

# **XÁC ĐỊNH QUY TRÌNH REAL TIME RT-PCR VỚI CHẤT NHUỘM EVAGREEN ĐỊNH LƯỢNG VÀ ĐỊNH CHỦNG VIRUT GÂY HỘI CHỨNG RỐI LOẠN SINH SẢN VÀ HÔ HẤP TRÊN HEO**

**Võ Khánh Hưng<sup>(1)</sup>, Nguyễn Văn Chí<sup>(1)</sup>, Lê Nguyễn Ngọc Hạnh<sup>(2)</sup>,  
Trần Thị Dân<sup>(3)</sup>, Trần Thị Bích Liên<sup>(3)</sup>, Nguyễn Đình Quát<sup>(3)</sup>**

## **TÓM TẮT**

Hội chứng rối loạn sinh sản hô hấp trên heo (PRRS, bệnh tai xanh) do virus (PRRSV) gây nhiều thiệt hại kinh tế. PRRSV gồm 2 dòng, châu Âu (EU) và Bắc Mỹ (NA), trong đó có chủng Trung Quốc - một biến chủng từ dòng Bắc Mỹ. Trong nghiên cứu này, quy trình real time RT-PCR sử dụng chất phát huỳnh quang EvaGreen với cặp mồi F7 và R7 được thiết kế trên vùng ORF7 cho phép phân biệt dòng NA/EU và định lượng PRRSV. Toàn bộ vùng ORF7 của bộ gen PRRSV được gắn vào plasmid pGEM T Easy và chuyển vào tế bào chủ *E. coli* DH5 $\alpha$  để có mẫu DNA dùng trong tạo đường chuẩn định lượng của quy trình. Độ nhạy của quy trình real time RT-PCR được xác định là 10<sup>1</sup> bản sao/ $\mu$ l. Tính đặc hiệu của phản ứng được khẳng định với porcine circovirus (PCV) và mẫu máu âm tính với PRRSV. Quy trình có thể định dòng PRRSV châu Âu và dòng Bắc Mỹ dựa vào sự chênh lệch về nhiệt độ nóng chảy (Tm) khi phân tích đường cong nhiệt độ nóng chảy. Nhiệt độ Tm của sản phẩm khuếch đại dòng châu Âu là 83,4°C và dòng Bắc Mỹ là 84,4°C (CV = 0,08%, P < 0,01). Quy trình real time RT-PCR sử dụng EvaGreen cho kết quả nhanh, nhạy và chính xác trong định dòng và định lượng PRRSV; đã được áp dụng để phân biệt dòng cũng như định lượng PRRSV trên một số mẫu máu và mẫu ngoáy hầu họng heo từ một trại chăn nuôi công nghiệp.

Từ khóa: PRRSV, real time RT-PCR, Định chủng, Phân tích nhiệt độ nóng chảy, EvaGreen.

## **QUANTIFYING AND GENOTYPING OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS BY REAL-TIME RT-PCR USING EVAGREEN**

**Võ Khánh Hưng, Nguyễn Văn Chí, Lê Nguyễn Ngọc Hạnh,  
Trần Thị Dân, Trần Thị Bích Liên, Nguyễn Đình Quát**  
**SUMMARY**

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) caused by PRRSV is detrimental to economy. There are two types of PRRSV, being North American (NA) type and Europe (EU) type. EvaGreen-based real time RT-PCR protocol was established for quantifying and genotyping PRRS virus, in which F7 and R7 primers were designed on ORF7 of the virus. A standard curve used in the assay was created by a plasmid DNA template. The whole ORF7 of PRRSV genome was inserted into pGEM T Easy plasmid, then, cloned into *E. coli* DH5 $\alpha$ . The sensibility of the assay was 10<sup>1</sup> copies/ $\mu$ l. The specificity of the assay was confirmed by using PCV (porcine circovirus) and PRRSV-free blood of pig. Genotyping of EU PRRSV and US PRRSV was based on the difference of melt temperature (Tm) in melt curve analysis. The Tm of EU PRRSV amplicon was 83.4°C and that of US PRRSV amplicon was 84.4°C. The results showed that EvaGreen-based real time RT-PCR assay could offer quick, sensitive and accurate results for quantifying and genotyping PRRSV, which was used to determined genotypes and viral load of blood samples and swab from post weaning pigs.

Key words: PRRSV, Real time RT-PCR, Genotyping, Melting curve analysis, EvaGreen

---

<sup>(1)</sup> Bộ môn Công nghệ sinh học, Đại học Nông Lâm TP.HCM

<sup>(2)</sup> Sở NN và PTNT Đồng Nai

<sup>(3)</sup> Khoa chăn nuôi thú y, Đại học Nông Lâm TP.HCM

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (PRRS) là bệnh xảy ra trên heo với đặc điểm gây sảy thai ở heo nái và rối loạn hô hấp trên heo sơ sinh và heo choai (Christianson và cs, 1992). PRRS do 2 dòng virus gây bệnh ở Việt Nam : dòng Bắc Mỹ và dòng Châu Âu (Trần Thị Bích Liên và Trần Thị Dân, 2007). Đó là virus dạng sợi đơn, thẳng, vỏ bao. Hạt PRRSV có dạng hình cầu với đường kính khoảng 45 đến 65 nm đối với dòng châu Âu (Wensvoort và cs., 1991) và từ 48 đến 83 nm ở dòng Bắc Mỹ (Benfield và cs., 2006; Dea và cs, 2000). Bộ gen của virus PRRS chứa 9 khung đọc mở (ORF). ORF1a và ORF1b ghi mã glycoprotein không cấu trúc, trong khi ORF 2a, ORF2b và ORF 3 – 7 lần lượt mã hóa protein cấu trúc GP 2, E, GP3, GP4, GP5, protein màng và protein của nucleocapsid. Protein của nucleocapsid (14–15 kDa) được qui định bởi ORF7, là protein không glycosyl hoá, không chứa peptid tín hiệu (signal peptide), có 123 hay 128 acid amin (aa) tương ứng với 2 chủng của PRRSV: VR2332 (dòng Châu Mỹ) hay Lelystad (dòng châu Âu) (Mardassi và cs, 1996). Đây là vùng gen cho thấy sự khác biệt giữa dòng Bắc Mỹ và dòng châu Âu, vì vậy vùng gen này thường được dùng để phát triển các quy trình định chủng PRRSV.

Hiện nay, dịch bệnh PRRS đã xuất hiện tại nhiều tỉnh của Việt Nam và diễn biến phức tạp trong những năm gần đây. Do đó việc định lượng virus PRRS dòng Bắc Mỹ và châu Âu là vấn đề cần được thực hiện tại Việt Nam. Phương pháp realtime RT-PCR sử dụng chất nhuộm EvaGreen là phương pháp khá phổ biến trong định chủng và định lượng các tác nhân gây bệnh trên người và động vật khác (Pietila và cs., 2000). EvaGreen là chất nhuộm DNA thế hệ thứ 3, nhạy hơn và ổn định hơn so với SYBR Green I (Weijie Wang, 2006). Với phương pháp realtime sử dụng chất nhuộm, có thể định chủng khi dựa vào phân tích đường cong nhiệt độ nóng chảy của đoạn gen được khuếch đại (Ririe và cs., 1997). Phương pháp này có thể không mang tính đặc hiệu cao do phản ứng có thể khuếch đại những đoạn gen không mong muốn hoặc tình trạng nhị hợp của đoạn mồi (primer dimer) sẽ làm nhiễu kết quả định lượng. Tuy nhiên, đoạn mồi thiết kế đặc hiệu và quy trình tối ưu có thể hạn chế khuyết điểm này. Bên cạnh đó, việc biến đổi cao của bộ gen PRRSV (Nelsen và cs., 1999 ) là trở ngại cho việc phát triển các quy trình định tính và định lượng PRRSV ở các kỹ thuật realtime sử dụng mẫu dò (probe). Trong khi đó, kỹ thuật realtime PCR sử dụng thuốc nhuộm là một kỹ thuật định lượng có thể tránh được vấn đề trên. Do đó, nghiên cứu về quy trình realtime RT-PCR với EvaGreen đã được thực hiện để có một kỹ thuật xét nghiệm và định lượng nhanh, nhạy và chính xác ở Việt Nam.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Chủng vi rút PRRSV đối chứng dương

Mẫu vaccin nhược độc PRRSV IngelVac (dòng Bắc Mỹ của hãng Boehringer Ingelheim VET, Đức), vaccin nhược độc AmerVac (dòng PRRSV châu Âu của hãng Hipra, Tây Ban Nha sản xuất) và dịch nuôi cấy PRRSV dòng Bắc Mỹ chủng Trung Quốc độc lực cao trên môi trường tế bào MARC - 145 (do công ty Navetco cung cấp) được sử dụng như là các đối chứng dương cho việc xây dựng và đánh giá quy trình.

### Ly trích RNA

Các mẫu đối chứng dương và mẫu bệnh phẩm từ một trại heo được ly trích RNA bằng bộ kit QIAamp Viral RNA Mini Kit theo quy trình của nhà sản xuất.

### Xây dựng đường chuẩn cho phương pháp định lượng (standard curve)

Để xây dựng đường chuẩn định lượng cho phương pháp realtime RT-PCR, sử dụng DNA plasmid chứa đoạn gen ORF7 (từ vị trí 14524 đến 15183 trên bộ gen PRRSV), đây là vùng gen mà đoạn mồi cho phản ứng realtime được thiết kế. Nguồn cung cấp RNA để tạo DNA plasmid là virus vaccin nhược độc Ingelvac (dòng Bắc Mỹ), sử dụng đoạn mồi F7 5'-GTA CAT TCT GGC CCC TGC CC-3' (Suarez và c s, (1996) và R7: 5'-TCG CCC TAA TTG AAT AGG TG-3' (Mardassi và c s., 1994). Đoạn gen khuếch đại khoảng 660 nucleotid được gắn vào plasmid pGEM-T Easy Vector System (Promega) sau đó được chuyển vào tế bào khả nạp *E.coli* DH5 $\alpha$ . Khuẩn lạc *E.coli* DH5 $\alpha$  chứa plasmid

đã gắn đoạn gen đích, được chọn lọc trên môi trường LB bổ sung Xgal và Ampicillin (Sambrook, 2001). Plasmid được ly trích từ dịch nuôi cấy khuẩn lạc chọn lọc (kit Aurum<sup>TM</sup> Plasmid Mini Kit, Bio-Rad) và xác định nồng độ bằng cách đo OD, sau đó, được chuyển từ khối lượng thành số bản sao dựa trên kích thước của plasmid sau khi gắn gen đích 3655 bp (660 bp gen đích và 3,015 kb vector) với giả định rằng 650 g mol<sup>-1</sup> cho mỗi bp của DNA. Kết quả thu được dung dịch DNA plasmid đã gắn đoạn gen chèn có nồng độ là 8,1x10<sup>8</sup> bản sao/μl. Dung dịch DNA plasmid được pha loãng với hệ số 10 để xây dựng đường chuẩn cho phương pháp định lượng real time PCR chẩn đoán PRRSV.

#### **Đoạn môi và phản ứng realtime PCR sử dụng EvaGreen**

Môi F7 và R7 cho phản ứng realtime PCR theo Martinez và cs, 2007. Trình tự môi và vị trí bắt cặp trên vùng ORF7 (bảng 1), vùng gen được khuếch đại bởi môi F7 và R7 có chênh lệch 9 nucleotid giữa dòng Bắc Mỹ (301 bp) và dòng châu Âu (292 bp) do sự thêm mất nucleotid trong vùng này của 2 dòng PRRSV. Sự khác biệt trình tự và chênh lệch nucleotid của sản phẩm tạo thành sau phản ứng realtime PCR là cơ sở để phân biệt 2 dòng này dựa vào phân tích nhiệt độ nóng chảy.

**Bảng 1. Vị trí đoạn môi F7 và R7 trên bộ gen PRRSV và sản phẩm PCR**

| Chủng   | Cặp môi   | Vị trí           | Chiều dài |
|---------|-----------|------------------|-----------|
| Châu Âu | Môi xuôi  | nt 14657 – 14678 | 292 bp    |
|         | Môi ngược | nt 14928 – 14948 |           |
| Bắc Mỹ  | Môi xuôi  | nt 14936 – 14956 | 301 bp    |
|         | Môi ngược | nt 15217 – 15236 |           |

Phản ứng real time RT-PCR 2 bước được thực hiện bằng High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, USA) cho phản ứng phiên mã ngược từ RNA sang cDNA, và SsoFast EvaGreen Supermix cho phản ứng real time PCR (trên hệ thống Real time PCR CFX96). Trong bước phiên mã ngược RNA sang cDNA, sử dụng 15 μl RNA ly trích và 5 μl High Capacity RNA-to-cDNA mix, với quy trình nhiệt gồm 50°C trong 30 phút, 95°C trong 15 phút. Với phản ứng realtime PCR, dùng 5 μl sản phẩm phiên mã ngược và 0,5 μl môi F7 và R7 (20 μM) trong thể tích cuối 25 μl; và chu trình nhiệt gồm 95°C trong 3 phút; 40 chu kỳ lặp lại 94°C trong 15 giây, 60°C trong 5 giây. Những dòng PRRSV EU (vacxin AmerVac) và PRRSV US (vacxin IngelVac) được dùng như đối chứng trong mỗi thí nghiệm. Để định dòng, phân tích đường cong nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm sau phản ứng realtime PCR; T<sub>m</sub> của PRRSV EU và PRRSV US được ghi nhận và so sánh, từ đó xác định sự khác biệt nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm sau phản ứng realtime PCR.

#### **Áp dụng quy trình trên mẫu thực địa**

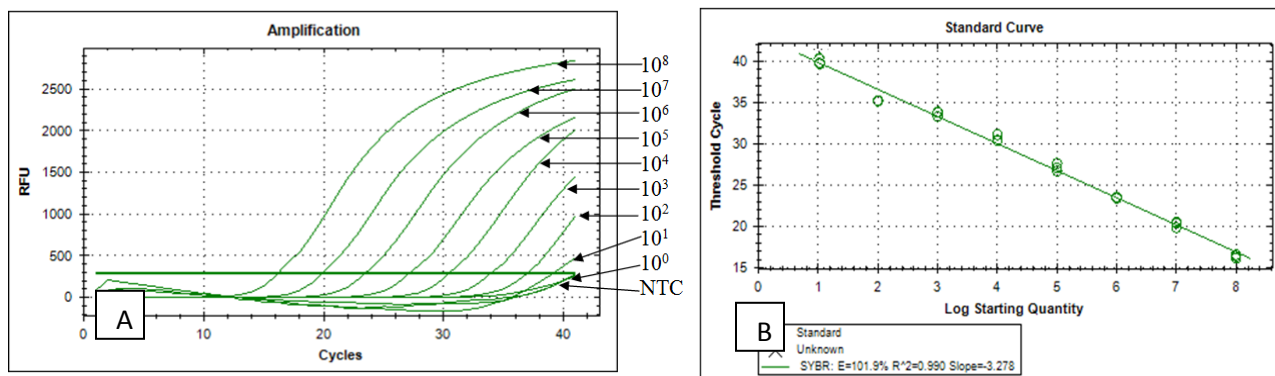
Tổng cộng 16 mẫu máu và 4 mẫu ngoáy hầu họng (từ những heo đã lấy máu) được định dòng và định lượng PRRSV. Đây là heo con sau cai sữa có đáng về khoẻ mạnh và không chủng ngừa PRRS tại một trại chăn nuôi heo công nghiệp

### **III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

#### **3.1 Độ nhạy và độ tin cậy của phương pháp real time RT-PCR định lượng PRRSV**

DNA plasmid được xác định số lượng bản sao dựa vào khối lượng phân tử, được dùng như đường chuẩn định lượng. DNA plasmid được pha loãng theo hệ số 10 từ 10<sup>8</sup> đến 10<sup>0</sup> bản sao/μl nhằm xác định giới hạn phát hiện của phản ứng. Mỗi độ pha loãng được chạy lặp lại 3 lần để xác định hệ số biến động của phản ứng. Kết quả real time RT-PCR cho thấy đường cong khuếch đại có giá trị Ct cao. Chu kỳ ngưỡng nồng độ DNA plasmid thấp nhất cho tín hiệu dương tính (Ct<40) là 10<sup>1</sup> bản sao/μl với Ct là 39. Điều này chứng tỏ giới hạn phát hiện của quy trình là 10<sup>1</sup> bản sao trong một phản ứng. Bên cạnh đó, độ tin cậy của quy trình cao với hệ số biến động (CV) thấp (0,354 - 2,042%). Độ nhạy và kết quả định lượng chính xác còn được khẳng định thông qua đường chuẩn (standard curve), đó là đường thẳng tuyến tính biểu diễn mối tương quan giữa chu kỳ ngưỡng Ct với lượng bản sao đích ban đầu trong từng nồng độ mẫu chuẩn. Đường chuẩn định lượng thu được (hình 1B) xây dựng từ giá trị Ct của từng mẫu chuẩn pha loãng ở các nồng độ 10<sup>1</sup> đến 10<sup>8</sup>. Hệ số tương quan 0,99 và hệ số góc của

đường chuẩn định lượng là 3,278, hiệu suất khuếch đại (E) là 101,9%; điều này cho thấy quy trình định lượng đạt hiệu quả cao.



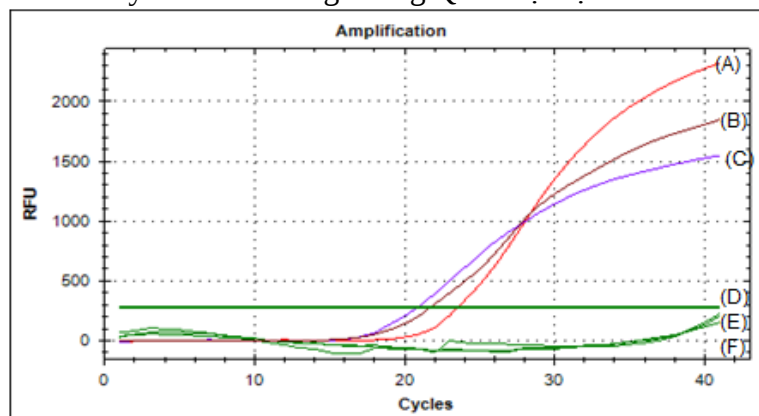
**Hình 1. Đường chuẩn định lượng của phương pháp realtime RT-PCR chẩn đoán PRRSV.**

A. Xác định độ nhạy của phản ứng realtime RT-PCR chẩn đoán PRRSV với các mẫu  $10^8$ - $10^0$  copy/ $\mu$ l.

B. Đường chuẩn định lượng tính theo mẫu  $\log_{10}$  copy/ $\mu$ l với chu kỳ ngưỡng ( $C_t$ ) tương ứng, quan hệ tuyến tính được xây dựng với mẫu  $10^6$ - $10^1$  copy/ $\mu$ l.

### 3.2 Tính đặc hiệu của phản ứng real time RT-PCR định lượng PRRSV

Để kiểm tra tính đặc hiệu của phản ứng, thực hiện phản ứng real time RT-PCR với mẫu dương tính PCV và âm tính với PRRSV (được xác định bằng phương pháp PCR), mẫu dương tính với PCV (xác định bằng phương pháp PCR theo McIntosh, 2008), mẫu máu âm tính với PRRSV, được tiến hành đồng thời với mẫu PRRSV dòng Bắc Mỹ (vacxin nhược độc Igelvac), dòng châu Âu (vacxin nhược độc AmerVac) và dịch nuôi cấy PRRSV chủng Trung Quốc độc lực cao trên tế bào MARC - 145.



**Hình 2. Biểu đồ tín hiệu của phản ứng realtime PCR sử dụng Evagreen định dòng và định lượng PRRSV khuếch đại mẫu PCV dương tính.**

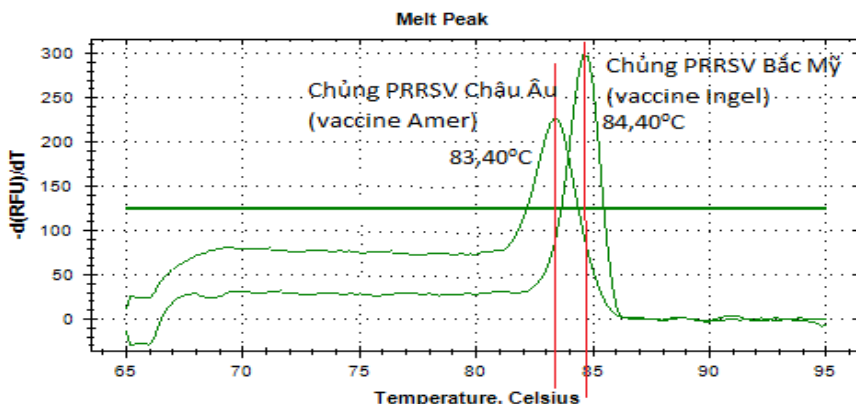
(A) PRRSV châu Âu (vacxin AmerVac), (B) PRRSV Bắc Mỹ (IngelVac), (C) PRRSV chủng Trung Quốc độc lực cao, (D) PCV, (E) mẫu máu âm tính với PRRSV, (F) mẫu nước sạch.

Hình 2 cho thấy, quy trình cho tín hiệu dương tính với PRRSV dòng Bắc Mỹ, châu Âu và chủng Trung Quốc độc lực cao, trong khi đó, không cho tín hiệu ở mẫu PCV, mẫu máu âm tính với PRRSV và mẫu nước sạch. Điều này chứng tỏ quy trình định lượng PRRSV có tính đặc hiệu cao khi dùng cặp môi F7 và R7.

### 3.3 Định dòng PRRSV châu Âu và PRRSV Bắc Mỹ dựa vào phân tích đường cong nhiệt độ nóng chảy

Sự chênh lệch về chiều dài và thành phần nucleotid của sản phẩm khuếch đại giữa dòng châu Âu và Bắc Mỹ dẫn đến nhiệt độ  $T_m$  khác nhau. Đây là cơ sở để định chủng dựa vào phân tích nhiệt độ

nóng chảy sau phản ứng realtime PCR. Phân tích đường cong nhiệt độ nóng chảy cũng giúp đánh giá tính đặc hiệu sản phẩm (không có sản phẩm phụ) khi dựa vào đỉnh của đường biểu diễn nhiệt độ nóng chảy.



**Hình 3. Biểu đồ phân tích đường cong nhiệt độ nóng chảy**  
thể hiện sự khác nhau về  $T_m$  giữa hai dòng. PRRSV châu Âu là 83,4°C, PRRSV Bắc Mỹ là 84,4°C.

Hình 3 cho thấy đường biểu diễn đường cong nhiệt độ nóng chảy của PRRSV châu Âu và Bắc Mỹ có 2 đỉnh phân biệt cách nhau khoảng 1°C. Nhiệt độ nóng chảy đối với PRRSV châu Âu là 83,4°C, với PRRSV Bắc Mỹ là 84,6°C, và chủng PRRSV Trung Quốc (Pos TQ) là 84,5°C ở 3 lần lặp lại (bảng 2). Sự khác biệt này là có ý nghĩa giữa các chủng với  $CV = 0,08\%$ ,  $P < 0,01$ . Điều này cho thấy mặc dù phần trăm nucleotid CG của PRRSV châu Âu (53,7%) lớn hơn so với PRRSV Bắc Mỹ (51,4%), nhưng do sự chênh lệch chiều dài sản phẩm khuếch đại (PRRSV châu Âu là 292 bp so với PRRSV Bắc Mỹ là 301 bp) làm cho đỉnh đường cong nhiệt độ nóng chảy của PRRSV châu Âu thấp hơn so với PRRSV Bắc Mỹ. Dựa vào kết quả trên, quy trình real time RT-PCR sử dụng EvaGreen có thể phân biệt PRRSV châu Âu và Bắc Mỹ.

**Bảng 2. Nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm khuếch đại từ phản ứng realtime PCR**

| Mẫu      | Nhiệt độ nóng chảy (°C) |       |       |                     |
|----------|-------------------------|-------|-------|---------------------|
|          | Lần 1                   | Lần 2 | Lần 3 | Trung bình          |
| AmerVac  | 83,4                    | 83,4  | 83,4  | 83,4 <sup>b</sup>   |
| IngelVac | 84,6                    | 84,6  | 84,8  | 84,66 <sup>a</sup>  |
| Pos TQ   | 84,6                    | 84,4  | 84,4  | 84,47 <sup>ab</sup> |

<sup>ab</sup> Sai khác thống kê ở  $P < 0,05$

Pos TQ: chủng Trung Quốc đối chứng

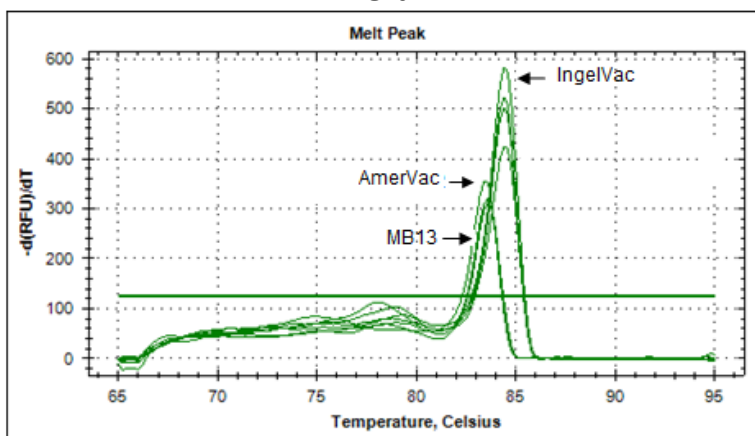
### 3.4 Ứng dụng real time RT-PCR định dòng và định lượng PRRSV trong mẫu thực địa

Kết quả định lượng mẫu vacxin IngelVac, vacxin AmerVac và mẫu dịch nuôi cấy PRRSV trên môi trường tế bào MARC - 145 cho thấy số lượng PRRSV khá cao (số liệu không công bố). Tám mẫu máu MA61, MA62, MA11, MA12, MA61, MA62, MB11, MB13 nhiễm PRRSV với số bản sao ban đầu khoảng  $1,5 \times 10^3$  đến  $1,16 \times 10^4$  bản sao/ml máu. Các mẫu ngoáy hầu họng mặc dù được lấy cùng lúc với mẫu máu trên cùng một heo nhưng giá trị Ct nằm dưới giới hạn phát hiện của quy trình. Do đó, khả năng phát hiện PRRSV của các mẫu máu cao hơn hẳn so với các mẫu ngoáy (hình 4 và bảng 3).

Dựa vào kết quả định chủng của quy trình real time RT-PCR vừa xây dựng, virus đối chứng dương từ vacxin AmerVac (PRRSV châu Âu) xuất hiện đỉnh  $T_m = 83,4^\circ\text{C}$  và từ vacxin

IngelVac (PRRSV Bắc Mỹ) xuất hiện đỉnh  $T_m = 84,4^{\circ}\text{C}$ . Đường cong nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm khuếch đại các mẫu thực địa dương tính đều xuất hiện đỉnh ở nhiệt độ trùng với nhiệt độ nóng chảy của đối chứng dương. Bốn mẫu dịch ngoáy hầu họng là các mẫu âm tính hoặc dưới ngưỡng phát hiện vì đồ thị biểu diễn đường cong nhiệt độ nóng chảy của các mẫu này không có các đỉnh nhiệt độ nóng chảy đặc trưng cho sản phẩm khuếch đại. Mẫu máu MB13 có nhiệt độ nóng chảy là  $83,4^{\circ}\text{C}$ , được xác định là PRRSV châu Âu. Bảy mẫu máu còn lại có nhiệt độ nóng chảy lần lượt trong khoảng  $84,4^{\circ}\text{C} (\pm 0,2)$ , xác định là PRRSV Bắc Mỹ.

Kết quả này cũng chứng tỏ hiệu lực và quy trình phản ứng PCR được thiết kế tại phòng thí nghiệm có chất lượng tốt, tính đặc hiệu cao. Tuy nhiên để có một kết quả chính xác thì phương pháp giải trình tự cần được thực hiện để kiểm chứng và đánh giá tính đặc hiệu dựa trên kết quả real time RT-PCR với một số virus gây bệnh khác.



**Hình 4. Đường cong nhiệt độ nóng chảy của PRRSV từ máu và mẫu ngoáy hầu họng heo xét nghiệm**

(AmerVac và Ingelvac là đối chứng dương, MB13 là mẫu máu nhiễm PRRSV chủng châu Âu, tên của các mẫu máu và mẫu ngoáy còn lại không ghi trên hình vì các đường kết quả nằm sát nhau)

**Bảng 3. Nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm khuếch đại từ các mẫu xét nghiệm**

| Mẫu      | Nhiệt độ nóng chảy ( $^{\circ}\text{C}$ ) |       |       |                      |
|----------|-------------------------------------------|-------|-------|----------------------|
|          | Lần 1                                     | Lần 2 | Lần 3 | Trung bình           |
| $10^8$   | 84,6                                      | 84,4  | 84,4  | 84,467 <sup>ab</sup> |
| $10^7$   | 84,4                                      | 84,4  | 84,4  | 84,4 <sup>bc</sup>   |
| $10^6$   | 84,4                                      | 84,4  | 84,4  | 84,4 <sup>bc</sup>   |
| $10^5$   | 84,4                                      | 84,4  | 84,4  | 84,4 <sup>bc</sup>   |
| $10^4$   | 84,4                                      | 84,4  | 84,4  | 84,4 <sup>bc</sup>   |
| $10^3$   | 84,4                                      | 84,4  | 84,4  | 84,4 <sup>bc</sup>   |
| $10^2$   | 84,4                                      | 84,4  | 84,4  | 84,4 <sup>bc</sup>   |
| MA61     | 84,6                                      | 84,6  | 84,6  | 84,6 <sup>a</sup>    |
| MA62     | 84,6                                      | 84,6  | 84,6  | 84,6 <sup>a</sup>    |
| MB32     | 84,6                                      | 84,6  | 84,6  | 84,53 <sup>ab</sup>  |
| MB33     | 84,2                                      | 84,2  | 84,2  | 84,2 <sup>c</sup>    |
| MA11     | 84,4                                      | 84,4  | 84,4  | 84,4 <sup>bc</sup>   |
| MA13     | 84,4                                      | 84,2  | 84,2  | 84,26 <sup>c</sup>   |
| MB11     | 84,4                                      | 84,4  | 84,4  | 84,4 <sup>bc</sup>   |
| MB13     | 83,4                                      | 83,6  | 83,6  | 83,53 <sup>d</sup>   |
| AmerVac  | 83,4                                      | 83,4  | 83,4  | 83,4 <sup>d</sup>    |
| IngelVac | 84,6                                      | 84,6  | 84,8  | 84,66 <sup>a</sup>   |
| Pos TQ   | 84,6                                      | 84,4  | 84,4  | 84,47 <sup>ab</sup>  |

$10^8$  đến  $10^2$  : các mức pha loãng của DNA đường chuẩn  
MA61 đến MB13: các mẫu máu heo sau cai sữa  
Pos NA: dịch nuôi cấy dòng Bắc Mỹ  
<sup>a, b, c</sup>: khác biệt ở  $P < 0,05$

#### IV KẾT LUẬN

Đã xây dựng thành công quy trình real time RT-PCR sử dụng EvaGreen định lượng và định dòng PRRSV. Giới hạn phát hiện của phương pháp xây dựng được là  $10^1$  bản sao trong một phản ứng, đáp ứng nhu cầu định lượng. Tính đặc hiệu của phản ứng đã được khẳng định với PCV (porcine circovirus). Phân biệt được hai dòng PRRSV dựa vào phân tích đường cong nhiệt độ nóng chảy sau khi thực hiện phản ứng real time RT-PCR. Nhiệt độ T<sub>m</sub> của sản phẩm khuếch đại PRRSV châu Âu là 83,4°C và PRRSV Bắc Mỹ là 84,4°C. Kết quả cho thấy đa số các mẫu máu nhiễm PRRSV Bắc Mỹ với số lượng bản sao không cao. Lượng PRRSV hiện diện trong mẫu máu nhiều hơn so với mẫu ngoáy hầu họng khi thực hiện trên các mẫu từ heo 4 – 8 tuần tuổi.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Benfield D.A, Zimmerman J., Murtaugh M.P., Osorio F., Stevenson G.W., Torremorell M.. 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Porcine Arterivirus). In Diseases of swine, 9<sup>th</sup> edition. 387 - 417.
2. Christianson WT, Collins JE, Benfield DA, Harris L, Gorcyca DE, Chladek DW, Morrison RB, Joo HS. 1992. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am. J. Vet. Res.* 53: 485-488.
3. Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, Pirzadeh B, Rogan D. 2000. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch. Virol.* 145: 659–688.
4. Mardassi, H., S. Mounir, and S. Dea. 1994. Identification of major differences in the nucleocapsid genes of a Quebec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol* 75: 681–685.
5. Martínez E., Riera P., Sitja M., Fang Y., Oliveira S., Maldonado J. 2008. Simultaneous detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. *Research in Veterinary Science* 85: 184–193.
6. Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T., 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245: 154–160.
7. Suarez P., Zardoya R., Martin M.J., Prieto C., Dopazo J., Solana A., Castro J.M. 1996. Phylogenetic relationships of european strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Research* 42: 159–165.
8. Trần Thị Bích Liên và Trần Thị Dân. 2007. Xác định tỷ lệ nhiễm và chủng vi-rút PRRS tại một số cơ sở chăn nuôi heo miền Đông Nam Bộ. *Tạp chí KHKT Thú y* tập XIV - số 6: 5-9.
9. Weijie Wang, Kunsong Chen, Changjie Xu, 2006. DNA quantification using EvaGreen and a real-time PCR instrument. *Analytical Biochemistry* 356: 303–305