

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ KHÁNG VIRUS DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI BẰNG PHƯƠNG PHÁP ELISA

Vũ Đức Hạnh¹, Vũ Lại Xuân Hiệp², Lương Quốc Hưng², Nguyễn Thị Minh Phương¹,
Nguyễn Thị Hoa¹, Dương Nhật Huy³, Bùi Minh Huy¹, Đặng Thị Thuỳ Linh¹,
Nguyễn Thị Phương Đông¹, Phạm Hồng Trang¹, Nguyễn Văn Giáp¹, Lại Thị Lan Hương^{1*}

¹Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Nebraska Center for Virology, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE 68583, USA

³Công ty cổ phần Hưng Gia Nam

*Tác giả liên hệ: laitluong@gmail.com

Ngày nhận bài: 14.11.2025

Ngày chấp nhận đăng: 09.03.2026

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá khả năng phát hiện kháng thể kháng virus Dịch tả lợn châu Phi của phương pháp iELISA, sử dụng protein tái tổ hợp p30 làm kháng nguyên phủ, trên nền mẫu huyết thanh và dịch miệng. Tổng cộng 84 mẫu cặp (mỗi cặp gồm huyết thanh và dịch miệng của cùng một cá thể) đã được thu thập, bao gồm 26 mẫu âm tính và 58 mẫu lấy từ các đàn mắc Dịch tả lợn châu Phi (25 mẫu cấp tính và 33 mẫu mạn tính). Kết quả đánh giá cho thấy phương pháp iELISA đạt độ đặc hiệu chẩn đoán 100% trên cả nền mẫu huyết thanh và dịch miệng, không ghi nhận phản ứng chéo hay dương tính giả. Khi so sánh với kit ELISA tham chiếu thương mại (Ingezim PPA Compac), phương pháp iELISA thể hiện sự đồng thuận cao trên mẫu huyết thanh với tỷ lệ 90,47% và hệ số Cohen's Kappa đạt 0,81. Đối chiếu trên cùng cá thể, hàm lượng kháng thể trong dịch miệng có tương quan tuyến tính thuận với huyết thanh ($r = 0,765$, $P < 0,001$) và có mức độ đồng thuận chẩn đoán đáng kể (Kappa = 0,73). Hơn thế, phương pháp iELISA trên cả hai nền mẫu đều phản ánh xu hướng biến đổi đáp ứng miễn dịch theo giai đoạn bệnh thông qua sự gia tăng giá trị S/P từ giai đoạn cấp tính sang mạn tính.

Từ khóa: Dịch tả lợn châu Phi, ELISA, huyết thanh, dịch miệng.

Evaluation of the Ability to Detect Antibodies Against African Swine Fever Virus by the Elisa Method

ABSTRACT

The present study was conducted to evaluate the ability of indirect ELISA (iELISA) method to detect antibodies against African Swine Fever Virus (ASFV) using recombinant p30 protein as the coating antigen in serum and oral fluid samples. A total of 84 paired samples (each pair consisting of serum and oral fluid collected from the same individual) were obtained, including 26 negative samples and 58 samples collected from ASF-affected herds (25 acute and 33 chronic cases). The evaluation results showed that the iELISA method achieved a diagnostic specificity of 100% for both serum and oral fluid samples without cross-reactivity or false-positive results observed. When compared with the commercial reference ELISA kit (Ingezim PPA Compac), the iELISA demonstrated high agreement in serum samples, with a concordance rate of 90.47% and a Cohen's Kappa coefficient of 0.81. When comparing paired samples from the same individual, antibody levels in oral fluid showed a strong positive linear correlation with those in serum ($r = 0.765$, $P < 0.001$), along with substantial diagnostic agreement (Kappa = 0.73). Moreover, the iELISA method in both sample matrices reflected the trend of immune response dynamics across disease stages, as indicated by an increase in S/P values from the acute to the chronic phase.

Keywords: African swine fever, in direct ELISA, serum, oral fluid.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Dịch tả lợn châu Phi (DTLCP) là một trong những bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi lợn toàn cầu (Revilla & cs., 2018). Đặc điểm lâm sàng của bệnh phụ thuộc vào độc lực của chủng virus thực địa và khả năng đáp ứng miễn dịch của vật chủ, dao động từ thể cấp tính với tỷ lệ tử vong lên đến 95-100%, cho đến thể á cấp tính, mạn tính hoặc mang trùng kéo dài (Gallardo & cs., 2015). Do đó, để kiểm soát hiệu quả sự lưu hành của virus, việc triển khai các chương trình giám sát dịch tễ rộng khắp là yêu cầu cấp thiết.

Hiện nay, chẩn đoán phát hiện virus DTLCP ở giai đoạn cấp tính chủ yếu dựa vào các kỹ thuật sinh học phân tử như Real-time PCR nhắm vào gen B646L mã hóa protein cấu trúc p72 (Tignon & cs., 2011). Mặc dù có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, real-time PCR đòi hỏi hệ thống thiết bị chuyên dụng, nhân sự được đào tạo bài bản và chi phí vận hành lớn, gây khó khăn cho việc tầm soát dịch tễ quy mô lớn tại các trang trại hay khu vực có nguồn lực hạn chế. Ngược lại, xét nghiệm huyết thanh học bằng phương pháp ELISA phát hiện kháng thể đặc hiệu là công cụ tối ưu cho mục đích sàng lọc quần thể, đặc biệt hiệu quả trong việc phát hiện lợn mắc bệnh ở giai đoạn cận lâm sàng và mạn tính (Sánchez-Vizcaíno & Mur, 2013; Sánchez-Vizcaíno & cs., 2015).

Tại Việt Nam, các công bố giám sát lưu hành virus DTLCP trong thời gian qua hầu hết chỉ tập trung vào kỹ thuật sinh học phân tử và giải trình tự gen (Van Phan Le & cs., 2019; Nga & cs., 2020; Tran & cs., 2020; Truong & cs., 2020). Khoảng trống dữ liệu về đánh giá lưu hành kháng thể quy mô đàn vẫn chưa được giải quyết triệt để. Xuất phát từ thực tiễn trên, nghiên cứu “Đánh giá khả năng phát hiện kháng thể kháng virus Dịch tả lợn châu Phi bằng phương pháp ELISA” được thực hiện nhằm hai mục tiêu chính: (1) Đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp iELISA sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp p30 và (2) Khảo sát

tính khả thi, mức độ đồng thuận giữa mẫu huyết thanh và mẫu dịch xoang miệng thu thập từ các quần thể lợn âm tính, cấp tính và mạn tính tại một số tỉnh miền Bắc.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Thiết kế nghiên cứu và mẫu xét nghiệm

Nghiên cứu sử dụng tổng cộng 84 mẫu cặp (mỗi cặp gồm mẫu máu và mẫu dịch miệng thu thập trên cùng một cá thể lợn). Thời gian thu thập mẫu từ tháng 01/2021 đến tháng 12/2021. Mẫu được phân loại dựa trên tình trạng nhiễm virus DTLCP thực địa, bao gồm:

(1) Nhóm lợn âm tính ($n = 26$) được thu thập tại các hộ chăn nuôi và trang trại thuộc ba tỉnh Yên Bái, Hòa Bình và Thái Bình.

(2) Nhóm lợn dương tính: Lấy từ các ổ dịch DTLCP, được chia thành hai giai đoạn lâm sàng: Cấp tính (đang mắc, $n = 25$) và mạn tính (đã mắc/sống sót sau dịch, $n = 33$). Mẫu được thu thập tại các trang trại thuộc các tỉnh Hưng Yên, Hà Nội, Thái Bình, Thanh Hoá, Ninh Bình, Hải Dương, Hà Nam, Nam Định,... (theo địa danh hành chính cũ).

Ngoại trừ vaccin phòng bệnh DTLCP, lợn ở tất cả các nhóm đều đã được tiêm phòng đầy đủ các loại vaccin phòng bệnh phổ biến ở lợn (Lở mồm long móng, Tai xanh, Dịch tả lợn cổ điển,...).

2.1.2. Kit phát hiện virus và kháng thể kháng virus DTLCP

- Kit test nhanh virus DTLCP: Ingezim ASF CROM Ag (Ingenasa, 11.ASF.K42).
- Kit ELISA thương mại: Ingezim PPA Compac (Ingenasa, R.11.PPA.K3).
- Kit iELISA thử nghiệm: Innoceleris ASFV ELISA.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Lấy mẫu

Mẫu huyết thanh: Máu được thu từ vịnh tĩnh mạch cổ lợn bằng xy lanh vô trùng 10ml,

với thể tích mỗi mẫu khoảng 5-6ml. Sau khi lấy mẫu, máu được giữ nguyên trong xy lanh và đặt nghiêng ở nhiệt độ thường trong 30 phút để đông tự nhiên. Máu đông được ly tâm để loại bỏ tế bào máu, chất huyết thanh sang ống Eppendorf 1,5ml vô trùng.

Mẫu dịch miệng: que lấy mẫu vô trùng được chuẩn bị bằng cách se bông thấm hút (100% cotton) vào đầu que gỗ, tạo đầu bông đường kính khoảng 1cm. Đưa que lấy mẫu vào miệng và chà trong khoang miệng, vùng amidan 5-6 lần. Đầu bông chứa dịch miệng được chuyển vào ống chứa 1,5ml dung dịch đệm PBS (pH 7,4). Tại phòng thí nghiệm, đầu bông được chuyển vào túi zip, ép lấy dịch. Hỗn dịch sau đó được ly tâm $900 \times g$ trong 10 phút để loại bỏ cặn và phần dịch nổi được thu để xét nghiệm.

Toàn bộ mẫu được bảo quản trong thùng bảo ôn trong quá trình vận chuyển. Sau khi xử lý, mẫu được bảo quản ở -80°C cho đến khi xét nghiệm.

2.2.2. Phát hiện virus DTLCP

Bộ kit test nhanh Ingezim ASF CROM Ag được sử dụng để phát hiện kháng nguyên virus DTLCP ở mẫu máu chống đông và mẫu dịch miệng. Các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.3. Phát hiện kháng thể kháng virus DTLCP bằng kit ELISA tham chiếu

Kit blocking ELISA thương mại Ingezim PPA Compact được dùng để phát hiện kháng thể kháng protein p72 của virus DTLCP trong mẫu huyết thanh. Mẫu huyết thanh được pha loãng 1/100 trong dung dịch pha loãng và thực hiện phản ứng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Giá trị OD của phản ứng ELISA được đo tại bước sóng 450nm. Phản ứng blocking ELISA được đánh giá hợp lệ nếu $OD_{\text{đối chứng âm}} \geq 4 \times OD_{\text{đối chứng dương}}$. Tỷ lệ phần trăm blocking (X%) được tính theo công thức: $X\% = [(OD_{\text{đối chứng âm}} - OD_{\text{mẫu}}) / (OD_{\text{đối chứng âm}} - OD_{\text{đối chứng dương}})] \times 100$. Mẫu được coi là dương tính khi tỷ lệ phần trăm ức chế (X%) $\geq 50\%$, âm tính khi $X\% \leq 40\%$ và nghi ngờ khi $40\% < X\% < 50\%$.

2.2.4. Phát hiện kháng thể kháng virus DTLCP bằng kit iELISA

Kit iELISA sử dụng protein tái tổ hợp p30 để làm kháng nguyên phát hiện kháng thể kháng virus DTLCP trong mẫu huyết thanh và mẫu dịch miệng (Gimenez-Lirola & cs., 2016). Mẫu huyết thanh được pha loãng 1/100 và mẫu dịch miệng được pha loãng 1/2 trước khi thực hiện xét nghiệm. Thực hiện phản ứng theo quy trình mô tả của Schambow & cs. (2023). Giá trị OD của phản ứng ELISA được đo tại bước sóng 450nm. Phản ứng iELISA được đánh giá hợp lệ nếu $OD_{\text{đối chứng âm}} < 0,2$ và $OD_{\text{đối chứng dương}} > 0,6$. Giá trị S/P được tính theo công thức: $S/P = (OD_{\text{mẫu}} - OD_{\text{đối chứng âm}}) / (OD_{\text{đối chứng dương}} - OD_{\text{đối chứng âm}})$. Mẫu huyết thanh được coi là dương tính khi $S/P \geq 1$, âm tính khi $S/P < 1$. Mẫu dịch miệng được coi là dương tính khi $S/P \geq 0,5$, âm tính khi $S/P < 0,5$.

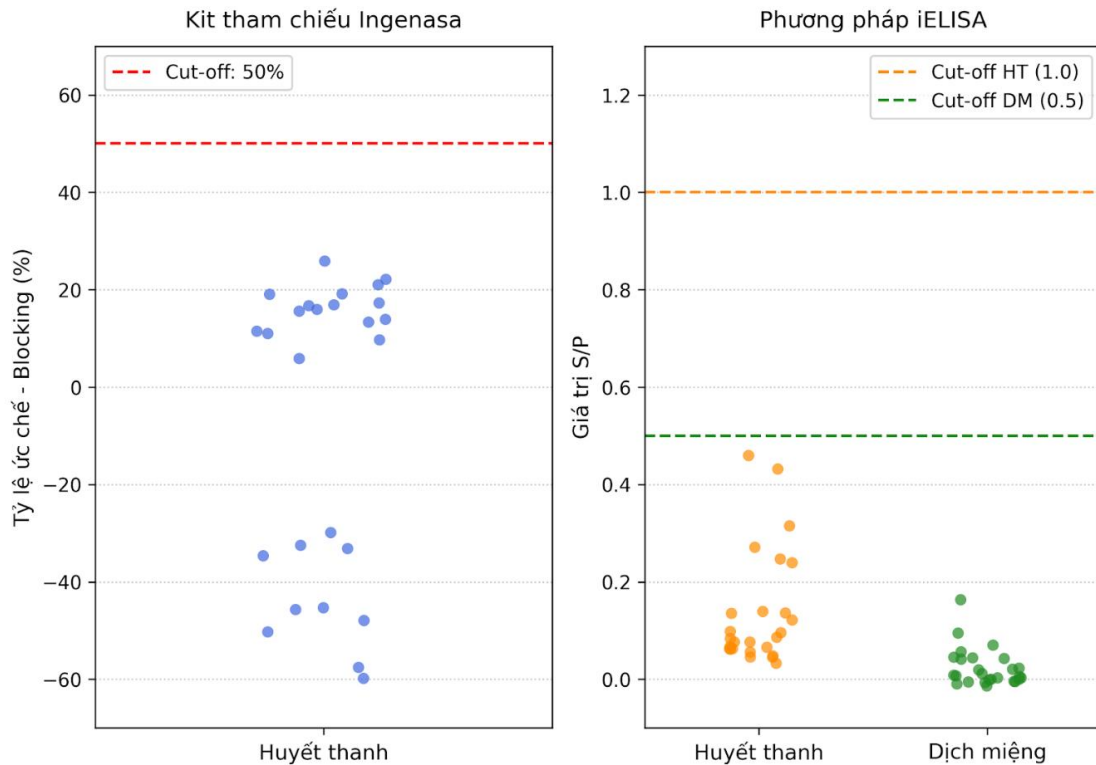
2.2.5. Phân tích kết quả

Độ đặc hiệu và độ nhạy tương đối được tính toán dựa trên bảng tương liên 2×2 . Mức độ tương quan giữa giá trị S/P của huyết thanh và dịch miệng được đánh giá qua hệ số tương quan Pearson (r). Chỉ số Cohen's Kappa (κ) được sử dụng để đánh giá mức độ đồng thuận giữa hai loại nền mẫu. Các biểu đồ phân tán (Jitter plot) và hộp (Boxplot) được xây dựng bằng phần mềm Python thông qua thư viện chuyên dụng Seaborn và Matplotlib.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Độ đặc hiệu của phương pháp iELISA

Để đánh giá độ đặc hiệu chẩn đoán của iELISA, nghiên cứu đã sử dụng nhóm đối chứng âm gồm 26 cá thể lợn thuộc nhiều lứa tuổi và giai đoạn sinh lý khác nhau (lợn con theo mẹ, lợn nái và lợn thịt). Toàn bộ số mẫu này được thu thập tại các cơ sở chăn nuôi thực hành vệ sinh phòng bệnh cẩn thận, chưa từng có lịch sử mắc DTLCP, không sử dụng vaccin phòng DTLCP và có kết quả xét nghiệm âm tính virus DTLCP (kết quả không trình bày). Tóm tắt kết quả xét nghiệm được trình bày ở hình 1.



Hình 1. So sánh kết quả chẩn đoán của phương pháp iELISA với kit ELISA tham chiếu trên nhóm lợn không mắc DTLCP

Kết quả phân tích bằng kit ELISA tham chiếu (INGEZIM PPA Compac) trên mẫu huyết thanh cho thấy 26/26 mẫu đều có giá trị phần trăm ức chế (Blocking%) dao động từ -59,80% đến 25,87%. Toàn bộ dải giá trị này nằm cách rất xa so với ngưỡng chẩn đoán dương tính của nhà sản xuất ($\geq 50\%$) (biểu đồ bên trái, Hình 1). Việc 100% mẫu đạt kết quả âm tính bằng kit tham chiếu đã tái khẳng định tính chính xác của nhóm mẫu đối chứng âm.

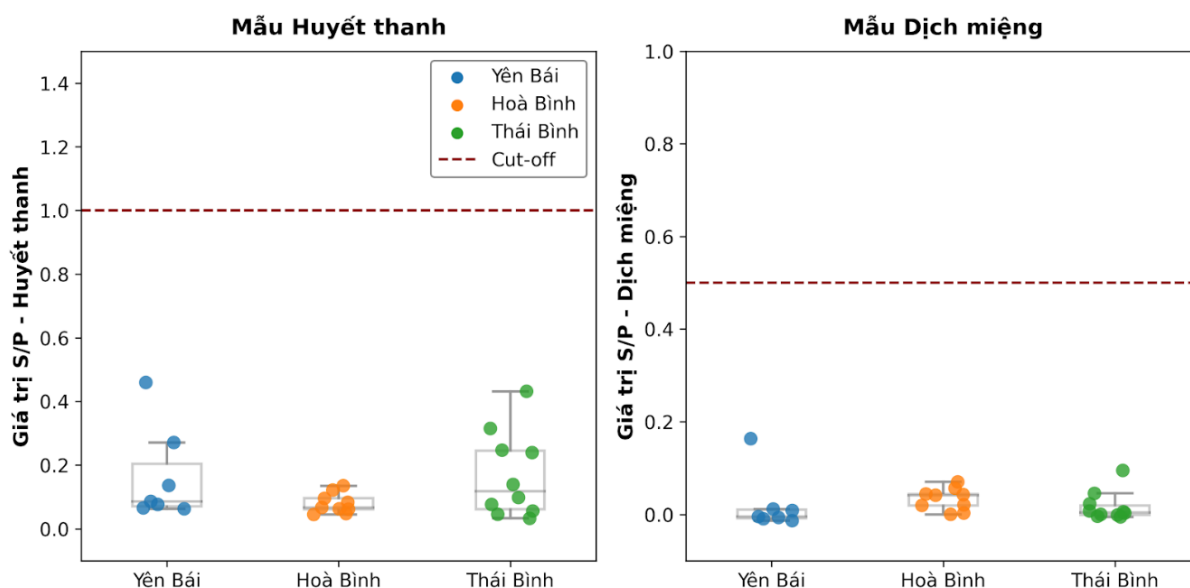
Khi tiến hành đánh giá bằng phương pháp iELISA, toàn bộ 26 mẫu huyết thanh đều cho giá trị S/P ở mức nền rất thấp, dao động từ 0,033 đến 0,459. So với ngưỡng dương tính với mẫu huyết thanh ($S/P \geq 1,0$), phương pháp không ghi nhận bất kỳ hiện tượng dương tính giả nào, đặc hiệu chẩn đoán 100%. Nhìn vào hình 1 (biểu đồ bên phải), có thể thấy một “khoảng cách an toàn” rất lớn từ điểm dữ liệu cao nhất (0,459) đến đường Cut-off.

Đối với mẫu dịch miệng, phương pháp iELISA cho các giá trị S/P phân bố tập trung trong một khoảng rất hẹp (từ -0,014 đến 0,163),

thấp hơn nhiều so với ngưỡng chẩn đoán $S/P < 0,5$, tương đương với độ đặc hiệu 100%. Kết quả này mang ý nghĩa sinh học quan trọng: thành phần phức tạp của dịch tiết niêm mạc (chứa nhiều enzyme, vi khuẩn và mảnh thức ăn,...) hoàn toàn không gây cản trở hay tạo ra phản ứng không đặc hiệu đối với phản ứng iELISA dùng trong nghiên cứu này.

Khi bóc tách dữ liệu của 26 mẫu âm tính nêu trên theo nguồn gốc địa lý, kết quả cho thấy một sự tương đồng rõ rệt giữa các địa phương lấy mẫu (Hình 2).

Kết quả ở hình 2 cho biết: Giá trị S/P trên cả mẫu huyết thanh và dịch miệng đều tập trung ở mức thấp sát trục hoành, không có sự khác biệt đáng kể giữa các tỉnh khảo sát. Sự phân bố đồng đều này cho thấy kết quả âm tính của phương pháp iELISA là đặc điểm chung ổn định, không thay đổi theo yếu tố vùng miền hay điều kiện chăn nuôi tại các địa điểm thu mẫu khác nhau. Đây là cơ sở thực tế để khẳng định tính chính xác của phương pháp khi triển khai xét nghiệm trên các quần thể lợn tại nhiều địa phương.



Hình 2. Phân bố giá trị S/P trên mẫu huyết thanh và dịch miệng âm tính theo địa phương khảo sát

Bảng 1. Đồng thuận kết quả giữa iELISA và ELISA tham chiếu với mẫu huyết thanh

	iELISA (Dương tính)	iELISA (Âm tính)	Tổng
ELISA tham chiếu (Dương tính)	36	7	43
ELISA tham chiếu (Âm tính)	1	40	41
Tổng	37	47	84

3.2. Sự đồng thuận của phương pháp iELISA với ELISA tham chiếu

Để đánh giá độ tin cậy của phương pháp iELISA, nghiên cứu tiến hành phân tích sự đồng thuận chẩn đoán trên 84 mẫu huyết thanh (26 mẫu đối chứng âm, 25 mẫu cấp tính và 33 mẫu mạn tính). Bộ kit INGEZIM PPA Compac tiếp tục được sử dụng làm tham chiếu. Kết quả chẩn đoán giữa hai phương pháp được trình bày ở bảng 1.

Tính toán kết quả từ bảng 1 cho biết: tỷ lệ đồng thuận chung giữa hai phương pháp đạt 90,47% (76/84 mẫu). Hệ số đồng thuận Cohen's Kappa được xác định đạt $\kappa = 0,81$. Theo thang đánh giá của Landis & Koch, mức $\kappa > 0,8$ tương đương với sự đồng thuận gần như hoàn toàn giữa hai hệ thống xét nghiệm (Landis & Koch, 1977). Phương pháp iELISA đạt độ nhạy tương

đối 83,72% (36/43 mẫu) và độ đặc hiệu tương đối 97,56% (40/41 mẫu) so với kit tham chiếu.

Trong tổng số 84 mẫu, có 8 trường hợp (chiếm 9,5%) cho kết quả khác biệt giữa hai phương pháp. Để lý giải sự khác biệt, kết quả chẩn đoán được trực quan hóa ở hình 3.

Kết quả ở hình 3 cho thấy nguyên nhân của sự sai lệch này nằm ở các mẫu có tín hiệu sát đường giá trị ngưỡng: Trường hợp iELISA (+) / kit tham chiếu (-): Có duy nhất 1 mẫu ở nhóm cấp tính (P93). Giá trị S/P của mẫu này với kit iELISA là 1,19 (vượt 0,19 đơn vị so với ngưỡng 1,0), trong khi tỷ lệ ức chế với kit tham chiếu là 45,95%. Theo thông tin của nhà sản xuất, khoảng 40-50% là “vùng nghi ngờ” (đánh dấu màu xám, Hình 3). Trong cách phân loại dương tính/ âm tính mẫu này bị ép vào nhóm âm tính, dẫn đến sự bất đồng thuận. Trường hợp iELISA (-) / kit tham chiếu (+): Trong số 7 mẫu này, có

tới 5 mẫu thuộc nhóm mạn tính (C74, C67, C66, C64 và C61) có tỷ lệ ức chế của kit tham chiếu dao động từ 50,56% đến 54,61%. Đây là mức tín hiệu nằm sát đường giá trị ngưỡng (50%).

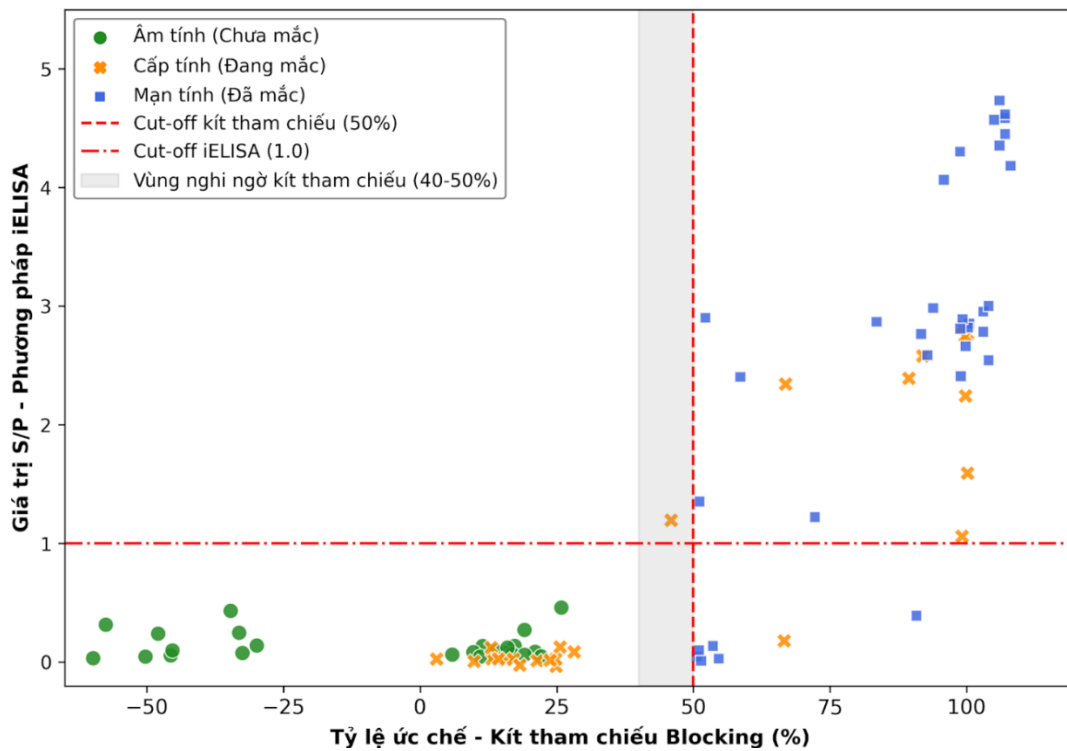
Tóm lại, các phân tích trên cho thấy kết quả bất đồng giữa hai phương pháp chỉ xảy ra cục bộ ở vùng cận ngưỡng. Với giá trị hệ số đồng thuận nằm ở ngưỡng cao ($\kappa = 0,81$), dữ liệu cho thấy phương pháp iELISA có độ tin cậy và mức độ tương đồng đủ cao so với kit tham chiếu.

3.3. Tương quan kết quả iELISA giữa mẫu dịch miệng và huyết thanh

Để đánh giá tính khả thi của việc sử dụng dịch miệng như một giải pháp lấy mẫu thuận tiện, không xâm lấn, nghiên cứu đã tiến hành so sánh đối chiếu giá trị chẩn đoán (S/P) giữa mẫu dịch miệng và mẫu huyết thanh tương ứng trên

cùng 84 cá thể lợn khảo sát. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

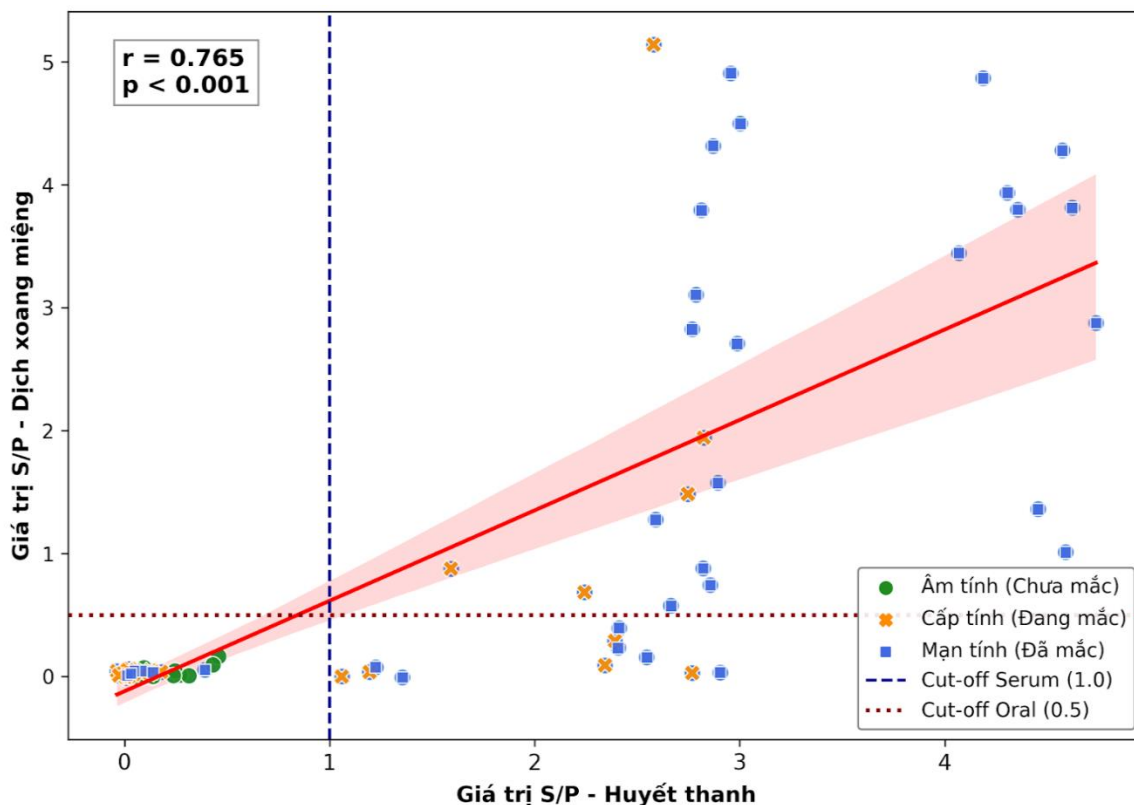
Dựa trên ngưỡng dương tính được thiết lập cho từng loại mẫu ($S/P \geq 1,0$ đối với huyết thanh và $S/P \geq 0,5$ đối với dịch miệng), kết quả phân loại chéo giữa hai nền mẫu thu được như sau: Tỷ lệ đồng thuận chung đạt 86,90% (73/84 mẫu). Hệ số đồng thuận Cohen's Kappa đạt $\kappa = 0,73$, tương đương với mức đồng thuận đáng kể (Landis & Koch, 1977). Đáng chú ý, trong số 11 trường hợp bất đồng thuận, 100% đều là các mẫu dương tính với mẫu huyết thanh nhưng âm tính với mẫu dịch miệng (âm tính giả với dịch miệng so với huyết thanh). Phương pháp iELISA không ghi nhận bất kỳ ca dương tính giả nào từ dịch miệng. Tương quan kết quả iELISA trên hai nhóm mẫu được trình bày ở hình 4.



Hình 3. Tương quan giá trị chẩn đoán giữa phương pháp iELISA và kit tham chiếu

Bảng 2. Đồng thuận kết quả iELISA giữa mẫu huyết thanh và dịch miệng

	Dịch miệng (Dương tính)	Dịch miệng (Âm tính)	Tổng
Huyết thanh (Dương tính)	26	11	37
Huyết thanh (Âm tính)	0	47	47
Tổng	26	58	84



Hình 4. Tương quan kết quả iELISA giữa mẫu huyết thanh và dịch miệng

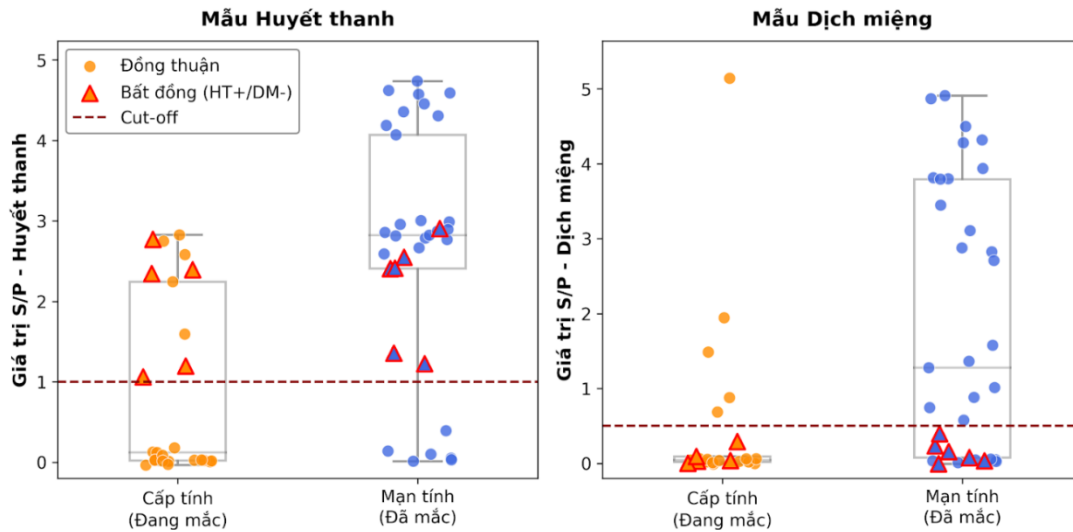
Phân tích tương quan tuyến tính cho thấy sự phân bố dữ liệu có tính quy luật rõ rệt. Phân tích thống kê xác định hệ số tương quan Pearson đạt $r = 0,765$ với mức ý nghĩa $P < 0,001$. Đây là mức tương quan thuận mạnh, minh chứng cho việc hàm lượng kháng thể đặc hiệu kháng virus DTLCP có ở dịch miệng tỷ lệ thuận với hàm lượng kháng thể lưu hành trong máu của cùng một cá thể.

3.4. Động học đáp ứng miễn dịch bằng phương pháp iELISA

Bên cạnh khả năng phân loại mẫu (âm tính/dương tính), một bộ kit chẩn đoán cũng cần phản ánh được biến động hàm lượng kháng thể đặc hiệu thay đổi theo tiến triển của bệnh. Để đánh giá khả năng này của phương pháp iELISA, nghiên cứu đã so sánh phân bố giá trị S/P hai nền mẫu (huyết thanh và dịch miệng), giữa hai nhóm lợn nhiễm virus DTLCP: giai đoạn cấp tính (đang mắc, $n = 25$) và giai đoạn

mạn tính (đã mắc, $n = 33$). Kết quả trình bày ở hình 5.

Về biến động trên mẫu huyết thanh: Ở giai đoạn cấp tính (khi đáp ứng miễn dịch mới ở giai đoạn hình thành), tín hiệu chẩn đoán phân bố trải dài với giá trị trung vị nằm ở mức rất thấp đạt 0,122 (khoảng tứ phân vị, Q1-Q3: 0,024-2,243). Bước sang giai đoạn mạn tính khi quá trình sản sinh kháng thể đã qua giai đoạn hình thành ban đầu, toàn bộ nhóm xét nghiệm cho thấy sự gia tăng tín hiệu, tập trung thành cụm phía trên đường giá trị ngưỡng với S/P trung vị tăng lên mức 2,821 (khoảng tứ phân vị, Q1-Q3: 2,406-4,068). Về biến động trên mẫu dịch miệng: Diễn biến biến động giá trị S/P ở dịch miệng hoàn toàn tương đồng với xu hướng của huyết thanh. Giá trị S/P của dịch miệng ở giai đoạn mạn tính thể hiện sự gia tăng và tách biệt rõ so với giai đoạn cấp tính. Hai diễn biến trên cho thấy khả năng phát hiện kháng thể bằng iELISA phụ thuộc vào giai đoạn nhiễm và mức độ đáp ứng miễn dịch của vật chủ.



Ghi chú: ngưỡng iELISA dương tính kháng thể là khác nhau đối với mẫu huyết thanh và mẫu dịch miệng.

Hình 5. Biến động giá trị S/P ở lợn mắc bệnh cấp tính và mạn tính đo bằng iELISA

Đối với 11 mẫu bất đồng thuận (dương tính huyết thanh/âm tính dịch miệng), khi trực quan hóa giá trị S/P trên biểu đồ (Hình 5, ký hiệu tam giác), có thể rút ra nhận xét như trình bày sau đây. Toàn bộ mẫu “âm tính giả” với dịch miệng đều bắt nguồn từ những cá thể có giá trị S/P của mẫu huyết thanh phân bố xung quanh ngưỡng dương tính (1,05) đến dưới mức 3,0. Ngược lại, khi mẫu huyết thanh có giá trị ở mức S/P ở mức $\geq 3,0$, toàn bộ các cá thể đều cho kết quả dương tính đồng thuận hoàn toàn với mẫu dịch miệng. Lập luận trên tái khẳng định rằng sự giảm độ nhạy ở mẫu dịch miệng không phải là sai số kỹ thuật của phương pháp iELISA, mà là hệ quả của đặc điểm sinh lý và phụ thuộc vào nồng độ kháng thể lưu hành trong máu.

Tựu chung lại, kết quả ở hình 5 cho biết phương pháp iELISA phản ánh xu hướng biến đổi đáp ứng miễn dịch theo giai đoạn bệnh thông qua sự gia tăng giá trị S/P từ giai đoạn cấp tính sang giai đoạn mạn tính. Sự tương đồng về biến động quan sát được trên cả hai nền mẫu một lần nữa cho thấy dịch miệng có thể được sử dụng như mẫu thay thế trong giám sát hoặc sàng lọc đàn.

4. THẢO LUẬN

Việc lựa chọn kháng nguyên phủ đĩa là yếu tố then chốt quyết định độ nhạy và độ đặc hiệu

của các xét nghiệm ELISA phát hiện kháng thể kháng virus DTLCP. Nhiều protein cấu trúc của virus đã được nghiên cứu làm kháng nguyên, trong đó p72 và p30 được sử dụng phổ biến nhất nhờ tính sinh miễn dịch mạnh và đã được kiểm chứng trên nhiều nền mẫu khác nhau (Gallardo & cs., 2013; Gimenez-Lirola & cs., 2016; Cerriteño-Sánchez & cs., 2025). Gần đây, một số protein khác như I329L (Shen & cs., 2023) hay p11.5, p14.5 (Wang & cs., 2025) cũng được đề xuất, tuy nhiên p72 và p30 vẫn là kháng nguyên được dùng trong các kit ELISA thương mại hiện hành.

Về độ đặc hiệu, iELISA sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp p30 trong nghiên cứu này đạt độ đặc hiệu chẩn đoán 100% trên cả mẫu huyết thanh và dịch miệng (Hình 1, 2). Nhóm lợn âm tính được lấy mẫu có nền miễn dịch đa dạng do đã tiêm phòng nhiều vắc xin phổ biến (Lở mồm long móng, Tai xanh, Dịch tả lợn cổ điển,...), nên huyết thanh chứa nhiều loại kháng thể khác nhau. Tuy nhiên, cả iELISA và ELISA tham chiếu đều cho kết quả âm tính, cho thấy kháng nguyên p30 tái tổ hợp tương tác đặc hiệu với kháng thể virus DTLCP và không xảy ra phản ứng chéo với kháng thể chống lại các tác nhân khác. Quan sát này phù hợp với các nghiên cứu trước đó về iELISA p30 trên quần thể lợn khỏe mạnh (Gimenez-Lirola & cs., 2016). Ngoài tính

đặc hiệu nội tại của protein, việc sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp tinh sạch cũng giúp loại bỏ các thành phần virus phức tạp khác, qua đó giảm nguy cơ dương tính giả.

Về kết quả chẩn đoán trên nhóm 58 mẫu thu thập từ các đàn đang hoặc đã xảy ra bệnh DTLCP, có 14 mẫu cho kết quả âm tính trên cả hai phương pháp xét nghiệm. Điều này phản ánh thực tế: việc lấy mẫu tại ổ dịch không đồng nghĩa với 100% cá thể đều đã mang kháng thể. Với các mẫu còn lại, kết quả xét nghiệm (sử dụng kháng nguyên p72) xác định được 43 trường hợp, trong khi phương pháp iELISA (sử dụng kháng nguyên p30) xác định được 37 trường hợp, tương ứng với độ nhạy tương đối đạt 83,72%. Sự chênh lệch này chủ yếu xảy ra ở các mẫu có tín hiệu sát ranh giới ngưỡng chẩn đoán, phản ánh sự khác biệt về định dạng xét nghiệm (blocking ELISA thương mại so với iELISA) cũng như ái lực của kháng nguyên p30 (iELISA) so với p72 (kít tham chiếu thương mại). Đây là điểm tiếp tục cần được cải thiện đối với kít iELISA sử dụng kháng nguyên p30. Mặc dù độ nhạy tương đối trên từng cá thể của iELISA có phần thấp hơn kít thương mại, điều này không làm mất đi giá trị của phương pháp iELISA khi áp dụng giám sát ở cấp độ đàn. Một trong những đặc tính của protein p30 là khả năng kích thích đáp ứng dịch thể rất sớm, kháng thể có thể được phát hiện chỉ từ 7-10 ngày sau nhiễm (Gimenez-Lirola & cs., 2016), nên sử dụng kháng nguyên p30 có khả năng rút ngắn “khoảng trống chẩn đoán” ở giai đoạn đầu của bệnh.

Về tính khả thi của việc sử dụng mẫu dịch miệng trong chẩn đoán, hình 4 cho thấy mức độ tương quan và đồng thuận đáng kể giữa dịch miệng và huyết thanh (86,90%; $\kappa = 0,73$; $r = 0,765$). Kết quả này củng cố khả năng sử dụng dịch miệng trong chẩn đoán huyết thanh học DTLCP đã được đề xuất trước đây (Mur & cs., 2013). Xét nghiệm sử dụng mẫu dịch miệng cho giá trị S/P thấp hơn huyết thanh (phản ánh khác biệt sinh lý tự nhiên, do nồng độ kháng thể trong dịch tiết thấp hơn trong máu và chịu ảnh hưởng pha loãng của nước bọt). Tuy nhiên, thu mẫu dịch miệng mang lại ưu thế rõ rệt về an toàn sinh học. Do máu của lợn nhiễm virus

DTLCP có thể chứa tải lượng virus rất cao (10^7 - 10^8 bản sao/ml) (Cho & cs., 2022), thao tác lấy máu tiềm ẩn nguy cơ phát tán mầm bệnh. Trong khi đó, thu thập dịch miệng là phương pháp không xâm lấn và hạn chế tiếp xúc trực tiếp với động vật.

5. KẾT LUẬN

Phương pháp iELISA sử dụng kháng nguyên p30 tái tổ hợp cho độ đặc hiệu 100% và đồng thuận cao với kít ELISA thương mại. Mẫu dịch miệng cho kết quả có tương quan khá chặt so với mẫu huyết thanh và có thể sử dụng trong giám sát, với ưu thế về an toàn sinh học khi lấy mẫu tại cơ sở.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cerriteño-Sánchez J.L., García-Cambrón J.B., Zavala-Ocampo P.L., Ganges L. & Cuevas-Romero J.S. (2025). Development and Standardization of Indirect ELISA for African Swine Fever Virus Using Recombinant p30 Protein Produced in Prokaryotic System. *National Library of Medicine* 12(10): 995.
- Cho K.H., Hong S.K., Jang M.K., Ryu J.H., Kim H.J., Lee Y.R., Roh I.S., Sohn H.J., Kang H.E. & Park J.Y. (2022). Comparison of the Virulence of Korean African Swine Fever Isolates from Pig Farms during 2019-2021. *Viruses*. 14(11).
- Gallardo C., Nieto R., Soler A., Pelayo V., Fernández-Pinero J., Markowska-Daniel I., Pridotkas G., Nurmoja I., Granta R. & Simón A. (2015). 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. *Journal of clinical microbiology*. 53(8): 2555-2565.
- Gallardo C., Soler A., Nieto R., Carrascosa A.L., De Mia G.M., Bishop R.P., Martins C., Fasina F.O., Couacy-Hymman E., Heath L., Pelayo V., Martín E., Simón A., Martín R., Okurut A.R., Lekolol I., Okoth E. & Arias M. (2013). Comparative evaluation of novel African swine fever virus (ASF) antibody detection techniques derived from specific ASF viral genotypes with the OIE internationally prescribed serological tests. *Vet Microbiol*. 162(1): 32-43.
- Gimenez-Lirola L.G., Mur L., Rivera B., Mogler M., Sun Y., Lizano S., Goodell C., Harris D.L., Rowland R.R., Gallardo C., Sanchez-Vizcaino J.M. & Zimmerman J. (2016). Detection of African

- Swine Fever Virus Antibodies in Serum and Oral Fluid Specimens Using a Recombinant Protein 30 (p30) Dual Matrix Indirect ELISA. *PLoS One*. 11(9): e0161230.
- Landis J.R. và Koch G.G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 33(1): 159-74.
- Mur L., Gallardo C., Soler A., Zimmermman J., Pelayo V., Nieto R., Sánchez-Vizcaíno J.M. & Arias M. (2013). Potential use of oral fluid samples for serological diagnosis of African swine fever. *Veterinary Microbiology*. 165(1): 135-139.
- Nga B.T.T., Dao B.T.A., Thi L.N., Osaki M., Kawashima K., Song D., Salguero F.J. & Le V.P. (2020). Clinical and pathological study of the first outbreak cases of African swine fever in Vietnam, 2019. *Frontiers in Veterinary Science*. 7.
- Revilla Y., Perez-Nunez D. & Richt J.A. (2018). African swine fever virus biology and vaccine approaches. *Advances in virus research*. 100: 41-74.
- Sánchez-Vizcaíno J. & Mur L. (2013). African swine fever diagnosis update. In: *Vaccines and diagnostics for transboundary animal diseases*. Karger Publishers. pp. 159-165.
- Sánchez-Vizcaíno J., Mur L., Gomez-Villamandos J. & Carrasco L. (2015). An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *Journal of comparative pathology*. 152(1): 9-21.
- Schambow R., Giménez-Lirola L.G., Hanh V.D., Huong L.T.L., Lan N.T., Trang P.H., Luc D.D., Bo H.X., Chuong V.D., Rauh R., Nelson W., Mora-Díaz J.C., Rovira A., Culhane M.R. & Perez A.M. (2023). Modeling the accuracy of a novel PCR and antibody ELISA for African swine fever virus detection using Bayesian latent class analysis. *Frontiers in Veterinary Science*. Vol. 10.
- Shen Z., Qiu W., Luan H., Sun C., Cao X., Wang G. & Peng J. (2023). I329L protein-based indirect ELISA for detecting antibodies specific to African swine fever virus. *National Library of Medicine*. Vol. 13.
- Tignon M., Gallardo C., Iscaro C., Hutet E., Van Der Stede Y., Kolbasov D., De Mia G.M., Le Potier M.-F., Bishop R.P., Arias M. & Koenen F. (2011). Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. *Journal of Virological Methods*. 178(1): 161-170.
- Tran H.T.T., Truong A.D., Dang A.K., Ly D.V., Nguyen C.T., Chu N.T., Nguyen H.T. & Dang H.V. (2020). Genetic characterization of African swine fever viruses circulating in North Central region of Vietnam. *Transboundary and Emerging Diseases*.
- Truong A.D., Ly D.V., Vu T.H., Nguyen T.C., Chu T.N., Nguyen H.T., Pham N.T., Tran H.T.T. & Dang H.V. (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.
- Van Phan Le D.G.J., Yoon S.-W., Kwon H.-M., Trinh T.B.N., Nguyen T.L., Bui T.T.N., Oh J., Kim J.B., Cheong K.M. & Van Tuyen N. (2019). Outbreak of African swine fever, Vietnam, 2019, *Emerging infectious diseases*. 25(7): 1433.
- Wang A., Zhao H., Liu H., Chen Y., Zhou J., Zhu X., Liang C., Ding P., Liu E. & Zhang G. (2025). Detection of African swine fever virus antibodies using p11.5 and p14.5 protein-based indirect ELISA. *Virology*. 603: 110335.