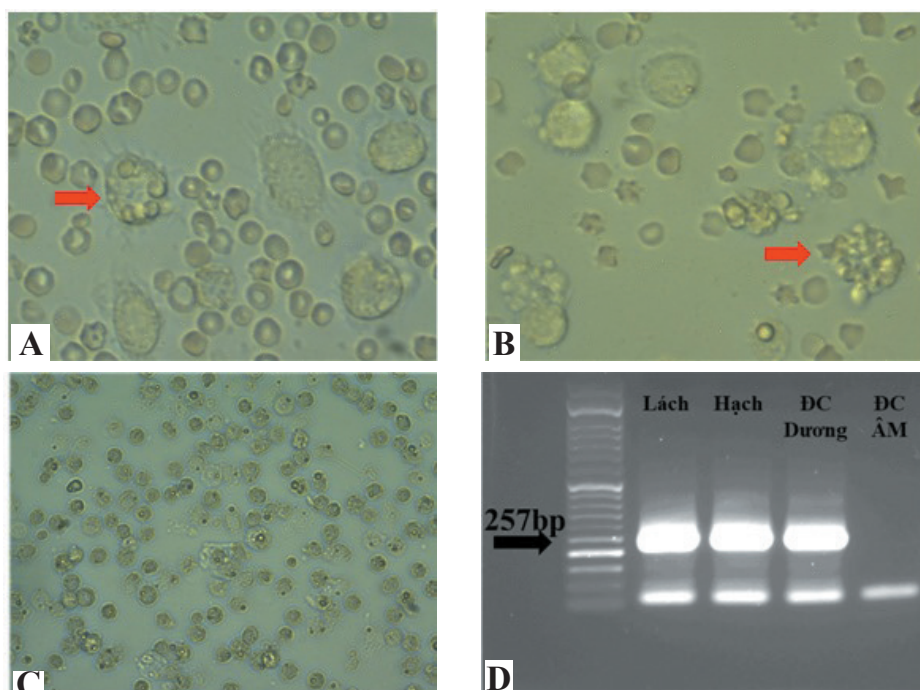


Hình 3. A. So sánh trình tự gen virus DTLCP từ mẫu bệnh phẩm sử dụng cặp mồi PPA1/PPA2 với các chủng tham chiếu China/2018/Anhui (MK128995), ASFV-SY18//China (MH713612) và Nga/Krasnodar/2012 (KJ195685). B. Cây phả hệ trình tự đoạn gen p72 được khuếch đại bởi cặp mồi PPA1 và PPA2

3.3. Phân lập virus DTLCP và phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD)

Phương pháp phân lập virus trên môi trường tế bào PAM và phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD) là phương pháp vàng để xác định chính xác lợn có nhiễm virus DTLCP hay không. Đây là phương

pháp cuối cùng được OIE/FAO khuyến cáo thực hiện để làm tham chiếu cho các kết quả dương tính với các phương pháp khác như: Ag-Elisa, PCR truyền thống, Realtime PCR, hoặc nhuộm hóa miễn dịch đã dùng trước đó, đặc biệt áp dụng phương pháp này trong trường hợp ổ dịch hay ca bệnh DTLCP đầu tiên.



Hình 4. A và B: Kết quả phân lập virus DTLCP trên môi trường tế bào PAM kết hợp phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD): Có nhiều tế bào hồng cầu bám vào trên bề mặt tế bào PAM bị nhiễm virus DTLCP (mũi tên); C: Đối chứng âm (môi trường tế bào PAM); D: Phản ứng PCR khẳng định phát hiện virus DTLCP phân lập trên tế bào PAM với cặp mồi PPA1/PPA2

Kết quả phân lập virus DTLCP kết hợp với phản ứng HAD từ mẫu bệnh phẩm thực địa được thể hiện trên hình 4 cho thấy, các tế bào PAM nhiễm virus DTLCP trên bề mặt có nhiều tế bào hồng cầu bám vào sau 5 ngày gây nhiễm. Đây là bệnh tích điển hình của virus DTLCP khi phân lập trên tế bào PAM kết hợp phản ứng HAD theo hướng dẫn của OIE và FAO. Những giống có kết quả HAD dương tính, chúng tôi tiến hành tách chiết DNA virus, và thực hiện kiểm tra bằng phản ứng PCR truyền thống theo quy trình được khuyến cáo bởi OIE/FAO. Kết quả kiểm tra mẫu phân lập bằng phương pháp PCR

truyền thống được thể hiện qua hình 4 cho thấy: Các mẫu phân lập đều cho kết quả PCR dương tính với virus DTLCP. Từ những kết quả thu được, chúng tôi đi đến kết luận, mẫu bệnh phẩm hạch, lách thu thập từ lợn tại thực địa dương tính với virus DTLCP và đây là lần đầu tiên tại Việt Nam thiết lập được hệ thống phân lập virus DTLCP sử dụng tế bào PAM kết hợp phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD).

IV. KẾT LUẬN

Từ những kết quả trên chúng tôi có một số kết luận sau:

- Phương pháp PCR truyền thống kết hợp giải trình tự gen là phương pháp có độ chính xác cao và phù hợp trong điều kiện Việt Nam để phát hiện sự có mặt của virus DTLCP trong mẫu bệnh phẩm thực địa

- Đã ứng dụng thành công hệ thống nuôi cấy tế bào đại thực bào (PAM) và phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD) dùng trong phân lập và chẩn đoán khẳng định sự có mặt của virus DTLCP từ mẫu bệnh phẩm, đặc biệt đối với ổ dịch DTLCP nguyên phát hay ca bệnh DTLCP đầu tiên.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn TS. Takehiro Kokuho và TS. Kohtaro Miyazawa, Viện Thú y Nhật Bản đã hỗ trợ trong việc thiết lập hệ thống nuôi cấy tế bào PAM tại Viện Thú y.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Carrascosa AL, Bustos MJ, and de Leon P. Methods for growing and titrating African swine fever virus: field and laboratory samples. Curr Protoc Cell Biol 2011, Chapter 26, Unit 26 14.
2. Cubillos C, Gomez-Sebastian S, Moreno N, Nunez MC, Mulumba-Mfumu LK, Quembo CJ, Heath L, Etter EM, Jori F, Escribano JM, and Blanco E. African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples. Virus Res 2013, 173, 159-167.
3. Galindo I, and Alonso C. African Swine Fever Virus: A Review. Viruses 2017, 9.
4. Gallardo C, Nieto R, Soler A, Pelayo V, Fernandez-Pinero J, Markowska-Daniel I, Pridotkas G, Nurmoja I, Granta R, Simon A, Perez C, Martin E, Fernandez-Pacheco P, and Arias M. Assessment of African Swine Fever Diagnostic Techniques as a Response to the Epidemic Outbreaks in Eastern European Union Countries: How To Improve Surveillance and Control Programs. J Clin Microbiol 2015, 53, 2555-2565.
5. Kamau E, Agoti CN, Lewa CS, Oketch J, Owor BE, Otieno GP, Bett A, Cane PA, and Nokes DJ. Recent sequence variation in probe binding site affected detection of respiratory syncytial virus group B by Realtime RT-PCR. J Clin Virol 2017, 88, 21-25.
6. Kolbasov D, Titov I, Tsybanov S, Gogin A, and Malogolovkin A. African Swine Fever Virus, Siberia, Russia, 2017. Emerg Infect Dis 2018, 24, 796-798.
7. OIE. African swine fever. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012, Chapter 281 2012.
8. Oura CA, Edwards L, and Batten CA. Virological diagnosis of African swine fever-comparative study of available tests. Virus Res 2013, 173, 150-158.
9. Quembo CJ, Jori F, Vosloo W, and Heath L. 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 2018, 65, 420-431.
10. Simulundu E, Sinkala Y, Chambaro HM, Chinyemba A, Banda F, Mooya LE, Ndebe J, Chitanga S, Makungu C, Munthali G, Fandamu P, Takada A, and Mweene AS. Genetic characterisation of African swine fever virus from 2017 outbreaks in Zambia: Identification of p72 genotype II variants in domestic pigs. Onderstepoort J Vet Res 2018, 85, e1-e5.
11. Suss B, Flekna G, Wagner M, and Hein I. Studying the effect of single mismatches in primer and probe binding regions on amplification curves and quantification in Realtime PCR. J Microbiol Methods 2009, 76, 316-319.
12. van Heerden J, Malan K, Gadaga BM, and Spargo RM. Reemergence of African Swine Fever in Zimbabwe, 2015. Emerg Infect Dis 2017, 23, 860-861.
13. Zhou X, Li N, Luo Y, Liu Y, Miao F, Chen T, Zhang S, Cao P, Li X, Tian K, Qiu HJ, and Hu R. Emergence of African Swine Fever in China, 2018. Transbound Emerg Dis 2018.
14. Zsak L, Borca MV, Risatti GR, Zsak A, French RA, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Callahan JD, Nelson WM, and Rock DL. Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a Realtime PCR assay. J Clin Microbiol 2005, 43, 112-119.

Ngày nhận 14-2-2019

Ngày phản biện 3-4-2019

Ngày đăng 1-5-2019