Vietnam J. Agri. Sci. 2025, Vol. 23, No. 1: 27-35

Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2025, 23(1): 27-35
www.vnua.edu.vn

TỐI ƯU PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ MẪU NƯỚC BỌT ĐỂ NÂNG CAO ĐỘ NHẠY TRONG CHẨN ĐOÁN BỆNH DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI

Lê Trần Hoàng Anh, Bùi Lệ Thủy, Đặng Thị Hằng, Trần Thị Mỹ An, Đàm Quốc Khánh, Nguyễn Thị Thảo, Mai Thị Ngân*

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

**Tác giả liên hệ: mtngan@vnua.edu.vn*

Ngày nhận bài: 05.10.2024 Ngày chấp nhận đăng: 17.01.2024

TÓM TẮT

Dịch tả lợn châu Phi (African swine fever - ASF) là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm với tỷ lệ tử vong lên đến 100%. Phương pháp thu thập mẫu nước bọt trong chẩn đoán để giám sát ASF có nhiều ưu điểm nhưng tải lượng virus trong mẫu nước bọt thấp nên ảnh hưởng đến độ nhạy của các phương pháp chẩn đoán. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm cải tiến phương pháp xử lý mẫu nước bọt để tăng độ nhạy trong chẩn đoán bệnh. Semi-alkaline proteinase (SAP) và Polyethylene glycol (PEG) đã được sử dụng để xử lý mẫu nước bọt. Tỷ lệ tối ưu về thể tích của dung dịch SAP và PEG so với mẫu nước bọt tương ứng là 1:3 và 1:0,4. Kết quả chẩn đoán ASFV từ mẫu nước bọt sau khi xử lý bằng SAP và PEG cho thấy đã cải thiện độ nhạy của phản ứng realtime PCR, cụ thể từ 12 mẫu thực địa có 7/12 mẫu cho kết quả dương tính sau khi xử lý bằng SAP và PEG, chỉ có 4/12 mẫu dương tính khi không xử lý bằng SAP và PEG. Như vậy, việc ứng dụng phương pháp xử lý mẫu nước bọt đã làm tăng độ nhạy của phương pháp real-time PCR trong chẩn đoán ASF, hứa hẹn là công cụ hỗ trợ hữu ích cho công tác giám sát ASF.

Từ khoá: ASF, real-time PCR, mẫu nước bọt, phương pháp xử lý.

Optimization of Saliva Sample Processing to Increase Sensitivity in Diagnosis of African Swine Fever

ABSTRACT

African swine fever (ASF) is a dangerous infectious disease with a mortality rate of up to 100%. Collecting saliva samples for diagnosis to monitor ASF has many advantages, but the low viral load in saliva samples, it affects the sensitivity of diagnostic methods. This study improved the saliva sample processing to increase the sensitivity of the diagnosis method. Semi-alkaline proteinase (SAP) and Polyethylene glycol (PEG) were used to process saliva samples. The optimal volume ratio of SAP and PEG solutions to saliva samples was 1:3 and 1:0.4, respectively. The results of ASFV diagnosis from saliva samples after processing with SAP and PEG showed increased sensitivity of real-time PCR reaction. Of 12 field samples, 7/12 samples gave positive results after processing with SAP and PEG compared to only 4/12 positive samples when not processed with SAP and PEG. Thus, applying the saliva sample processing increased the sensitivity of the real-time PCR method in ASF diagnosis, promising to be a useful support tool for ASF surveillance.

Keywords: African swine fever, real-time PCR, saliva samples, processing method.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dịch tả lợn châu Phi (African swine fever - ASF) do virus ASF (ASFV) gây ra, là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm với tỷ lệ tử vong cao lên đến 100% (Dixon & cs., 2013). ASF xuất hiện lần đầu ở Kenya năm 1921 và nhanh chóng lan ra một số quốc gia châu Phi. Tính đến tháng 8 năm 2019, nông dân ở 51 quốc gia đã phải gánh chịu tác động của ASF, với khoảng một phần tư số lợn trên toàn thế giới bị tiêu hủy (Gregorio, 2020). Tại Việt Nam, sự bùng phát của ASF vào năm 2019 đã gây tổn thất nặng nề đối với ngành chăn nuôi. Chỉ sau năm tháng xuất hiện, bệnh đã xảy ra ở 62 tỉnh thành với gần 6 triệu con lợn bị tiêu huỷ, chiếm hơn 20% tổng đàn của cả nước (Nguyen-Thi & cs., 2021). Vì ASFV có sức đề kháng cao nên nguy cơ tái phát và lây lan trên diện rộng vẫn luôn hiện hữu, từ đó ảnh hưởng nghiêm trọng đến việc tổ chức tái đàn, tăng đàn và bảo đảm nguồn cung. Mặc dù hiện nay đã có hai loại vacxin phòng bệnh là NAVET-ASFVAC của Công ty Cổ phần Thuốc thú y Trung ương NAVETCO và AVAC ASF LIVE của Công ty Cổ phần AVAC Việt Nam đã được lưu hành, tuy nhiên tỷ lệ tiêm phòng còn thấp (Nguyễn Hưởng, 2024) nên việc chẩn đoán sớm và chính xác là rất cần thiết cho việc giám sát và tiến tới khống chế bệnh.

Mặc dù hiện tại việc chẩn đoán ASF chủ yếu thông qua các loại mẫu xâm lấn như mẫu máu, mẫu mô, mẫu huyết thanh… có độ chính xác cao nhưng còn tồn tại nhiều hạn chế như gây căng thẳng cho động vật khi thu mẫu (Martínez-Miró & cs., 2016), khó khăn và có thể nguy hiểm cho cán bộ lấy mẫu (do nguy cơ từ xilanh) và khả năng phát tán mầm bệnh do tải lượng virus trong các loại mẫu này cao. Trong khi đó, thời điểm phát hiện ASFV ở nước bọt là cùng thời điểm phát hiện ASFV trong máu, thậm chí có thể sớm hơn tới 3 ngày (Gallardo & cs., 2021). Do đó, việc chẩn đoán sớm bệnh khi lợn chưa có triệu chứng lâm sàng từ mẫu không xâm lấn (nước bọt) có ý nghĩa lớn trong công tác giám sát ASF, giúp giảm thiểu căng thẳng cho động vật. Một số nghiên cứu đã sử dụng mẫu nước bọt trong chẩn đoán ASF (Beemer & cs., 2019; Goonewardene & cs., 2021; Joseph & cs., 2024), tuy nhiên, độ nhạy của việc chẩn đoán bệnh từ mẫu nước bọt chưa cao vì tải lượng virus trong nước bọt thấp, đồng thời còn bị ảnh hưởng bởi sự hiện diện của nhiều tạp chất như thức ăn, enzyme tiêu hóa… (Czumbel & cs., 2020; Patricia & cs., 2008).

Một số nghiên cứu đã ứng dụng các hoá chất khác nhau để xử lý mẫu nước bọt như sử dụng enzyme ly giải đờm semi-alkaline proteinase (SAP) để cắt liên kết S-S trong chất nhầy của đờm và nước bọt, từ đó làm giảm tính nhầy của dung dịch, giúp nâng cao độ nhạy trong chẩn đoán SARS-CoV-2 (Yamazaki & cs., 2021) và *Mycobacterium tuberculosis* (Saitoh & Yamane, 1999; Sakashita & cs., 2020; Wang & cs., 2020). Bên cạnh đó, polyethylene glycol (PEG) một hợp chất có khả năng kết tủa protein cũng đã được sử dụng nhằm làm sa lắng các hạt virus để bảo tồn lượng virus có trong mẫu trong chẩn đoán SARS-CoV-2 từ nước thải (Hata & cs., 2021; Kumar & cs., 2020; Torii & cs., 2021; Wu & cs., 2020). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào cải tiến quy trình xử lý mẫu nước bọt trong chẩn đoán ASF. Do đó, mục tiêu nghiên cứu của chúng tôi là phát triển phương pháp xử lý mẫu nước bọt nhằm tăng độ nhạy trong chẩn đoán ASF có ý nghĩa lớn và rất cần thiết, hỗ trợ cho công tác chẩn đoán sớm để giám sát bệnh, góp phần giảm thiểu tác động của bệnh đối với ngành chăn nuôi.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Virus dịch tả lợn châu Phi chủng ASF/HY01/2019 (GenBank mã số: MK554698) phân lập từ lợn bệnh trong đợt dịch ASF đầu tiên tại Việt Nam vào tháng 2 năm 2019 (Le & cs., 2019), đã được sử dụng cho các thí nghiệm tối ưu với hiệu giá là $10^{6,5}$ $TCID_{50}$.

Mẫu nước bọt được thu thập từ lợn khoẻ mạnh từ hai trại lợn thịt tại Phú Thọ và Thái Bình năm 2022-2023 đã có xác nhận nhiễm dịch tả lợn châu Phi từ một ô chuồng trong trại và được bảo quản ở tủ -80°C cho đến khi sử dụng.

Hóa chất để xử lý mẫu nước bọt bao gồm Sputazyme - Semi-alkaline proteinase (SAP) (Kyokuto, Tokyo, Nhật Bản) và Polyethylene glycol (PEG) (Nacalai Tesque, Kyoto, Nhật Bản). Dung dịch PEG được pha bằng cách hòa tan 30g PEG 6000 và 14,61g NaCl trong 100ml nước cất rồi khuấy nhiệt ở 70°C đến khi tan hoàn toàn và hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút.

Hoá chất dùng cho tách chiết DNA là bộ kit DNeasy (Qiagen, Maryland, Hoa Kỳ) và hoá chất dùng cho phương pháp real-time PCR là bộ kit qPCR mix (Takara Bio Inc., Otsu, Japan).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chiết tách DNA

Quy trình chiết tách DNA được thực hiện theo nghiên cứu trước đây đã công bố nhằm giảm độ nhớt của mẫu nước bọt và ngăn ngừa tắc nghẽn cột chiết tách DNA (Yamazaki & cs., 2021). Cụ thể 150µl mẫu nước bọt được pha loãng theo tỷ lệ 1:3 với 450µl dung dịch PBS, ly tâm ở 15.600g trong 30 phút và thu 150µl dịch nổi để chiết tách DNA bằng bộ kit DNeasy theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Qiagen, Maryland, Hoa Kỳ). DNA tổng số được hoà tan trong 50µl nước không có nuclease và bảo quản ở -80°C.

2.2.2. Xử lý mẫu nước bọt

Để bảo tồn lượng virus có trong mẫu nước bọt và tăng tải lượng ASFV trong chẩn đoán, chúng tôi đã tiến hành xử lý mẫu nước bọt trước khi chiết tách DNA. Quá trình này bao gồm việc tối ưu lượng mẫu chẩn đoán cũng như tỷ lệ giữa mẫu và các hóa chất SAP, PEG nhằm nâng cao hiệu suất thu hồi virus. ASFV chủng ASF/HY01/2019 đã được pha loãng vào mẫu nước bọt sau đó được sử dụng cho việc tối quy trình xử lý mẫu. Mẫu nước bọt sử dụng trong các nội dung tối ưu được thu ở lợn khoẻ mạnh từ trại lợn thịt tại Hoà Bình, bằng cách treo dây thừng sạch ở đầu ô chuồng ở vị trí ngang với vai của lợn vào buổi sáng, để cho lợn nhai từ 20-30 phút sau đó sử dụng túi và ống sạch để thu dịch nước bọt từ dây thừng.

Quy trình xử lý mẫu nước bọt được thực hiện theo các bước sau: 10ml mẫu nước bọt được trộn với 30ml dung dịch SAP 1X và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Sau đó, ly tâm ở 15.557g trong 30 phút. Tiến hành thu 32ml dịch nổi và trộn đều với 12,8ml PEG rồi ly tâm ở 8.000g trong 20 phút. Sau khi ly tâm, bỏ phần dung dịch nổi và giữ lại cặn. Cuối cùng, bổ sung 150µl PBS 1X để hòa tan cặn, thu dịch sau khi đã hoà tan để chiết tách DNA bằng bộ kit DNeasy theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA tổng số được hoà tan trong 50µl nước không có nuclease và được bảo quản ở -80°C cho đến khi sử dụng.

Tối ưu thể tích mẫu nước bọt

Quy trình tối ưu thể tích mẫu được thực hiện như sau: trộn đều 1ml dung dịch virus chủng ASFV ASF/HY01/2019 vào 20ml mẫu nước bọt và chia thành ba ống với thể tích khác nhau lần lượt là 1ml, 5ml và 10ml mẫu. Sau đó, tất cả các ống mẫu đều được xử lý và chiết tách DNA theo quy trình giống nhau như đã được mô tả ở trên. DNA thu được từ các ống mẫu có thể tích khác nhau được sử dụng để chẩn đoán ASFV bằng phương pháp real-time PCR.

Tối ưu tỷ lệ hóa chất SAP

Quy trình tối ưu tỷ lệ mẫu và SAP được thực hiện như sau: trộn đều 1ml dung dịch virus chủng ASFV ASF/HY01/2019 vào mẫu nước bọt và chia thành ba ống có thể tích mẫu giống nhau là 10ml. Nghiên cứu của Yamazaki & cs. (2021) đã sử dụng tỷ lệ mẫu và SAP là 1:3 để chẩn đoán SARS-CoV-2 từ mẫu nước bọt, tuy nhiên chúng tôi muốn đánh giá các tỷ lệ nước bọt: mẫu khác nhau để lựa chọn tỷ lệ tối ưu với độ nhày mẫu nước bọt của lợn nên các mẫu tiếp tục được trộn với SAP theo các tỷ lệ khác nhau là 1:1, 1:2 và 1:3. Sau đó, các mẫu đều được xử lý và chiết tách DNA theo quy trình giống nhau như đã được mô tả ở trên. DNA thu được từ các ống mẫu có tỷ lệ khác nhau được sử dụng để chẩn đoán ASFV bằng phương pháp real-time PCR.

Tối ưu tỷ lệ hóa chất PEG

Quy trình tối ưu tỷ lệ mẫu và PEG được thực hiện như sau: 30ml dung dịch mẫu nước bọt được trộn đều với 1ml ASFV chủng ASF/HY01/2019 và xử lý bằng SAP với tỷ lệ đã được tối ưu, sau đó tiến hành ly tâm và chuyển 32ml dịch nổi sang ba ống có chứa PEG với tỷ lệ mẫu và PEG khác nhau lần lượt là 1:0,5; 1:0,4 và 1:0,333 dựa theo nghiên cứu của Yamazaki & cs. (2021) đã sử dụng tỷ lệ mẫu và SAP là 1:0,4 để chẩn đoán SARS-CoV-2 từ mẫu nước bọt. Sau đó, các ống mẫu đều được xử lý và chiết tách DNA theo quy trình giống nhau như đã được mô tả ở trên. DNA thu được từ các ống mẫu có tỷ lệ khác nhau được sử dụng để chẩn đoán ASFV bằng phương pháp real-time PCR.

2.2.3. Phương pháp real-time PCR

Phản ứng real-time PCR được thực hiện bằng hệ thống real-time PCR LineGene Mini S (Bioer, Trung Quốc). Quy trình này sử dụng hai đoạn mồi và một đầu dò, bao gồm: mồi xuôi (5’-TGCTCATGGTATCAATCTTATCG -3’), mồi ngược (5’-CCACTGGGTTGGTATTCCTC-3’) và đầu dò (5’-FAM-TTCCATCAAAGTTCTGCAGCT CTT-TAMRA-3’) theo nghiên cứu của Tignon &

cs. (2011). Chu trình nhiệt của phản ứng real-time PCR như sau: 95°C trong 3 phút, 45 chu kỳ ở 95°C trong 10 giây và 60°C 35 giây. Sau quá trình khuếch đại, giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct - cycle threshold) được xác định. Trong nghiên cứu này, các mẫu được xác định là dương tính khi giá trị trung bình cho giá trị Ct < 37,0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

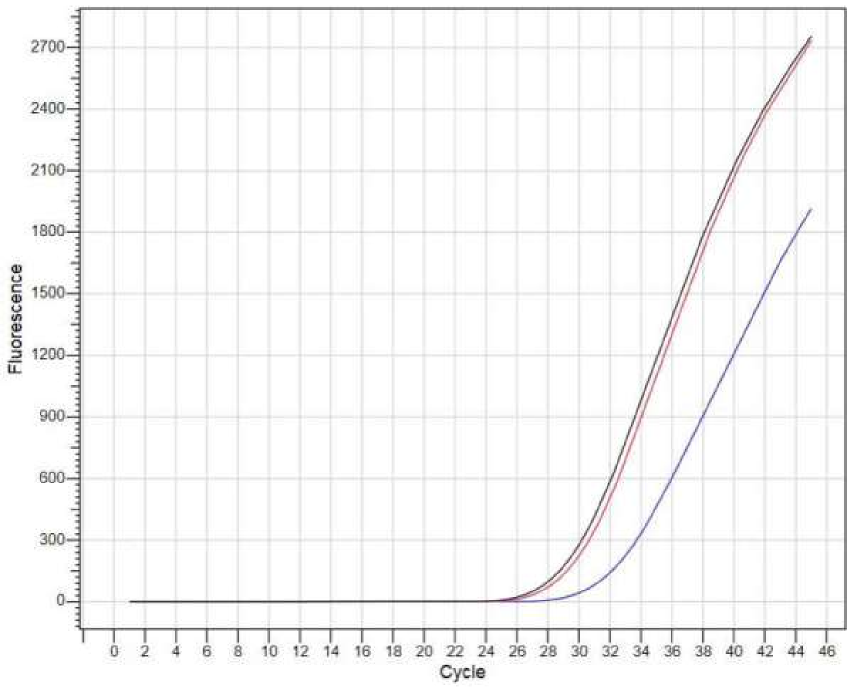
3.1. Kết quả tối ưu thể tích mẫu nước bọt trong chẩn đoán ASF

Để đánh giá thể tích mẫu nước bọt tối ưu cho chẩn đoán ASF, ba ống mẫu nước bọt với các thể tích khác nhau: 1ml, 5ml và 10ml đều được xử lý mẫu và chiết tách DNA theo quy trình xử lý bằng SAP, PEG với tỷ lệ tương đương thể tích mẫu nước bọt giống nhau. DNA thu được từ các ống mẫu có thể tích khác nhau được sử dụng để chẩn đoán ASFV bằng phương pháp real-time PCR.

Hình 1 cho thấy cả ba thể tích mẫu đều cho kết quả dương tính với ASFV. Tuy nhiên, ở ống mẫu có thể tích là 5ml và 10ml cho giá trị Ct thấp hơn, với Ct lần lượt là 30,43 và 29,7 (đường khuếch đại màu đỏ và màu đen), trong khi ống mẫu có thể tích là 1ml có giá trị Ct cao hơn 33,56 (đường khuếch đại màu xanh) (Hình 1). Nồng độ virus ở hai ống mẫu có thể tích là 5ml và 10ml có sự sai khác không lớn mặc dù lượng mẫu là gấp đôi. Do đó, việc sử dụng 5-10ml mẫu nước bọt để chẩn đoán ASF là hoàn toàn phù hợp và khả thi vì lượng mẫu nước bọt thu được trong quá trình lấy mẫu thực tế thường dao động từ 5-20ml.

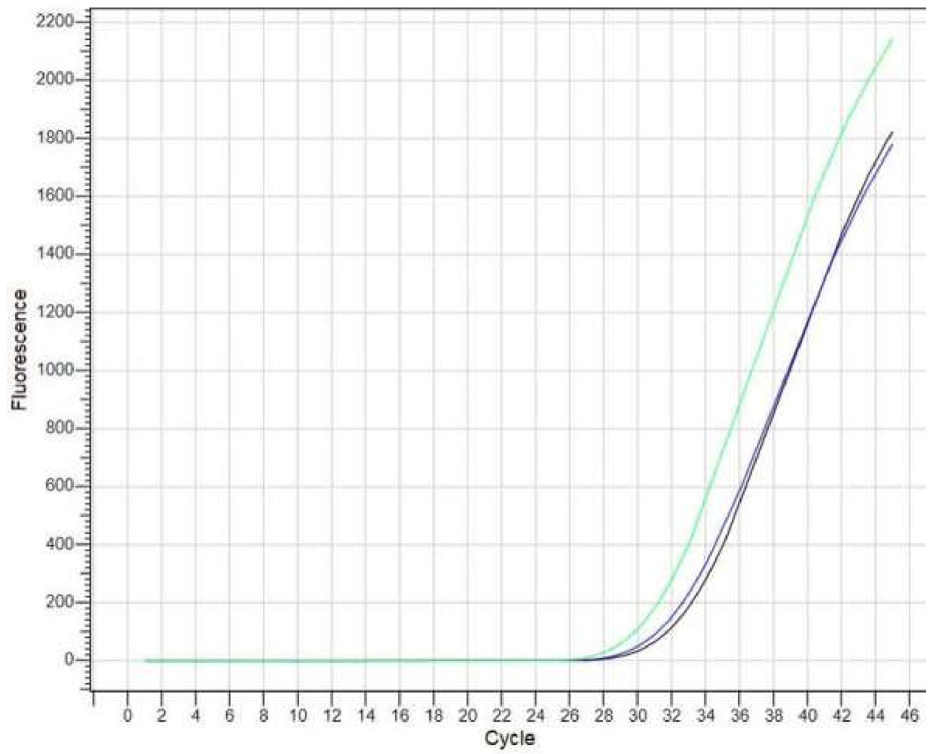
3.2. Kết quả tối ưu tỷ lệ mẫu và hóa chất SAP

Ba ống mẫu nước bọt có thể tích mẫu giống nhau được trộn với SAP 1X theo ba tỷ lệ mẫu nước bọt: SAP khác nhau lần lượt là 1:1, 1:2 và 1:3, sau đó đều được xử lý mẫu với PEG với cùng tỷ lệ và chiết tách DNA theo quy trình giống nhau. DNA thu được từ các ống mẫu có tỷ lệ khác nhau được sử dụng để chẩn đoán ASFV bằng phương pháp real-time PCR. Kết quả tối ưu tỷ lệ mẫu nước bọt và SAP 1X trong chẩn đoán ASF được thể hiện ở hình 2.



Ghi chú: Đường khuếch đại màu xanh, màu đỏ và màu đen lần lượt là đường khuếch đại từ các ống mẫu có thể tích 1ml, 5ml và 10ml.

Hình 1. Kết quả tối ưu thể tích mẫu nước bọt trong chẩn đoán ASF bằng phương pháp real-time PCR



Ghi chú: Đường khuếch đại màu đen, màu xanh dương và màu xanh lá lần lượt là đường khuếch đại từ các ống mẫu có tỷ lệ thể tích mẫu với SAP lần lượt là 1:1, 1:2 và 1:3.

Hình 2. Kết quả tối ưu tỷ lệ mẫu nước bọt và hóa chất SAP trong chẩn đoán ASF bằng phương pháp real-time PCR

Hình 2 cho thấy ở cả ba tỷ lệ mẫu với SAP đều cho kết quả chẩn đoán dương tính với ASFV. Đặc biệt, tỷ lệ mẫu và SAP 1:3 cho kết quả dương tính sớm nhất với giá trị Ct là 31,29 (đường khuếch đại màu xanh) (Hình 2), trong khi tỷ lệ 1:1 và 1:2 có giá trị Ct lần lượt là 33,26 và 32,74. Như vậy, tỷ lệ mẫu và SAP 1:3 cho kết quả khuếch đại dương tính sớm hơn so với hai tỷ lệ còn lại. Do đó, tỷ lệ mẫu và SAP tối ưu trong nghiên cứu này là 1:3. Theo chúng tôi, tỷ lệ SAP cao giúp làm giảm tối đa tính nhày của mẫu nước bọt do các tạp chất có trong nước bọt, vì vậy, đã làm tăng độ nhạy của phương pháp chẩn đoán. SAP cũng đã được sử dụng hiệu quả để làm tăng độ nhạy của chẩn đoán *Mycobacterium tuberculosis* từ đờm (Saitoh & Yamane, 1999; Sakashita & cs., 2020; Wang & cs., 2020). Kết quả tối ưu về tỷ lệ mẫu và hoá chất SAP trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Yamazaki & cs. (2021) trong chẩn đoán SARS-CoV-2 và Sakashita & cs. (2020), Wang & cs. (2020) trong xét nghiệm trực khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* từ mẫu nước bọt, sử dụng tỷ lệ mẫu: SAP là 1:3.

3.3. Kết quả tối ưu tỷ lệ mẫu và hóa chất PEG

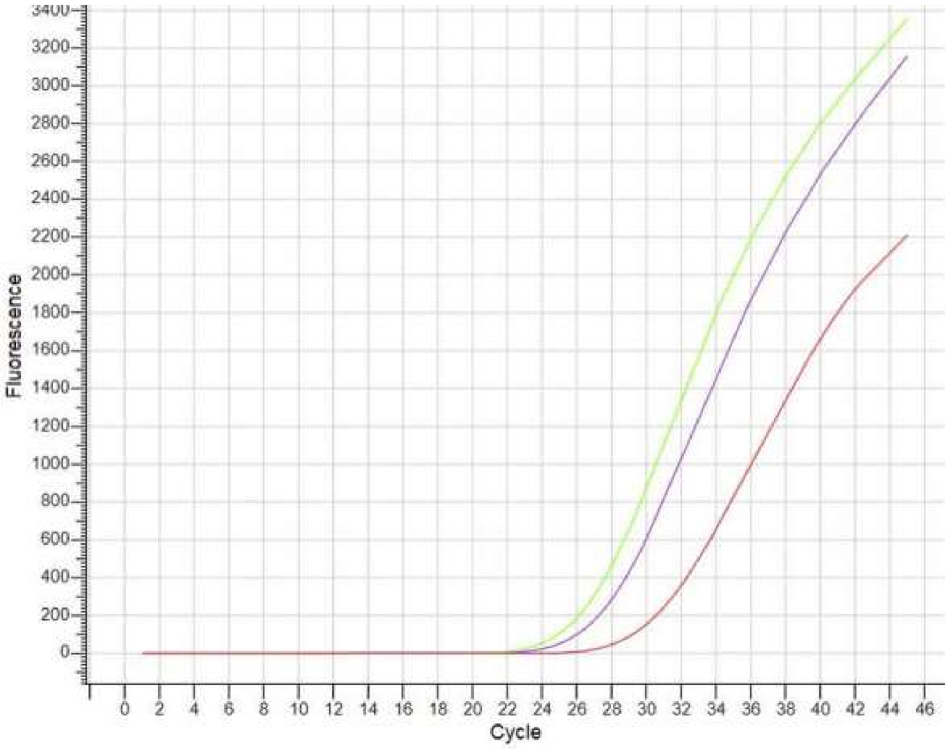
Để tối ưu tỷ lệ hóa chất PEG, dung dịch mẫu nước bọt sau khi đã được xử lý bằng SAP với tỷ lệ đã tối ưu là 1:3 rồi tiến hành ly tâm, thu dịch nổi và trộn với PEG ở các tỷ lệ thể tích mẫu và PEG khác nhau lần lượt là 1:0,5; 1:0,4 và 1:0,333. Sau đó các ống mẫu đều được xử lý và chiết tách DNA theo quy trình giống nhau. DNA thu được từ các ống mẫu có tỷ lệ với PEG khác nhau được sử dụng để chẩn đoán ASFV bằng phương pháp real-time PCR.

Kết quả tối ưu tỷ lệ mẫu nước bọt và dung dịch PEG trong chẩn đoán ASF được thể hiện ở hình 3. Tất cả tỷ lệ mẫu và PEG đều cho kết quả dương tính với ASFV. Ống có tỷ lệ mẫu với PEG là 1:0,4 cho kết quả khuếch đại dương tính sớm nhất với giá trị Ct là 26,2 (đường khuếch đại màu xanh) (Hình 3), trong khi ở ống có tỷ lệ

1:0,5 và 1:0,333 có giá trị Ct lần lượt là 27,33 và 30,65. Do đó, tỷ lệ mẫu và PEG tương ứng là 1:0,4 được xác định là tỷ lệ tối ưu trong nghiên cứu này, điều này có thể là do ở tỷ lệ 1:0,4 có lượng PEG vừa đủ để kết tủa lượng virus có trong thể tích mẫu nên hiệu suất cô đặc virus đạt cao nhất. Nghiên cứu của Yamazaki & cs. (2022) trong xét nghiệm virus SARS-CoV-2 từ mẫu nước bọt cũng sử dụng tỷ lệ mẫu nước bọt và PEG là 1:0,4. Nghiên cứu của Hata & cs. (2021), Kumar & cs. (2020), Torii & cs. (2021) và Wu & cs. (2020) cũng chỉ ra PEG là hóa chất hiệu quả trong kết tủa virus từ các mẫu lỏng để nâng cao độ nhạy trong xét nghiệm chẩn đoán. Như vậy, áp dụng tỷ lệ này sẽ giúp tiết kiệm hóa chất và làm tăng độ nhạy của xét nghiệm. Chúng tôi đã tiến hành so sánh giữa việc trộn mẫu với PEG rồi ly tâm thu cặn ngay với việc trộn mẫu với PEG rồi ủ qua đêm ở 4°C rồi mới tiến hành ly tâm thu cặn, tuy nhiên kết quả khuếch đại là tương đương nhau (kết quả không hiển thị). Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành ly tâm thu cặn ngay sau khi trộn mẫu với PEG để tiết kiệm thời gian cho quá trình xử lý mẫu nước bọt.

3.4. Ứng dụng phương pháp xử lý mẫu nước bọt trong chẩn đoán ASF từ mẫu thực địa

Sau khi tối ưu được quy trình xử lý mẫu nước bọt nhằm tăng độ nhạy của phương pháp chẩn đoán ASF từ mẫu nước bọt, chúng tôi tiến hành ứng dụng phương pháp xử lý mẫu nước bọt đã cải tiến để chẩn đoán ASF từ 12 mẫu nước bọt thu được từ trại nghi nhiễm ASF để đánh giá hiệu quả của quy trình tối ưu. Đây là những mẫu được thu thập từ những con lợn chưa có triệu chứng lâm sàng của ASF. Mỗi mẫu được chia thành hai ống khác nhau để thực hiện theo hai quy trình: quy trình chiết tách DNA tham chiếu (nhóm đối chứng) và quy trình xử lý mẫu nước bọt trước khi chiết tách DNA (nhóm thí nghiệm). Sau đó, DNA thu được ở cả hai nhóm được sử dụng để chẩn đoán ASFV bằng phương pháp real-time PCR.

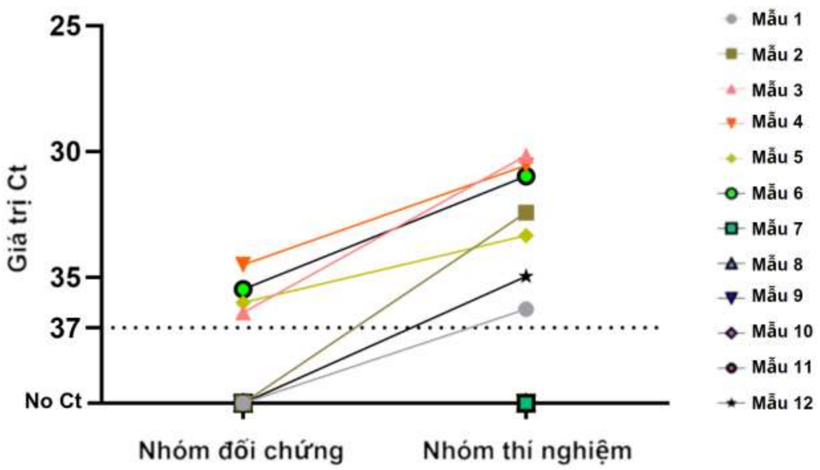


Ghi chú: Đường khuếch đại màu tím, màu xanh và màu đỏ lần lượt là đường khuếch đại từ các ống mẫu có tỷ lệ thể tích mẫu với PEG lần lượt là 1:0,5, 1:0,4 và 1:0,333.

Hình 3. Kết quả tối ưu tỷ lệ mẫu nước bọt và hóa chất PEG trong chẩn đoán ASF bằng phương pháp real-time PCR

Bảng 1. Kết quả chẩn đoán ASF từ mẫu nước bọt bằng phương pháp real-time PCR

Mẫu	Giá trị Ct của nhóm đối chứng	Giá trị Ct của nhóm thí nghiệm
1	-	36,26
2	-	32,42
3	36,39	30,16
4	34,49	30,55
5	35,99	33,33
6	35,47	30,97
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	34,95



Hình 4. Giá trị Ct của nhóm đối chứng và nhóm thí nghiệm trong chẩn đoán ASF từ mẫu nước bọt bằng phương pháp real-time PCR

Kết quả thu được được ở bảng 1 và hình 4 cho thấy Ứng dụng xử lý mẫu nước bọt trong chẩn đoán ASF từ 12 mẫu thực địa thu từ lợn khoẻ mạnh từ hai trại lợn thịt đã có xác nhận nhiễm dịch tả lợn châu Phi cho thấy, bằng phương pháp real-time PCR, có 7/12 mẫu dương tính khi mẫu nước bọt được xử lý, chỉ có 4/12 mẫu dương tính bằng phương pháp tham chiếu. Bên cạnh đó, 4/4 mẫu dương tính ở cả hai nhóm đối chứng và thí nghiệm cho kết quả Ct ở nhóm thí nghiệm đều thấp hơn giá trị Ct ở nhóm đối chứng. Mẫu số 2 và mẫu số 5 sau khi được xử lý có giá trị Ct lần lượt là 32,42 và 33,33, nhưng chỉ có mẫu số 5 cho giá trị Ct là 35,99 khi chưa xử lý. Trong khi mẫu 2 lại cho kết quả âm tính khi chưa xử lý. Điều này có thể là do thao tác trong quá trình xét nghiệm của mẫu số 2 chưa đạt độ chính xác cao. Tuy vậy, có thể thấy việc ứng dụng phương pháp xử lý mẫu nước bọt đã làm tăng độ nhạy của phương pháp real-time PCR trong chẩn đoán ASF.

Kết quả ứng dụng từ mẫu thực địa cho thấy hiệu quả của quy trình xử lý mẫu nước bọt trong việc cô đặc lượng virus có trong mẫu, góp phần làm tăng độ nhạy của phương pháp real-time PCR trong chẩn đoán ASF. Do đó, kết quả nghiên cứu của chúng tôi khẳng định tính khả thi của việc chẩn đoán ASF sớm từ mẫu nước bọt. Chẩn đoán sớm từ mẫu nước bọt đã được nhiều nghiên cứu ghi nhận là một công cụ hữu ích để hỗ trợ hiệu quả cho công tác giám sát dịch bệnh (Mur & cs., 2013; Chung & cs., 2024; Lee & cs., 2021), đặc biệt tại các trang trại chăn nuôi quy mô lớn (Lee & cs., 2021). Điều này có ý nghĩa quan trọng trong việc hỗ trợ công tác chẩn đoán sớm trong các chương trình kiểm soát ở giai đoạn tiền lâm sàng, khi những con lợn chưa có biểu hiện bệnh và vẫn còn nhai dây để thu dịch nước bọt. Có nhiều chất ức chế khuếch đại DNA, trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ tối ưu các hoá chất chính sử dụng để cô đặc virus, lượng các hoá chất khác như NaCl không tiến hành tối ưu trong nghiên cứu này. Hơn nữa, cần tiếp tục ứng dụng quy trình xử lý mẫu nước bọt trên dung lượng mẫu lớn để tăng độ tin cậy của phương pháp xử lý mẫu nước bọt trong chẩn đoán ASF.

4. KẾT LUẬN

Ứng dụng các hoá chất để xử lý mẫu nước bọt như SAP và PEG trước khi chiết tách DNA là công cụ hữu hiệu giúp cô đặc virus có trong mẫu nước bọt trước khi tách chiết, làm tăng độ nhạy của phương pháp xét nghiệm. Nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng lượng mẫu nước bọt tối ưu cho việc chẩn đoán ASF là 10ml. Bên cạnh đó, tỷ lệ tối ưu giữa thể tích nước bọt và dung dịch SAP và PEG lần lượt là 1:3 và 1:0,4. Hơn nữa, hiệu quả của quá trình xử lý mẫu nước bọt đã được xác minh thông qua xét nghiệm 12 mẫu thực địa, cho thấy 7/12 mẫu cho kết quả dương tính sau khi xử lý, trong khi phương pháp tham chiếu chỉ ghi nhận 4/12 mẫu dương tính. Kết quả của chúng tôi hứa hẹn là công cụ hữu hiêu cho việc chẩn đoán sớm ASF từ mẫu không xâm lấn, giúp nâng cao hiêu quả của công tác phòng chống bênh.

LỜI CẢM ƠN

Các nội dung trong bài báo được thực hiện có sử dụng một phần kinh phí của đề tài Sinh viên nghiên cứu khoa học "Cải tiến phương pháp xử lý mẫu nước bọt để chẩn đoán bệnh Dịch tả lợn châu Phi", mã số SV2024-06-08. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Lê Văn Phan, Bộ môn Vi sinh vật - Truyền nhiễm, Khoa Thú y đã cung cấp chủng virus Dịch tả lợn châu Phi cũng như mẫu thực địa sử dụng cho các nội dung của nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Beemer O., Remmenga M., Gustafson L., Johnson K., Hsi D. & Antognoli M.C. (2019). Assessing the value of PCR assays in oral fluid samples for detecting African swine fever, classical swine fever, and foot-and-mouth disease in U.S. swine. PLOS ONE. 14(7): e0219532.

Czumbel L.M., Kiss S., Farkas N., Mandel I., Hegyi A., Nagy Á., Lohinai Z., Szakács Z., Hegyi P., Steward M.C. & Varga G. (2020). Saliva as a Candidate for COVID-19 Diagnostic Testing: A Meta-Analysis. Front Med (Lausanne). 7: 465.

Dixon L.K., Chapman D.A., Netherton C.L. & Upton C. (2013). African swine fever virus replication and genomics. Virus Res. 173(1): 3-14.

Gallardo C., Soler A., Nurmoja I., Cano-Gómez C., Cvetkova S., Frant M., Woźniakowski G., Simón A., Pérez C., Nieto R. & Arias M. (2021). Dynamics of African swine fever virus (ASFV) infection in domestic pigs infected with virulent, moderate virulent and attenuated genotype II ASFV European isolates. Transbound Emerg Dis. 68(5): 2826-2841.

Goonewardene K.B., Chung C.J., Goolia M., Blakemore L., Fabian A., Mohamed F., Nfon C., Clavijo A., Dodd K. A. & Ambagala A. (2021). Evaluation of oral fluid as an aggregate sample for early detection of African swine fever virus using four independent pen-based experimental studies. Transboundary and Emerging Diseases. 68(5): 2867-2877.

Gregorio Torres I. (2020). GF-TADs Global Control of African Swine Fever. Presentation at the Webinar on African Swine Fever: An Unprecedented Global Threat - A Challenge to Livelihoods, Food Security and Biodiversity. Call for action. Retrieved from http://www.gf-tads.org/events/events-detail/en/c/1152886/ on Aug 20, 2024.

Hata A., Hara-Yamamura H., Meuchi Y., Imai S. & Honda R. (2021). Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan during a Covid-19 outbreak. Sci Total Environ. 758: 143578.

Nguyễn Hưởng (2024). Tiêm vắc-xin phòng dịch tả lợn châu Phi đạt thấp, vì sao? Truy cập từ https://baobacgiang.vn/tiem-vac-xin-phong-dichta-lon-chau-phi-dat-thap-vi-sao-073127.bbg ngày 20/08/2024.

Joseph Chung C., Remmenga D.M., Mielke R.S., Branan M., Daniel Mihalca A., Balmos O.-M., Adrian Balaban Oglan D., Supeanu A. & Farkas A. (2024). Evaluation of Aggregate Oral Fluids for African Swine Fever Real-Time PCR Diagnostics Using Samples Collected on Romanian Farms with an Active Outbreak. Transboundary and Emerging Diseases. (1): 9142883.

Kumar M., Patel A. K., Shah A. V., Raval J., Rajpara N., Joshi M. & Joshi C.G. (2020). First proof of the capability of wastewater surveillance for COVID-19 in India through detection of genetic material of SARS-CoV-2. Sci Total Environ. 746: 141326.

Le V.P., Jeong D.G., 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., Bae E., Vu T.T.H., Yeom M., Na W. & Song D. (2019). Outbreak of African Swine Fever, Vietnam, 2019. Emerg Infect Dis. 25(7): 1433-1435.

Martínez-Miró S., Tecles F., Ramón M., Escribano D., Hernández F., Madrid J., Orengo J., Martínez-Subiela S., Manteca X. & Cerón J.J. (2016). Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. BMC Vet Res. 12(1): 171.

Nguyen-Thi T., Pham-Thi-Ngoc L., Nguyen-Ngoc Q., Dang-Xuan S., Lee H. S., Nguyen-Viet H., Padungtod P., Nguyen-Thu T., Nguyen-Thi T., Tran-Cong T. & Rich K.M. (2021). An Assessment of the Economic Impacts of the 2019 African Swine Fever Outbreaks in Vietnam. Front Vet Sci. 8: 686038.

Saitoh H. & Yamane N. (1999). Evaluation of a fully automated mycobacteria culture system, MB/BacT using a newly developed digestion-decontamination procedure, semi-alkaline protease-N-acetyl-L-cysteine-NaOH (SAP-NALC-NaOH) method. Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi. 10(2): 103-10.

Sakashita K., Takeuchi R., Takeda K., Takamori M., Ito K., Igarashi Y., Hayashi E., Iguchi M., Ono M., Kashiyama T., Tachibana M., Miyakoshi J., Yano K., Sato Y., Yamamoto M., Murata K., Wada A., Chikamatsu K., Aono A., Takaki A., Nagai H., Yamane A., Kawashima M., Komatsu M., Nakaishi K., Watabe S. & Mitarai S. (2020). Ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of MPT64 secretory antigen to evaluate Mycobacterium tuberculosis viability in sputum. International Journal of Infectious Diseases. 96: 244-253.

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. J Virol Methods. 178(1-2): 161-70.

Torii S., Furumai H. & Katayama H. (2021). Applicability of polyethylene glycol precipitation followed by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction for the detection of SARS-CoV-2 RNA from municipal wastewater. Sci Total Environ. 756: 143067.

Patricia Del Vigna de Almeida, Ana Maria Trindade Grégio, Maria Angela Naval Machado, Antonio Adilson Soares de Lima, Luciana Reis Azevedo (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. J Contemp Dent Pract. 9(3): 72-80.

Wang W.-H., Takeuchi R., Jain S.-H., Jiang Y.-H., Watanuki S., Ohtaki Y., Nakaishi K., Watabe S., Lu P.-L. & Ito E. (2020). A novel, rapid (within hours) culture-free diagnostic method for detecting live Mycobacterium tuberculosis with high sensitivity. EBioMedicine. 60: 103007.

Wu F., Zhang J., Xiao A., Gu X., Lee W. L., Armas F., Kauffman K., Hanage W., Matus M., Ghaeli N., Endo N., Duvallet C., Poyet M., Moniz K., Washburne A. D., Erickson T. B., Chai P. R., Thompson J. & Alm E. J. (2020). SARS-CoV-2 Titers in Wastewater Are Higher than Expected from Clinically Confirmed Cases. mSystems. 5(4).

Yamazaki W., Matsumura Y., Thongchankaew-Seo U., Yamazaki Y. & Nagao M. (2021). Development of a point-of-care test to detect SARS-CoV-2 from saliva which combines a simple RNA extraction method with colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection. J Clin Virol. 136: 104760.

Yamazaki Y., Thongchankaew-Seo U. & Yamazaki W. (2022). Very low likelihood that cultivated oysters are a vehicle for SARS-CoV-2: 2021-2022 seasonal survey at supermarkets in Kyoto, Japan. Heliyon. 8(10): e10864.