

Tối ưu quy trình Nested RT-PCR và phân tích đặc điểm phân tử virus viêm gan E trên mẫu gan lợn thu thập tại Hà Nội

Optimization of the Nested RT-PCR Protocol and Genetic Characterization of Hepatitis E Virus in Porcine Liver Tissue Samples Collected in Hanoi in 2025

Vũ Thị Châm^{1,2}, Hoàng Văn Tổng³, Dương Ngọc Ánh⁴,
Vũ Thị Thanh Hoa⁵, Nguyễn Duy Hà⁶,
Bùi Thanh Thuyết⁶, Nguyễn Thị Trang Nhung²
và Bùi Tiến Sỹ^{6*}

¹Công ty Cổ phần Y dược Phacogen
²Trường ĐH Y tế Công cộng
³Học viện Quân Y
⁴Trường Đại học Khoa học Tự nhiên
⁵Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh
⁶Bệnh viện Trung Ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Tối ưu các thành phần tham gia phản ứng và xác định độ nhạy, độ đặc hiệu của phương pháp Nested RT-PCR phát hiện HEV. Áp dụng phương pháp Nested RT PCR để xác định tỷ lệ nhiễm và phân tích đặc điểm sinh học phân tử HEV trên mẫu gan lợn thu thập tại thành phố Hà Nội năm 2025. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu thực nghiệm trong phòng xét nghiệm sinh học phân tử kết hợp với nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 298 mẫu gan lợn thu thập tại Hà Nội. **Kết quả:** Phản ứng Nested RT-PCR được tối ưu với nhiệt độ gắn mỗi 56°C, thời gian kéo dài 50 giây cho vòng ngoài và 54°C, 40 giây cho vòng trong. Trên 298 mẫu gan lợn, kết quả có 24 mẫu (8,05%) dương tính với HEV bằng phương pháp Nested RT PCR. Phân tích phát sinh loài qua 11 chủng được giải trình tự cho thấy các chủng đều thuộc kiểu gen HEV-3, trong đó 9/11 thuộc subtype HEV-3a, 1/11 HEV-3e và 1/11 HEV-3f-like. **Kết luận:** Nghiên cứu tối ưu thành công phương pháp Nested RT-PCR phát hiện HEV trong gan lợn. Các mẫu dương tính đều thuộc kiểu gen HEV-3, phù hợp với các chủng lưu hành trong khu vực.

Từ khoá: Virus viêm gan E, kỹ thuật Nested RT-PCR, phân tích phát sinh chủng loại, tối ưu hoá, kiểu gen.

Summary

Objective: This study aimed to optimize the conditions and evaluate the sensitivity and specificity of the Nested RT-PCR technique for detecting HEV. In addition, the infection rate and molecular features of HEV were investigated in porcine liver tissue samples collected in Hanoi in 2025. **Subject and method:** An experimental study was conducted in a molecular biology laboratory, combined with a cross-sectional descriptive survey of 298 porcine hepatic samples collected in Hanoi. **Result:** The Nested RT-PCR assay was successfully optimized with an annealing temperature of 56°C and an extension time of 50 seconds for the outer cycle, and 54°C with 40 seconds for the inner cycle. Among 298 liver specimens from pigs analyzed, 24 (8.05%) were identified as HEV-positive. Of these positive samples, 11 were successfully

Ngày nhận bài: 8/4/2026, ngày chấp nhận đăng: 20/4/2026

* Tác giả liên hệ: sybt.bv108@gmail.com - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

subjected to sequencing, enabling further molecular characterization. Phylogenetic analysis revealed that all strains belonged to genotype HEV-3, of which 9/11 were subtype HEV-3a, 1/11 HEV-3e, and 1/11 HEV-3f-like. *Conclusion:* The study established an optimized Nested RT-PCR protocol for HEV detection in porcine liver specimens. All positive samples were classified as genotype HEV-3, consistent with strains circulating in the region.

Keywords: Hepatitis E virus, Nested RT-PCR, Phylogenetic analysis, Optimization, Genotype.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus viêm gan E (HEV) gây ra bệnh viêm gan E là một loại virus RNA sợi đơn dương có vỏ bọc bán phần, thuộc họ Hepeviridae¹. Mỗi năm, trên toàn thế giới ước tính có khoảng 20 triệu ca nhiễm viêm gan E, trong đó khoảng 3,3 triệu trường hợp biểu hiện triệu chứng lâm sàng và khoảng 70.000 ca tử vong được ghi nhận². Virus viêm gan E là tác nhân gây bệnh có cơ chế lây truyền đa dạng và dịch tễ học phức tạp, hiện được phân thành ít nhất 8 kiểu gen (HEV-1 đến HEV-8). Trong đó, HEV-1 và HEV-2 chủ yếu lây qua nước nhiễm phân, còn HEV-3 và HEV-4 có khả năng lây từ động vật sang người qua thực phẩm, đặc biệt liên quan đến lợn. Sự phát hiện HEV trong người, động vật, thực phẩm, nước thải và máu hiến cho thấy HEV là mối đe dọa đáng kể đối với sức khỏe cộng đồng toàn cầu³.

Chẩn đoán HEV dựa trên các xét nghiệm huyết thanh như ELISA để phát hiện kháng thể kháng HEV IgM/IgG, nhưng độ nhạy và đặc hiệu biến đổi tùy theo loại sinh phẩm sử dụng. Một phân tích gộp báo cáo độ nhạy IgM khoảng 83% và IgG khoảng 74% với độ đặc hiệu cao, cho thấy giới hạn của phương pháp huyết thanh khi dùng đơn lẻ trong chẩn đoán HEV⁴. Phương pháp Nested RT-PCR đã được phát triển để khuếch đại RNA của HEV trong nhiều loại mẫu lâm sàng (bao gồm cả mô gan cố định paraffin), nhờ hai vòng khuếch đại liên tiếp giúp tăng độ nhạy trong phát hiện virus ngay cả khi tải lượng RNA thấp trong mẫu⁵. Xuất phát từ nhu cầu chẩn đoán bệnh do HEV gây ra ở Việt Nam, chúng tôi phát triển quy trình Nested RT PCR phát hiện nhanh và chính xác HEV trong các mẫu gan lợn tại các khu vực ở Hà Nội.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mô gan lợn nhà được thu thập từ các chợ Bưởi, Ngọc Than, Thạch Thán, chợ Thầy, chợ Yên

Nội, chợ Nửa, chợ Hoàng Xá, chợ Phủ thuộc khu vực thủ đô Hà Nội từ tháng 10/2024 đến tháng 12/2025.

Các chủng sử dụng trong nghiên cứu: mẫu dịch nuôi HEV - 3J được cung cấp bởi trường đại học Tübingen - Đức và các mẫu đối chứng như cúm A,B, HIV, HCV, Dengue và mẫu chứng không mẫu được lưu trữ tại Khoa Vi sinh vật, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thu thập bệnh phẩm

Mô gan kích thước 40-50 mg (4 mm × 4 mm × 4 mm) được thu thập bằng tay một lần và lưỡi dao mổ vô trùng từ mỗi con lợn, bảo quản trong 0,5 mL PBS 1X. Tất cả các mẫu thu thập được bảo quản ở 4°C (tối đa 24 giờ), sau đó được vận chuyển đến phòng thí nghiệm và lưu trữ ở -80°C cho đến khi xử lý.

2.2.2. Tách chiết RNA và tổng hợp DNA bổ sung (cDNA)

RNA tổng số được tách chiết từ các mẫu mô gan lợn đã được nghiền nhỏ bằng thuốc thử TRIzol (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. RNA đã tách chiết được hòa tan trong 60 µL dung dịch đệm Nuclease-Free Water và bảo quản ở -80°C cho đến khi sử dụng. Chất lượng RNA sau tách chiết bằng phương pháp TRIzol được đánh giá dựa trên các chỉ số hấp thụ quang phổ. Cụ thể, tỷ lệ A260/280 của các mẫu RNA đạt khoảng 1,7–1,8, tỷ lệ A260/230 đạt khoảng 1,9–2,1. RNA sau khi tách chiết được phiên mã ngược bằng bộ kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), sử dụng mỗi hexamer ngẫu nhiên với thể tích phản ứng cuối cùng là 20 µL theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ RNA được xác định bằng máy Scandrop2 (Analytik Jena).

2.2.3. Phương pháp Nested RT PCR

Trong nghiên cứu này, vùng trình tự đặc hiệu của HEV được nhắm đến cho PCR là vùng gen ORF1

trên HEV với vị trí trong khoảng từ 28 đến 5109 (Bảng 1).Việc đánh số vị trí mỗi được thực hiện dựa trên trình tự của chủng MN714358 được công bố trên cơ sở dữ liệu GenBank.

Bảng 1. Trình tự mỗi được sử dụng cho phản ứng PCR

PCR	Tên mỗi	Vị trí mỗi	Kích thước	Trình tự mỗi (5'-3')
Vòng 1	HEV-38	4143	540bp	5'-GAGGCYATGGTSGAGAARG-3'
	HEV-39	4682		5'-GCCATGTTCCAGACRGRTRTTCC-3'
Vòng 2	HEV-37	4337	307bp	5' - GGTTCCCGYGCTATTGARAARG - 3'
	HEV-27	4643		5' - TCRCCAGAGTGYYTCTTCC - 3'

Xác định các thành phần tối ưu (điều kiện tham gia phản ứng và chu trình nhiệt) cho phản ứng Nested RT PCR bao gồm nhiệt độ gắn mỗi, thời gian kéo dài, nhằm đảm bảo hiệu suất khuếch đại cao nhất và tính đặc hiệu tối ưu của phản ứng. Tối ưu nhiệt độ gắn mỗi vòng ngoài bằng cách chạy Gradient phản ứng PCR các nhiệt độ từ 50°C - 64°C, thời gian kéo dài thay đổi 30 - 40 - 50 - 60 giây. Nhiệt độ gắn mỗi vòng trong bằng cách chạy Gradient phản ứng PCR các nhiệt độ 50°C - 62°C, thời gian kéo dài thay đổi 30 - 40 - 50 giây. Tất cả các phản ứng tối ưu đều được chạy lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác và độ tin cậy kết quả. Trong nghiên cứu này, chúng tôi không tiến hành tối ưu nồng độ mỗi, số chu kì nhiệt riêng biệt, do trong quá trình tối ưu các điều kiện phản ứng khác, nồng độ mỗi hiện tại đã được xác định là phù hợp, thể hiện qua việc không xuất hiện hiện tượng primer-dimer và đảm bảo hiệu quả khuếch đại.

2.2.4. Xác định độ nhạy, độ đặc hiệu của phản ứng Nested RT PCR

Một đoạn DNA dài 1246bp thuộc vùng ORF1,ORF2 đã được nhân bản vào vector pJET1.2/Blunt và được sử dụng để xác định độ nhạy của PCR. Số lượng bản sao plasmid HEV được tính toán dựa trên công thức: số lượng bản sao (copies/μl) = (lượng DNA (ng) x 6.022.10²³ / (4220 x 1.10⁹ x 660).

Độ nhạy của phản ứng PCR được xác định là số bản sao thấp nhất của gen mục tiêu thấp nhất cho một kết quả PCR dương tính. Tiến hành phản ứng

Nested RT PCR cho các mẫu chuẩn plasmid mang đoạn gen HEV có dải nồng độ từ 10⁰ - 10⁵ copies/ phản ứng (chạy lặp lại 5 lần với các nồng độ 10⁵-10², 15 lần với hai nồng độ thấp hơn là 10¹ và 10⁰ copies/ phản ứng)

Độ đặc hiệu của phản ứng được xác định là tỷ lệ các chủng khác ngoài HEV âm tính với các cặp mỗi đã lựa chọn trên các chủng đã thử nghiệm. Trong nghiên cứu này, đã sử dụng 6 chủng virus khác HEV để kiểm tra phản ứng chéo với cặp mỗi đặc hiệu cho HEV.

2.2.5. Ứng dụng phương pháp Nested RT PCR cho chẩn đoán HEV từ mẫu gan lợn

Mẫu gan lợn đã được tiến hành tách chiết ARN bằng thuốc thử TRIzol (Invitrogen) theo hướng dẫn nhà sản xuất (mục 2.2.2). Sau đó được phiên mã ngược bằng bộ kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) với chu trình nhiệt 25°C trong 5 phút, 42°C trong 60 phút, 70°C trong 5 phút. Sản phẩm thu được dùng cho phản ứng vòng ngoài Nested RT PCR. Phản ứng PCR vòng ngoài bao gồm: DreamTaq Hot Start PCR Master Mix nồng độ 1X, 0,33μM mỗi HEV-38, HEV-39 và 2 μl cDNA trong tổng thể tích của phản ứng là 15 μl. Phản ứng Nested RT PCR vòng trong bao gồm: DreamTaq Hot Start PCR Master Mix nồng độ 1X, 0,33μM mỗi HEV-37, HEV-27 và 2 μl sản phẩm của vòng ngoài trong tổng thể tích của phản ứng là 15 μl. Chu trình nhiệt cho vòng ngoài của phản ứng là 95°C trong 3 phút → (95°C trong 30 giây → 56°C trong 30 giây → 72°C trong 50 giây) x 32 chu kỳ →

72°C trong 5 phút, chu trình nhiệt cho vòng trong là 95°C trong 3 phút → (95°C trong 30 giây → 54°C trong 30 giây → 72°C trong 40 giây) x 35 chu kỳ → 72°C trong 5 phút và giữ ở 4°C. Sản phẩm nhân bản được phân tích trên điện di gel agarose 1,5%.

2.2.6. Xác định kiểu gen và phân tích cây phát sinh loài HEV

Sản phẩm PCR của các mẫu dương tính được tinh sạch bằng bộ kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) và sử dụng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự Sanger sử dụng hóa chất BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Các cặp mỗi vòng ngoài là HEV-38 (sense) 5'-GAG GCY ATG GTS GAG AAR G-3' và HEV-39 (antisense) 5'-GCC ATG TTC CAG ACR GTR TTC C-3'; các mỗi vòng trong là HEV-38 (sense) 5'-GAG GCY ATG GTS GAG AAR G-3' và HEV-27 (antisense) 5'-TCR CCA GAG TGY TTC TTC C-3'. Tất cả các trình tự giải thành công được chỉnh sửa và căn chỉnh bằng phần mềm Bioedit 7.7.1 và thuật toán ClustalW Multiple alignment (<http://bioedit.software.informer.com>), kết hợp với tìm kiếm Blast. Xác định kiểu gen và xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA 12 (www.megasoftware.net). Trình tự tham chiếu của kiểu gen HEV đều được lấy từ cơ sở dữ liệu NCBI GenBank bao gồm các kiểu gen HEV-3, HEV-4 và HEV-1 được sử dụng làm out group (HEV3: OQ433914, MG573193, MN714358, AB481228, AF082843, PX108721, OQ433918, OQ433917, FJ705359, AB248521, JQ013795, KU747142, MK089847, MG573193, KY766999; HEV4: KM253769,

EF077630, PP475173; HEV1: L08816.1). Mô hình thay thế nucleotide phù hợp nhất được lựa chọn là Tamura-Nei với phân bố gamma của tốc độ tiến hóa (TN93+G) bằng ModelTest trong MEGA12 dựa trên tiêu chí BIC thấp nhất. Cây phát sinh loài được suy luận bằng phương pháp hợp lý cực đại (maximum likelihood) theo mô hình TN93+G với 1.000 lần lặp bootstrap.

Trình tự acid amin thu được từ các chủng giải trình tự thành công được căn chỉnh và đánh số thứ tự được thực hiện tương đối so với trình tự protein ORF1 từ chủng HEV kiểu gen 3 (AB740232) để so sánh và phân tích các đột biến nếu có bằng phần mềm Bioedit.

2.3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu là một phần trong đề tài nghị định thư có mã số NĐT/DE/21/07 và đã được phê duyệt bởi Hội đồng đạo đức của Bệnh viện Trung ương quân đội 108 số 3513/HĐĐĐ.

III. KẾT QUẢ

3.1. Tối ưu phản ứng Nested RT-PCR phát hiện HEV

Kết quả tối ưu cho thấy nhiệt độ gắn mỗi 56°C ở vòng ngoài (Hình 1A) và 54°C ở vòng trong (Hình 1B) cho hiệu quả khuếch đại đặc hiệu nhất. Kết quả thời gian kéo dài vòng ngoài là 50 giây (Hình 2A) và thời gian kéo dài vòng trong là 40 giây (Hình 2B); các điều kiện này được sử dụng cho toàn bộ các phân tích tiếp theo.

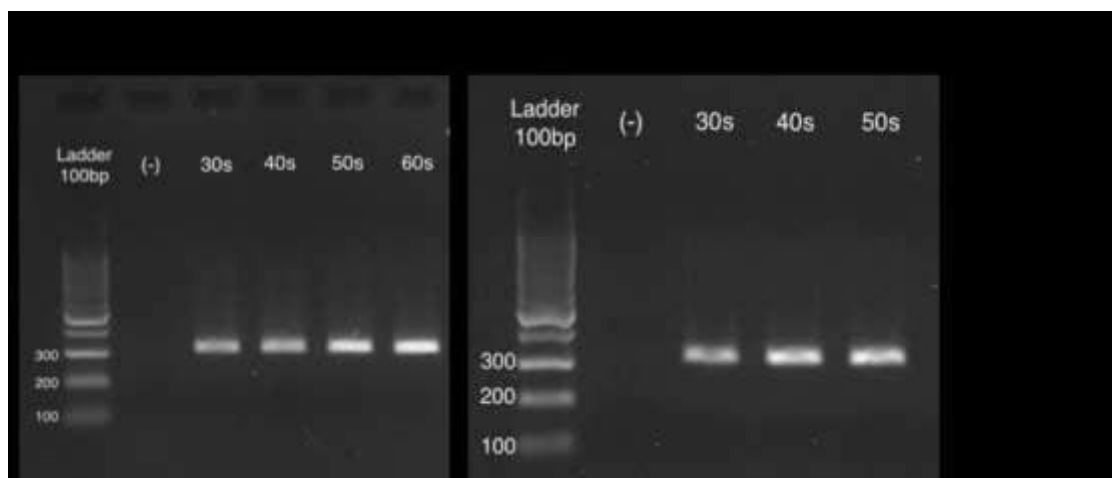


Hình 1. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn mỗi của phản ứng Nested RT-PCR

Ladder: thang DNA 100 bp; (-): mẫu âm tính; dải 50 - 64 tương ứng với nhiệt độ gắn mỗi (°C). 1A

hình ảnh điện di sản phẩm PCR vòng trong với DNA mẫu là sản phẩm PCR vòng ngoài theo dải

nhệt độ từ 50-64°C. 1B hình ảnh ảnh điện di sản phẩm PCR vòng trong theo dải nhiệt độ từ 50-62°C với DNA mẫu là sản phẩm PCR vòng ngoài tại nhiệt độ 56°C đã tối ưu.



Hình 2. Kết quả thời gian kéo dài của phản ứng Nested RT-PCR

Ladder: thang DNA 100 bp; (-): mẫu âm tính; các dải 30 - 60 giây tương ứng với thời gian kéo dài. 2A: hình ảnh điện di sản phẩm PCR vòng trong với DNA mẫu là sản phẩm vòng ngoài theo thời gian kéo dài 30,40,50, 60 giây. 2B: hình ảnh điện di sản phẩm PCR vòng trong với thời gian kéo dài 30, 40, 50 giây với DNA mẫu là thời gian kéo dài vòng ngoài là 50 giây đã tối ưu

3.2. Độ nhạy và độ đặc của Nested RT – PCR

Độ nhạy phân tích của kỹ thuật Nested RT-PCR cho kết quả giới hạn phát hiện LOD nằm trong khoảng $10^0 - 10^1$ copies/phản ứng. Phân tích Probit trên phần mềm SPSS phiên bản 20.0. Dữ liệu phân tích được lấy từ 6 nồng độ chuẩn pha loãng thập phân của plasmid mang gen đích, các nồng độ $10^5, 10^4, 10^3, 10^2$ được thực hiện lặp lại 5 lần và nồng độ 10^1 và 10^0 được thực hiện lặp lại 15 lần. Kết quả phân tích thống kê Probit cho thấy mối tương quan tuyến tính giữa xác suất phát hiện dương tính và $\log_{10}$ nồng độ copies/phản ứng với phương trình hồi quy:

$$\text{Probit}(p) = -1.562 + 4.415 \times \log_{10}[\text{nồng độ}]$$

Dựa trên mô hình này, ngưỡng nồng độ cho xác suất phát hiện 95% (LOD_{95}) tương ứng với giá trị $\log_{10} = 0.726$ ($p=0.021 < 0.05$). Suy ra giới hạn phát hiện của kỹ thuật là 5.32 copies/phản ứng.

$$\text{Độ đặc hiệu phân tích (\%)} = \frac{15}{15} \times 100 = 100\%.$$

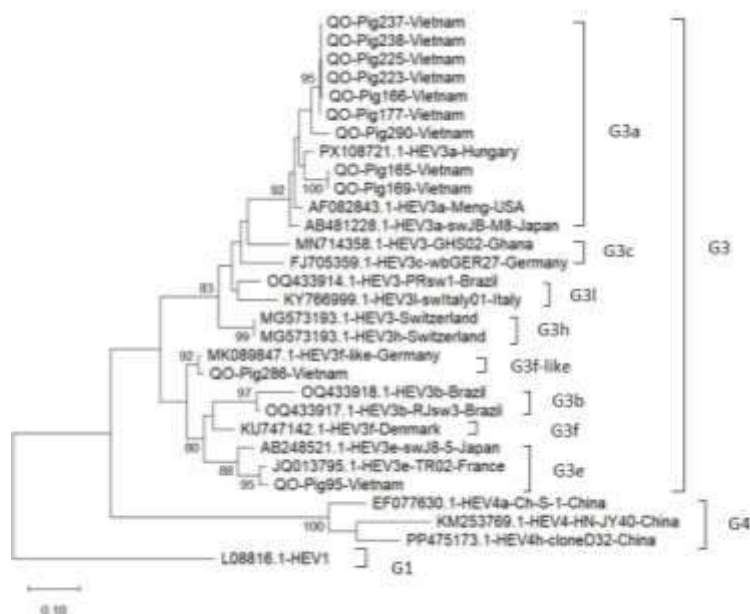
Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu cho thấy phản ứng Nested RT-PCR phát hiện HEV chỉ khuếch đại trên mẫu dương tính với HEV, trong khi không xuất hiện băng đặc hiệu ở các mẫu RNA của HCV, HIV, Dengue, Cúm A/B và mẫu chứng âm.

3.3. Ứng dụng quy trình Nested RT PCR xác định tỷ lệ nhiễm virus viêm gan E trên mẫu gan lợn

Ứng dụng phương pháp Nested RT-PCR đã tối ưu trên 298 mẫu gan lợn kết quả 24 mẫu (8,05%) được phát hiện dương tính với HEV. Trong đó có 11 mẫu dương tính với HEV được giải trình tự thành công. Một số mẫu giải trình tự không thành công do tải lượng RNA virus trong các mẫu này thấp, dẫn đến sản phẩm khuếch đại không đủ nồng độ cho phản ứng giải trình tự. Bên cạnh đó, một số mẫu tín hiệu giải trình tự Sanger yếu, chồng lấn, không thể đọc được trình tự chính xác.

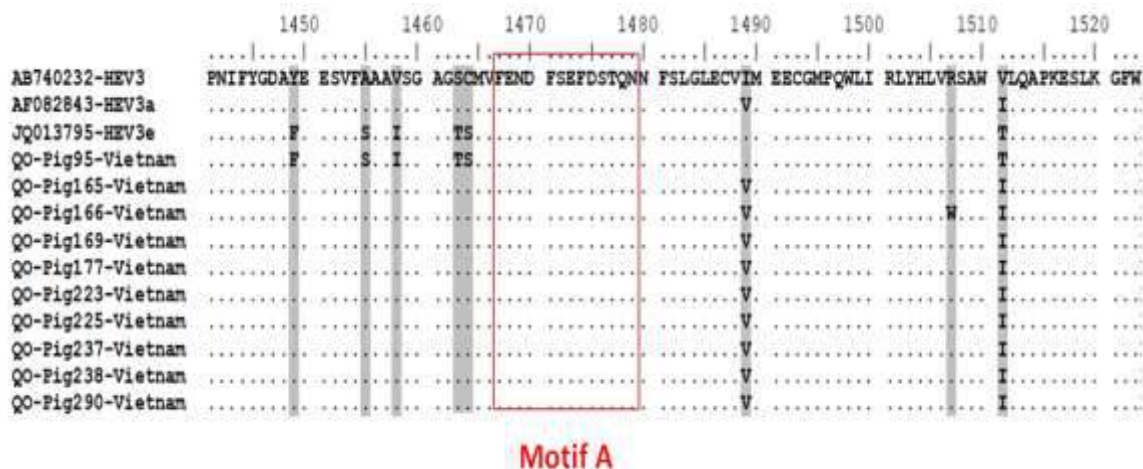
3.4. Phân tích cây phát sinh loài và đa dạng sinh học

Phân tích cây phát sinh chủng loài của 11 trình tự thu được thuộc vùng ORF1 cho thấy 11 chủng phân tích được đều thuộc kiểu gen HEV-3 (Hình 3). Phân tích các kiểu gen phụ (subtype) cho thấy 9/11 chủng thuộc subtype HEV-3a, 1/11 chủng thuộc subtype HEV-3e, và 1/11 chủng thuộc subtype HEV-3f-like.



Hình 3. Phân tích phát sinh chủng loài từ 11 chủng phân lập được.

Cây phát sinh loài phương pháp tối đa hóa khả năng xảy ra (maximum likelihood) được xây dựng với bootstrap 1000 lần lặp lại. Thanh bar phía dưới hiển thị khoảng cách di truyền (Hình 4).



Hình 4. Phân tích trình tự acid amin vùng RdRp từ đoạn 344 nucleotide của các chủng HEV.

Các dấu chấm (.) biểu thị vị trí giống với trình tự tham chiếu, các ký tự chữ cái biểu thị sự thay thế acid amin. Khung đỏ đánh dấu motif A - một vùng chức năng bảo tồn cao của RNA-dependent RNA polymerase, có vai trò quan trọng trong hoạt tính xúc tác của enzyme.

So sánh trình tự acid amin vùng RdRp (ORF1) của các chủng HEV phân lập tại Hà Nội với chủng tham chiếu HEV-3 (AB740232) cho thấy mức độ bảo tồn cao, đặc biệt motif A được bảo tồn hoàn toàn ở

tất cả các mẫu. Một số thay thế acid amin đơn lẻ được ghi nhận ở vùng lân cận nhưng không nằm trong các motif xúc tác chính, cho thấy đây nhiều khả năng là các biến dị tự nhiên và không ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của enzyme. Riêng mẫu 166 xuất hiện đột biến R1507W. Mẫu QO-286 vẫn được sử dụng trong phân tích cây phát sinh loài do trình tự thu được đủ độ dài và độ tương đồng để xác định mối quan hệ di truyền với các chủng tham chiếu. Tuy nhiên, mẫu này không được đưa vào

phân tích đột biến do chất lượng tín hiệu tại một số vị trí nucleotide chưa đảm bảo (đỉnh chồng lấn), dẫn đến độ tin cậy khi xác định biến đổi nucleotide không cao. Do đó, để đảm bảo tính chính xác của phân tích đột biến, mẫu QO-286 đã được loại khỏi bước phân tích này.

IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này, điều kiện tối ưu cho phản ứng Nested RT-PCR phát hiện virus viêm gan E được xác định là 56°C và thời gian kéo dài 50 giây cho vòng ngoài, trong khi vòng trong cho hiệu quả khuếch đại tốt nhất tại 54°C và thời gian kéo dài 40 giây. Các điều kiện này phù hợp với đặc điểm của cặp mồi sử dụng (20 - 22 bp, GC 45 - 50%) và đảm bảo hiệu suất cũng như độ đặc hiệu của phản ứng. Điểm khác biệt của nghiên cứu này là việc tối ưu bổ sung thời gian kéo dài, đặc biệt có ý nghĩa khi sử dụng DreamTaq Hot Start Master Mix, giúp cải thiện độ rõ nét của sản phẩm PCR.

Kết quả đánh giá cho thấy quy trình Nested RT-PCR phát hiện HEV có độ nhạy 5,32 copies/phản ứng. Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của Rahil và cộng sự (CS), với độ nhạy kỹ thuật là 2×10^1 copies/phản ứng⁶. Độ đặc hiệu của quy trình được khẳng định thông qua việc không xuất hiện băng khuếch đại không đặc hiệu ở các mẫu chứng âm và mẫu của các loài virus khác. Điều đó khẳng định Nested RT-PCR là một kỹ thuật đáng tin cậy để phát hiện HEV trong các mẫu có nồng độ virus thấp, đồng thời nhấn mạnh vai trò quan trọng của việc tối ưu điều kiện phản ứng nhằm đảm bảo độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp.

Tỷ lệ mẫu gan lợn dương tính với HEV được xác định bằng quy trình Nested RT-PCR đã tối ưu là 8,05%. Tỷ lệ nhiễm HEV của nghiên cứu thấp hơn của tác giả Nghiêm Xuân Hoàn và CS (12,4%)⁷ nhưng cao hơn nghiên cứu của Lê Chí Cao và CS tại miền Trung và miền Nam Việt Nam (4%)⁸. So sánh với các vùng lân cận nước ta, tỷ lệ nhiễm HEV trên lợn tại Việt Nam cao hơn một số nước như Thái Lan (3,93%)⁹, Nhật Bản (4,9%)¹⁰ và Trung Quốc (6,1%)¹¹. Sự khác biệt giữa các nghiên cứu có thể liên quan đến vùng địa lý, điều kiện chăn nuôi, quy trình giết

mổ, thiết kế nghiên cứu và độ nhạy của phương pháp phát hiện HEV.

Phân tích phát sinh loài dựa trên các trình tự gen thu được bằng phương pháp giải trình tự Sanger cho thấy tất cả các chủng HEV trong nghiên cứu này đều thuộc kiểu gen HEV-3. Trong số 11 mẫu được phân tích, 9 mẫu thuộc phân nhóm HEV-3a, 1 mẫu thuộc phân nhóm HEV-3f-like và 1 mẫu thuộc phân nhóm HEV-3e. Kết quả này cho thấy sự tương đồng về nguồn lưu hành và đặc điểm di truyền của các chủng HEV tại Việt Nam. Phát hiện này phù hợp với các nghiên cứu trước đây trong nước, trong đó HEV-3 được ghi nhận là kiểu gen lưu hành chủ đạo, với sự xuất hiện rải rác của các kiểu gen phụ như HEV-3a, HEV-3b, HEV-3f hoặc HEV-4b^{9,10}. Đáng chú ý, nghiên cứu này lần đầu tiên ghi nhận sự xuất hiện của phân nhóm HEV-3e trên lợn nhà tại Việt Nam. Trước đây, HEV-3e chủ yếu được báo cáo lưu hành tại các quốc gia châu Âu, trong khi các phân nhóm HEV-3a, HEV-3b và HEV-3f phổ biến hơn tại châu Á¹². Sự xuất hiện của HEV-3e trong nghiên cứu có thể liên quan đến quá trình du nhập thông qua nhập khẩu lợn giống hoặc sản phẩm chăn nuôi trong bối cảnh hội nhập. Chủng HEV-3e phát hiện trong nghiên cứu (QO-Pig95-Vietnam) có mức độ tương đồng nucleotide cao (96%) với chủng HEV phân lập từ người mang mã số JQ013795 trên vùng RdRp của ORF1. Mức độ tương đồng di truyền cao giữa các chủng HEV phân lập từ lợn và từ người cung cấp bằng chứng phân tử cho thấy sự gần gũi về mặt di truyền giữa các chủng HEV phân lập từ lợn và người; tuy nhiên, do phân tích chỉ dựa trên một vùng gen tương đối bảo tồn, cần có thêm dữ liệu từ các vùng gen khác hoặc toàn bộ hệ gen để khẳng định rõ hơn mối liên hệ dịch tễ giữa các chủng. Các thay thế acid amin trong vùng RdRp của các chủng HEV phân lập tại Việt Nam phản ánh động lực tiến hóa và khả năng thích nghi của virus trong tự nhiên, trong đó đột biến R1507W thể hiện sự khác biệt so với các mẫu còn lại. Do chưa có thí nghiệm chức năng, đột biến này trước mắt mang ý nghĩa mô tả và cung cấp thêm dữ liệu về tính đa dạng di truyền của HEV, cần tiếp tục được làm rõ trong các nghiên cứu tiếp theo.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và tối ưu thành công quy trình Nested RT-PCR có độ nhạy và độ đặc hiệu cao để phát hiện virus viêm gan E trên mẫu gan lợn. Tuy nhiên, cần tiếp tục tối ưu thêm một số điều kiện phản ứng nhằm hoàn thiện quy trình hơn, đồng thời thực hiện đánh giá độ lặp lại và độ tái lặp để đảm bảo tính ổn định và độ tin cậy của phương pháp. Kết quả cho thấy HEV lưu hành với tỷ lệ đáng kể trong quần thể lợn khảo sát và chủ yếu thuộc kiểu gen HEV-3. Phân tích phát sinh loài và biến đổi di truyền cho thấy mối liên hệ chặt chẽ giữa các chủng HEV từ lợn và từ người, củng cố bằng chứng về nguy cơ lây truyền HEV từ động vật sang người. Những phát hiện này nhấn mạnh vai trò của lợn như ổ chứa quan trọng của HEV và sự cần thiết của các chiến lược giám sát HEV và các nghiên cứu chuyên sâu trong tương lai về vấn đề này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. LeDesma R, Nimgaonkar I, Ploss A (2019) *Hepatitis E Virus Replication*. *Viruses* 11(8): 8. doi: 10.3390/v11080719
2. Hepatitis E | CDC Yellow Book 2024. Accessed January 7, 2025. <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/hepatitis-e>
3. Haase JA, Schlienkamp S, Ring JJ, Steinmann E (2025) *Transmission patterns of hepatitis E virus*. *Curr Opin Virol* 70: 101451. doi:10.1016/j.coviro.2025.101451
4. Mirzaev UK, Yoshinaga Y, Baynazarov M et al (2025) *Diagnostic accuracy of hepatitis E virus antibody tests: A comprehensive meta-analysis*. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol* 55(3): 346-362. doi:10.1111/hepr.14132
5. Choi C, Ha SK, Chae C (2004) *Development of nested RT-PCR for the detection of swine hepatitis E virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues and comparison with in situ hybridization*. *J Virol Methods*. 115(1): 67-71. doi: 10.1016/j.jviromet.2003.09.007
6. Parsa R, Adibzadeh S, Behzad Behbahani A et al (2016) *Detection of Hepatitis E Virus Genotype 1 Among Blood Donors From Southwest of Iran*. *Hepat Mon* 16(6): 34202. doi:10.5812/hepatmon.34202
7. Hoan NX, Huy PX, Sy BT et al (2019) *High Hepatitis E virus (HEV) Positivity Among Domestic Pigs and Risk of HEV Infection of Individuals Occupationally Exposed to Pigs and Pork Meat in Hanoi, Vietnam*. *Open Forum Infect Dis* 6(9): ofz306. doi:10.1093/ofid/ofz306
8. Cao LC, Ha LNN, Giang TT et al (2024) *Characterization of zoonotic hepatitis E virus in domestic pigs and wild boar in Vietnam: Implications for public health*. *One Health* 19: 100857. doi:10.1016/j.onehlt.2024.100857
9. Intharasongkroh D, Sa-Nguanmoo P, Tuanthap S, et al (2017) *Hepatitis E Virus in Pork and Variety Meats Sold in Fresh Markets*. *Food Environ Virol* 9(1): 45-53. doi:10.1007/s12560-016-9258-0
10. Okano H, Takahashi M, Isono Y et al (2014) *Characterization of sporadic acute hepatitis E and comparison of hepatitis E virus genomes in acute hepatitis patients and pig liver sold as food in Mie, Japan*. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol* 44(10): 63-76. doi:10.1111/hepr.12216
11. Geng Y, Zhao C, Guo T et al (2019) *Detection of Hepatitis E Virus in Raw Pork and Pig Viscera As Food in Hebei Province of China*. *Foodborne Pathog Dis*. 16(5): fpd.2018.2572. doi:10.1089/fpd.2018.2572
12. Nicot F, Dimeglio C, Miguere M et al (2021) *Classification of the Zoonotic Hepatitis E Virus Genotype 3 Into Distinct Subgenotypes*. *Front Microbiol*. 2021;11. doi:10.3389/fmicb.2020.634430