Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Tập 24, Số đặc biệt 1, 2026: 01-09 https://doi.org/10.31817/tckhnnvn.2026.24.SP01.01
vie.vjas.vn

HOÀN THIỆN PHƯƠNG PHÁP CÔ ĐẶC VIRUS DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI BẰNG POLYETHYLENE GLYCOL NHẰM NÂNG CAO KHẢ NĂNG PHÁT HIỆN TRONG NƯỚC THẢI CHĂN NUÔI

Trần Thị Mỹ An[1], Nguyễn Thị Kiều Anh[1], Trần Ngọc Diễm[1], Bùi Minh Hải[1], Đặng Thị Hằng[2], Nguyễn Thị Hương Giang[3], Trần Thị Đức Tám[1], Mai Thị Ngân[1*]

[1]Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
[2]Viện Chăn nuôi và Thú y Việt Nam
[3]Khoa Chăn nuôi - Thú y, Trường Đại học Nông Lâm Bắc Giang

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

Ngày nhận bài: 03.04.2026 Ngày chấp nhận đăng: 09.06.2026

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%. Virus ASF (ASFV) có khả năng tồn tại trong môi trường nước thải chăn nuôi, tuy nhiên tải lượng virus thường thấp và chịu ảnh hưởng của các chất ức chế PCR, gây khó khăn cho việc phát hiện. Nghiên cứu này nhằm hoàn thiện quy trình cô đặc ASFV bằng polyethylene glycol (PEG) trước khi tách chiết DNA, góp phần nâng cao hiệu quả phát hiện bằng phương pháp real-time PCR. Kết quả cho thấy các điều kiện xử lý mẫu phù hợp bao gồm thể tích mẫu 15ml, tiền ly tâm ở 2.000g/10 phút và sử dụng phần dịch nổi cho bước cô đặc. Nồng độ PEG 6000 tối ưu là 15% (w/v) và ly tâm sa lắng virus ở 10.000g/30 phút. Hai phương pháp tách chiết DNA cho hiệu quả tương đương. Áp dụng quy trình xử lý mẫu bằng PEG giúp cải thiện rõ rệt khả năng phát hiện ASFV so với mẫu không xử lý. Khi ứng dụng trên mẫu thực địa, số mẫu dương tính tăng từ 1/56 (không xử lý) lên 8/56 (có xử lý). Kết quả cho thấy quy trình cô đặc bằng PEG có tiềm năng ứng dụng trong giám sát môi trường và hỗ trợ phát hiện sớm ASFV trong chăn nuôi.

Từ khóa: ASFV, polyethylene glycol, real-time PCR, nước thải chăn nuôi, cô đặc virus.

Refinement of a Polyethylene Glycol-Based Method for Concentration of African Swine Fever Virus to Improve Detection in Swine Wastewater

ABSTRACT

African swine fever (ASF) is a highly contagious disease with mortality rates of up to 100%. ASF virus (ASFV) can persist in livestock wastewater; however, its concentration is often low and affected by PCR inhibitors, posing challenges for detection. This study aimed to refine a polyethylene glycol (PEG)-based method for ASFV concentration before DNA extraction to improve detection efficiency using real-time PCR. The results identified optimal processing conditions, including a sample volume of 15ml, pre-centrifugation at 2,000g for 10 minutes, and the use of the supernatant for virus concentration. The optimal PEG 6000 concentration was 15% (w/v), with virus pelleting performed at 10,000g for 30 minutes. Two DNA extraction methods yielded comparable performance. Application of the PEG-based concentration protocol significantly improved ASFV detection compared to untreated samples. In field samples, the number of positive detections increased from 1/56 (untreated) to 8/56 (PEG-treated). These findings suggest that PEG-based virus concentration has strong potential for environmental surveillance and early detection of ASFV in pig production systems.

Keywords: ASFV, polyethylene glycol, real-time PCR, wastewater, virus concentration.

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 lên đến 100% (Dixon & cs., 2013). ASF được

báo cáo lần đầu tiên ở Kenya vào năm 1921 (Montgomery, 1921), sau đó lan rộng ra nhiều quốc gia trên toàn thế giới. Theo báo cáo của Tổ chức Thú y Thế giới, trong giai đoạn từ tháng 01/2022 đến tháng 02/2025, ASF đã gây thiệt hại cho hơn 2 triệu động vật trên toàn thế giới, trong đó khu vực châu Á và châu Âu chịu ảnh hưởng nặng nề nhất (Woah, 2025). Tại Việt Nam, bệnh lần đầu tiên được phát hiện vào ngày 19/02/2019, đến tháng 08/2019, bệnh đã xảy ra ở 63 tỉnh thành, gây tổn thất nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi và tác động lớn đến kinh tế - xã hội (Le & cs., 2019).

ASFV có khả năng tồn tại lâu dài trong môi trường, đặc biệt trong các chất thải chăn nuôi. Nghiên cứu của Davies & cs. (2017) cho thấy ASFV có thể được phát hiện trong các chất bài tiết của lợn bệnh như phân, nước tiểu và dịch miệng, đóng vai trò là các nguồn lây truyền quan trọng trong điều kiện chăn nuôi. Nghiên cứu của Trần Thị Hà & cs. (2021) đã ghi nhận sự hiện diện của ASFV trong một số yếu tố trung gian tại trại chăn nuôi gồm nước thải, thức ăn thừa và các dụng cụ dùng trong chăn nuôi. Đáng chú ý, ASFV có khả năng gây nhiễm ở liều rất thấp, chỉ khoảng 10^0 $TCID_{50}$, qua đó làm tăng nguy cơ lây truyền trong điều kiện tải lượng virus trong môi trường thấp (Niederwerder & cs., 2019). Trong bối cảnh chăn nuôi lợn tại Việt Nam còn phổ biến ở quy mô nhỏ lẻ và hệ thống xử lý chất thải chưa đồng bộ, nguy cơ lưu hành ASFV trong môi trường chăn nuôi là vấn đề đáng lưu ý. Tuy nhiên, tải lượng virus có trong nước thải chăn nuôi thường thấp và chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố ức chế phản ứng PCR, gây khó khăn cho việc phát hiện ASFV bằng các kỹ thuật sinh học phân tử. Vì vậy, việc cô đặc virus trước khi tiến hành chẩn đoán được xem là bước quan trọng nhằm nâng cao độ nhạy của phương pháp real-time PCR (qPCR) trong đó polyethylene glycol (PEG) là một hợp chất được sử dụng phổ biến nhờ khả năng kết tủa virus không đặc hiệu và phù hợp với các mẫu môi trường có tải lượng virus thấp. So với hấp phụ qua màng lọc hoặc siêu ly tâm, kết tủa bằng PEG có ưu điểm về tính đơn giản, chi phí thấp và phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm thông thường. PEG giúp thúc đẩy kết tủa virus trong mẫu nước thải. Một số nghiên cứu đã ứng dụng PEG trong phát hiện ASFV từ mẫu nước bọt (Lê Trần Hoàng Anh & cs., 2025), cũng như phát hiện virus echovirus 7, SARS-CoV-2 từ mẫu nước thải (Amdiouni & cs., 2012; Mailepessov & cs., 2022)… Tuy nhiên, các nghiên cứu hiện nay chủ yếu tập trung vào ứng dụng PEG trong phát hiện virus, trong khi các yếu tố kỹ thuật ảnh hưởng đến hiệu quả cô đặc ASFV từ nước thải chăn nuôi vẫn chưa được đánh giá đầy đủ, đặc biệt trong điều kiện thực tế tại Việt Nam. Đồng thời, các vấn đề như phân bố virus trong các pha mẫu (phần nổi và cặn) và ảnh hưởng của các chất ức chế PCR trong nước thải vẫn chưa được làm rõ. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm hoàn thiện phương pháp cô đặc ASFV bằng PEG thông qua đánh giá các yếu tố kỹ thuật trong xử lý mẫu nước thải, từ đó nâng cao khả năng phát hiện virus bằng qPCR và góp phần hỗ trợ giám sát môi trường trong chăn nuôi lợn.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

ASFV chủng ASF/HY01/2019 với hiệu giá là $10^{6.5}$ $TCID_{50}$ được sử dụng cho các thí nghiệm hoàn thiện phương pháp (Le & cs., 2019).

Mẫu nước thải được thu tại một số trại lợn ở các tỉnh Ninh Bình, Bắc Ninh, Hưng Yên, Thanh Hóa, Phú Thọ và Thái Nguyên, từ các vị trí đại diện trong hệ thống quản lý chất thải của trại chăn nuôi lợn đã hoặc đang xảy ra dịch tả lợn châu Phi. Tổng cộng 56 mẫu nước thải được thu từ 9 cơ sở chăn nuôi lợn, với số lượng mẫu mỗi trại khác nhau theo điều kiện thực tế. Các điểm lấy mẫu bao gồm hố chứa chất thải, hệ thống thoát nước, ao chứa nước thải chưa xử lý và nước sau xử lý. Các mẫu được thu và phân tích riêng biệt trong quá trình đánh giá hiệu quả phát hiện ASFV. Mẫu được bảo quản lạnh, vận chuyển về phòng thí nghiệm trong ngày và bảo quản ở -80°C cho đến khi sử dụng.

Hóa chất xử lý mẫu nước thải bao gồm Polyethylene Glycol 6000 (PEG 6000) và

Sodium Chloride (NaCl) (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). PEG được pha trong dung dịch NaCl theo quy trình đã được mô tả trước (Lê Trần Hoàng Anh & cs., 2025). Hóa chất dùng cho tách chiết DNA thủ công là bộ DNeasy Blood and Tissue Kits (Qiagen, Hilden, Đức), phương pháp tách chiết tự động sử dụng bộ kit ABT (ABT, Hà Nội, Việt Nam) và hóa chất dùng cho qPCR là bộ qPCR mix (Takara Bio Inc., Otsu, Japan).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Nhằm hoàn thiện quy trình cô đặc ASFV từ mẫu nước thải chăn nuôi, nghiên cứu tiến hành đánh giá và tối ưu một số bước trong quy trình xử lý mẫu trước khi tách chiết DNA. Mẫu nước thải được thu từ một số cơ sở chăn nuôi không ghi nhận ASF tại thời điểm lấy mẫu và vortex đồng nhất trước khi bổ sung 300µl ASFV chủng ASF/HY01/2019 vào 50ml mẫu nước thải (tỷ lệ khoảng 1:167 v/v) để tạo mẫu thử dương tính. Sau đó, mẫu được xử lý ngay cho các thí nghiệm tiếp theo. Các mẫu này được sử dụng trong các thí nghiệm nhằm đánh giá hiệu suất cô đặc virus ở các bước xử lý ban đầu. Trong các thí nghiệm đánh giá, mỗi mẫu được phân tích bằng qPCR với hai lần lặp lại nhằm đánh giá tính ổn định của kết quả. Các yếu tố kỹ thuật được khảo sát bao gồm thể tích mẫu, điều kiện tiền ly tâm, nồng độ PEG và điều kiện ly tâm sa lắng virus. Các thí nghiệm được thực hiện theo hướng khảo sát từng yếu tố riêng lẻ, trong khi các điều kiện khác được giữ cố định. Ban đầu, mẫu được xử lý bằng PEG 6000 30% và ly tâm sa lắng ở 8.000g/30 phút. Sau khi xác định được điều kiện phù hợp, các thông số này được áp dụng cho các bước xử lý tiếp theo.

Đánh giá ảnh hưởng của thể tích mẫu nước thải: Mẫu nước thải sau khi bổ sung ASFV được đồng nhất và chia vào các ống Falcon với các thể tích khác nhau gồm 10, 15 và 20ml để đánh giá ảnh hưởng của thể tích mẫu đến hiệu quả cô đặc virus. Các mẫu được tiền ly tâm để loại bỏ cặn thô, thu dịch nổi và xử lý bằng PEG 6000. Sau đó, mẫu được tách chiết DNA và phân tích bằng phương pháp qPCR để xác định thể tích mẫu tối ưu.

Đánh giá ảnh hưởng của tốc độ tiền ly tâm và sự phân bố ASFV trong các pha mẫu: Mẫu nước thải chăn nuôi được bổ sung ASFV, đồng nhất và chia thành các phần có thể tích bằng nhau. Một mẫu được sử dụng làm đối chứng không tiền ly tâm, các mẫu còn lại được tiền ly tâm ở các tốc độ khác nhau 2.000g, 4.000g và 10.000g/10 phút (Farkas Kata & cs., 2022).

Sau tiền ly tâm, phần dịch nổi được thu và xử lý bằng PEG 6000 để cô đặc virus theo tỷ lệ đã được tối ưu trong nghiên cứu trước (Lê Trần Hoàng Anh & cs., 2025), trong khi phần cặn được hoà tan bằng dung dịch PBS 1X (pH 7,4) bổ sung 0,05% Tween-20 và 0,3 M NaCl, lắc trộn để giải phóng virus bám dính. Các mẫu sau xử lý được tách chiết DNA và chạy qPCR nhằm so sánh tải lượng virus giữa các điều kiện tiền ly tâm, đồng thời đánh giá sự phân bố virus giữa phần nổi và phần cặn.

Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ PEG: Mẫu nước thải sau tiền xử lý được chia thành các phần có thể tích bằng nhau và xử lý với các nồng độ PEG 6000 khác nhau (10%, 15%, 20% và 30% w/v) (Sapula & cs., 2021; Mailepessov & cs., 2022; Zheng & cs., 2023), cùng một mẫu không bổ sung PEG. Sau khi trộn đều, mẫu được ly tâm để thu cặn sa lắng virus. Phần cặn được sử dụng để tách chiết DNA và phân tích bằng qPCR nhằm đánh giá hiệu quả cô đặc ASFV thông qua giá trị Ct.

Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện ly tâm sa lắng: Mẫu nước thải sau xử lý với nồng độ PEG 6000 đã lựa chọn được ly tâm sa lắng virus ở các tốc độ khác nhau (5.000g, 8.000g, 10.000g và 14.000g/30 phút) (Farkas & cs., 2018; Mailepessov & cs., 2022). Phần cặn thu được được sử dụng để tách chiết DNA và phân tích bằng qPCR nhằm đánh giá ảnh hưởng của tốc độ ly tâm đến hiệu quả cô đặc ASFV.

Đánh giá ảnh hưởng của phương pháp tách chiết DNA: DNA được tách chiết từ các mẫu nước thải sau khi cô đặc virus bằng PEG 6000 bằng hai phương pháp: (i) tách chiết thủ công sử dụng bộ kit thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất và (ii) tách chiết tự động sử dụng hệ

thống máy tách chiết với bộ hóa chất tương thích theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA sau tách chiết được phân tích bằng qPCR, và hiệu quả của mỗi phương pháp được đánh giá thông qua giá trị Ct.

2.2.2. Phương pháp real-time PCR

Phản ứng qPCR được thực hiện trên hệ thống Line Gene Mini S (Bioer, Trung Quốc) theo quy trình đã công bố bởi Tignon & cs. (2011). Phản ứng sử dụng cặp mồi và đầu dò đặc hiệu cho ASFV. Chu trình nhiệt bao gồm giai đoạn biến tính ban đầu ở 95°C trong 3 phút, tiếp theo là 45 chu kỳ gồm 95°C trong 10 giây và 60°C trong 35 giây. Mẫu được xác định dương tính khi giá trị Ct ≤ 37. Giá trị Ct của mỗi mẫu được tính trung bình từ hai lần lặp lại và được sử dụng để đánh giá hiệu quả các bước xử lý mẫu. Mỗi lần chạy qPCR đều có đối chứng dương và âm để kiểm soát phản ứng và nhiễm chéo.

2.2.3. Đánh giá hiệu quả quy trình xử lý mẫu trong phát hiện ASFV từ mẫu thực địa

Quy trình xử lý mẫu nước thải đã hoàn thiện được áp dụng trên các mẫu thu thập từ thực địa nhằm đánh giá hiệu quả phát hiện ASFV. Mỗi mẫu được chia thành hai phần: không xử lý và xử lý theo quy trình cô đặc virus bằng PEG 6000. Sau đó, DNA được tách chiết và phân tích bằng qPCR. Kết quả được sử dụng để so sánh tỷ lệ phát hiện và giá trị Ct giữa hai điều kiện, từ đó đánh giá hiệu quả của quy trình xử lý mẫu trong phát hiện ASFV từ nước thải chăn nuôi.

2.2.4. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại hai lần độc lập. Giá trị Ct được biểu diễn dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (standard deviation: SD). SD được sử dụng để đánh giá mức độ biến thiên giữa các lần lặp lại. Số liệu được tổng hợp và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả hoàn thiện quy trình xử lý mẫu nước thải

Các yếu tố kỹ thuật trong quy trình xử lý mẫu được đánh giá tuần tự nhằm xác định điều kiện phù hợp cho việc thu hồi và phát hiện ASFV từ mẫu nước thải.

3.1.1. Ảnh hưởng của thể tích mẫu nước thải đến hiệu quả thu hồi ASFV

Mẫu nước thải sau khi bổ sung ASFV được xử lý theo cùng một quy trình và phân tích bằng qPCR. Kết quả được trình bày trong bảng 1.

Giá trị Ct trung bình giảm khi tăng thể tích mẫu từ 10ml (Ct = 26,17) lên 15ml (Ct = 24,61), cho thấy hiệu quả thu hồi virus được cải thiện khi tăng thể tích mẫu. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng thể tích lên 20ml, giá trị Ct không giảm thêm (Ct = 24,85), cho thấy hiệu quả thu hồi virus không được cải thiện đáng kể. Kết quả này cho thấy thể tích mẫu 15ml là phù hợp để đạt hiệu quả thu hồi ASFV cao trong khi vẫn đảm bảo tính khả thi trong xử lý mẫu. Việc không cải thiện hiệu quả thu hồi khi tăng thể tích mẫu vượt quá 15ml có thể liên quan đến ảnh hưởng của các thành phần trong nước thải, kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đây cho thấy hiệu quả cô đặc virus bằng PEG phụ thuộc vào thể tích mẫu nhưng không tăng tuyến tính, mà có xu hướng đạt ngưỡng tối ưu trong một khoảng thể tích nhất định (Farkas & cs., 2021).

Bảng 1. Ảnh hưởng của thể tích mẫu nước thải đến hiệu quả thu hồi ASFV

Thể tích mẫu	Giá trị Ct trung bình ± SD
10ml	26,17 ± 0,25
15ml	24,61 ± 0,34
20ml	24,85 ± 0,38

Ghi chú: Ct (cycle threshold): Giá trị ngưỡng chu kỳ; SD (standard deviation): Độ lệch chuẩn.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tốc độ tiền ly tâm đến phân bố ASFV giữa các pha mẫu nước thải và mẫu gộp

Tốc độ tiền ly tâm (g/10 phút)	Giá trị Ct phần nổi	Giá trị Ct phần cặn	Giá trị Ct trung bình của mẫu gộp ± SD
10.000	25,72	28,7	26,85 ± 0,09
4.000	24,45	29,25	25,76 ± 0,15
2.000	24,95	29,86	25,43 ± 0,19
0		29,61	

Ghi chú: Mẫu gộp bao gồm 2,5µl DNA từ phần cặn và 2,5µl DNA từ phần nổi tương ứng với từng điều kiện tiền ly tâm; Ct (cycle threshold): Giá trị ngưỡng chu kỳ; SD (standard deviation): Độ lệch chuẩn.

3.1.2. Ảnh hưởng của tốc độ tiền ly tâm đến hiệu quả phát hiện ASFV và sự phân bố virus trong mẫu nước thải

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của tốc độ tiền ly tâm khác nhau đến hiệu quả phát hiện ASFV và sự phân bố virus trong mẫu nước thải được trình bày trong bảng 2.

Giá trị Ct ở phần dịch nổi thấp hơn so với phần cặn trong tất cả các điều kiện, cho thấy virus chủ yếu phân bố trong phần dịch nổi. Bên cạnh đó, giá trị Ct cao ở phần dịch cặn cho thấy có thể có sự hiện diện của các chất ức chế phản ứng qPCR. Khi trộn DNA từ phần cặn với phần dịch nổi, giá trị Ct giảm so với phần cặn đơn lẻ, cho thấy hiệu ứng pha loãng có thể làm giảm ảnh hưởng của các chất ức chế, từ đó cải thiện hiệu quả phát hiện virus. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước cho thấy nước thải chứa nhiều chất ức chế phản ứng qPCR (Sapula & cs., 2021) và việc pha loãng hoặc loại bỏ phần cặn có thể cải thiện hiệu quả phát hiện virus (Ahmed & cs., 2022; Ozawa & cs., 2025; Sapula & cs., 2021).

Ở phần dịch nổi, các mẫu xử lý ở tốc độ 2.000g và 4.000g cho giá trị Ct thấp hơn (lần lượt 24,95 và 24,45) so với 10.000g (Ct = 25,72), trong khi mẫu không tiền ly tâm có Ct cao nhất. Mặc dù mẫu không tiền ly tâm vẫn phát hiện được ASFV sau xử lý bằng PEG, giá trị Ct cao hơn cho thấy bước tiền ly tâm có thể cải thiện hiệu quả phát hiện virus bằng cách giảm các chất ức chế qPCR. Kết quả này cho thấy tiền ly tâm giúp cải thiện hiệu quả phát hiện ASFV, tuy nhiên tốc độ quá cao có thể làm giảm hiệu quả thu hồi virus trong phần dịch nổi. Bên cạnh đó, giữa hai tốc độ 2.000g và 4.000g không ghi nhận sự khác biệt đáng kể về giá trị Ct, cho thấy hiệu quả xử lý mẫu là tương đương. Do đó, tốc độ 2.000g/10 phút được lựa chọn do vẫn đảm bảo hiệu quả thu hồi virus, đồng thời hạn chế tạo cặn chặt và thuận lợi cho các bước xử lý tiếp theo. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu Farkas & cs. (2022) trước sử dụng tốc độ 2.000–4.000g để xử lý mẫu nước thải.

3.1.3. Ảnh hưởng của nồng độ hóa chất PEG đến hiệu quả thu hồi ASFV

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các nồng độ hóa chất PEG khác nhau (10%, 15%, 20%, 30% w/v) đến hiệu quả thu hồi ASFV được trình bày trong bảng 3.

Giá trị Ct giảm rõ rệt khi xử lý mẫu với PEG so với mẫu không xử lý, cho thấy việc sử dụng PEG giúp cải thiện hiệu quả thu hồi virus. Trong các nồng độ khảo sát, PEG 15% và 30% cho giá trị Ct thấp tương đương nhau (lần lượt 26,81 và 26,63), trong khi các nồng độ 10% và 20% cho giá trị Ct cao hơn. Mặc dù nồng độ 30% cho giá trị Ct thấp nhất, sự khác biệt so với 15% là không đáng kể, cho thấy hiệu quả thu hồi virus không tăng tương ứng khi tăng nồng độ PEG. Điều này có thể liên quan đến sự gia tăng độ nhớt của dung dịch ở nồng độ PEG cao, ảnh hưởng đến quá trình kết tủa và thu hồi virus. Do đó, nồng độ PEG 15% được lựa chọn do vẫn đảm bảo hiệu quả thu hồi virus cao, đồng thời giúp giảm chi phí hóa chất và thuận lợi cho thao

tác xử lý mẫu. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước cho thấy PEG ở nồng độ 15% (w/v) có thể đạt hiệu quả thu hồi virus SARS-CoV-2, norovirus GII cao từ mẫu nước thải và các mẫu môi trường phức tạp (Farkas & cs., 2018; Sapula & cs., 2021; Yang & cs., 2024). Một số nghiên cứu khác cũng ghi nhận sử dụng PEG là công cụ hiệu quả trong cô đặc virus echovirus 7, SARS-CoV-2 và norovirus GII từ mẫu nước thải, nâng cao độ nhạy của các phương pháp chẩn đoán phân tử (Amdiouni & cs., 2012; Farkas & cs., 2018; Mailepessov & cs., 2022).

3.1.4. Ảnh hưởng của điều kiện ly tâm đến hiệu quả cô đặc ASFV

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các tốc độ ly tâm cô đặc virus khác nhau đến hiệu quả thu hồi ASFV được trình bày trong bảng 4.

Giá trị Ct giảm khi tăng tốc độ ly tâm từ 5.000g (Ct = 27,47) lên 10.000g (Ct = 26,08), cho thấy hiệu quả thu hồi virus được cải thiện khi tăng lực ly tâm. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng tốc độ lên 14.000g, giá trị Ct không giảm mà tăng nhẹ (Ct = 26,69), chỉ ra hiệu quả thu hồi virus không được cải thiện tương ứng. Kết quả này cho thấy tồn tại một ngưỡng lực ly tâm phù hợp để đạt hiệu quả thu hồi virus cao, trong đó 10.000g cho hiệu quả tốt nhất trong các điều kiện khảo sát. Việc tăng lực ly tâm quá cao có thể làm tăng đồng kết tủa các thành phần không mong muốn trong mẫu, ảnh hưởng đến hiệu quả tách chiết DNA và kết quả qPCR. Do đó, điều kiện ly tâm 10.000g/30 phút được lựa chọn do đảm bảo hiệu quả thu hồi ASFV cao và phù hợp với quy trình xử lý mẫu nước thải. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Farkas & cs. (2018) sử dụng lực ly tâm 10.000g/30 phút để cô đặc norovirus GII bằng PEG từ mẫu nước thải, cho hiệu quả thu hồi ổn định.

3.1.5. Ảnh hưởng của các phương pháp tách chiết DNA đến hiệu suất thu hồi ASFV

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của *các phương pháp tách chiết DNA* khác nhau đến hiệu suất thu hồi ASFV được trình bày trong bảng 5.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ hóa chất PEG đến hiệu quả thu hồi ASFV

Nồng độ hóa chất PEG (%w/v)	Giá trị Ct trung bình ± SD
10	27,6 ± 0,01
15	26,81 ± 0,2
20	27,69 ± 0,12
30	26,63 ± 0,04
0	30,59± 0,1

Ghi chú: Ct (cycle threshold): Giá trị ngưỡng chu kỳ; SD (standard deviation): Độ lệch chuẩn.

Bảng 4. Ảnh hưởng của điều kiện ly tâm sa lắng khác nhau đến hiệu quả cô đặc ASFV

Tốc độ ly tâm sa lắng virus (g/30 phút)	Giá trị Ct trung bình ± SD
5.000	27,47 ± 0,02
8.000	26,63 ± 0,33
10.000	26,08 ± 0,01
14.000	26,69 ± 0,7

Ghi chú: Ct (cycle threshold): Giá trị ngưỡng chu kỳ; SD (standard deviation): Độ lệch chuẩn.

Bảng 5. Ảnh hưởng của các phương pháp tách chiết DNA khác nhau đến hiệu suất thu hồi ASFV

Phương pháp tách chiết DNA	Giá trị Ct trung bình ± SD
Tách bằng kit thủ công	24,46 ± 0,02
Hệ thống tách chiết tự động	24,37 ± 0,19

Ghi chú: Ct (cycle threshold): Giá trị ngưỡng chu kỳ; SD (standard deviation): Độ lệch chuẩn.

Bảng 6. So sánh kết quả phát hiện ASFV giữa mẫu có và không áp dụng quy trình cô đặc bằng PEG từ mẫu thực địa

Xử lý mẫu	Dương tính	Âm tính
Không xử lý	1	55
Cô đặc bằng PEG	8	48

Hai phương pháp tách chiết DNA cho giá trị Ct tương đương nhau (24,46 và 24,37), cho thấy hiệu quả thu hồi DNA virus giữa hai phương pháp không có sự khác biệt đáng kể. Kết quả này cho thấy sau bước xử lý và cô đặc virus bằng PEG, mẫu nước thải đã được loại bỏ phần lớn các yếu tố ức chế, giúp cả hai phương pháp tách chiết đều đạt hiệu quả ổn định trong thu hồi DNA virus. Điều này phù hợp với nghiên cứu trước cho thấy hiệu quả thu hồi axit nucleic từ mẫu nước thải phụ thuộc nhiều vào quy trình xử lý và cô đặc mẫu, sự khác biệt giữa các phương pháp tách chiết không đáng kể khi điều kiện xử lý mẫu được kiểm soát tốt (Hjelmsø & cs., 2017). Do đó, có thể lựa chọn linh hoạt phương pháp tách chiết DNA tùy theo điều kiện phòng thí nghiệm.

3.2. Đánh giá hiệu quả quy trình xử lý mẫu trong phát hiện ASFV từ mẫu thực địa

Kết quả đánh giá hiệu quả quy trình xử lý mẫu trong phát hiện ASFV từ 56 mẫu thực địa được trình bày trong bảng 6.

Kết quả cho thấy số mẫu dương tính sau xử lý bằng PEG (8/56) cao hơn rõ rệt so với mẫu không xử lý (1/56), quy trình cô đặc virus đã cải thiện đáng kể khả năng phát hiện ASFV trong mẫu nước thải thực địa. Tám mẫu dương tính từ 3 trại được phát hiện tại nhiều vị trí trong hệ thống xử lý chất thải, cho thấy ASFV có thể tồn tại ở nhiều công đoạn của hệ thống nước thải chăn nuôi. Đáng chú ý, chỉ có 1 mẫu được phát hiện ở cả hai điều kiện xử lý mẫu cô đặc bằng PEG và không xử lý. Ở mẫu này, giá trị Ct giảm từ 36,48 (không xử lý) xuống 33,76 (xử lý mẫu cô đặc bằng PEG), cho thấy hiệu quả cô đặc virus bằng PEG sau xử lý. Trong khi bảy mẫu còn lại chỉ phát hiện được sau khi áp dụng quy trình xử lý, phản ánh khả năng cải thiện độ nhạy phát hiện ở các mẫu có tải lượng virus thấp. Kết quả nghiên cứu phù hợp với các báo cáo trước đây rằng xử lý mẫu nước thải, đặc biệt bằng phương pháp cô đặc virus, giúp tăng khả năng phát hiện virus trong điều kiện tải lượng thấp và môi trường phức tạp (Zhang & cs., 2022; Wang & cs., 2025). Từ đó, có thể kết luận quy trình xử lý mẫu bằng PEG có tiềm năng ứng dụng trong giám sát môi trường nhằm hỗ trợ phát hiện sớm sự lưu hành ASFV tại các cơ sở chăn nuôi. Tuy nhiên, nghiên cứu còn hạn chế về cỡ mẫu, và qPCR chỉ phản ánh sự hiện diện của vật liệu di truyền virus.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp cô đặc ASFV từ mẫu nước thải chăn nuôi bằng PEG với các điều kiện kỹ thuật phù hợp bao gồm thể tích mẫu, điều kiện ly tâm và nồng độ PEG, góp phần nâng cao hiệu quả phát hiện virus bằng qPCR. Việc áp dụng quy trình xử lý mẫu bằng PEG 6000 ở nồng độ 15% (w/v) giúp cải thiện rõ rệt khả năng phát hiện ASFV, thể

hiện qua số mẫu dương tính tăng lên và giá trị Ct giảm so với mẫu không xử lý. Kết quả cho thấy phương pháp có tiềm năng ứng dụng trong giám sát môi trường, góp phần hỗ trợ phát hiện sớm ASFV trong chăn nuôi lợn. Cần tiếp tục đánh giá quy trình trên số lượng mẫu lớn hơn và ứng dụng đối với các tác nhân gây bệnh khác trong nước thải chăn nuôi. Việc hoàn thiện quy trình xử lý mẫu góp phần nâng cao hiệu quả giám sát bệnh trong thực tế.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Công ty Cổ phần GREENFEED Việt Nam đã hỗ trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahmed W., Simpson S. L., Bertsch P. M., Bibby K., Bivins A., Blackall L.L., Bofill-Mas S., Bosch A., Brandão J. & Choi P.M. (2022). Minimizing errors in RT-PCR detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA for wastewater surveillance. Science of The Total Environment. 805: 149877.

Amdiouni H., Maunula L., Hajjami K., Faouzi A., Soukri A. & Nourlil J. (2012). Recovery comparison of two virus concentration methods from wastewater using cell culture and real-time PCR. Curr Microbiol. 65(4): 432-7.

Davies K., Goatley L.C., Guinat C., Netherton C. L., Gubbins S., Dixon L.K. & Reis A.L. (2017). Survival of African Swine Fever Virus in Excretions from Pigs Experimentally Infected with the Georgia 2007/1 Isolate. Transbound Emerg Dis. 64(2): 425-431.

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

Farkas K., Hillary L.S., Thorpe J., Walker D.I., Lowther J.A., McDonald J.E., Malham S.K. & Jones D.L. (2021). Concentration and quantification of SARS-CoV-2 RNA in wastewater using polyethylene glycol-based concentration and qRT-PCR. Methods and protocols. 4(01): 17.

Farkas K., McDonald J.E., Malham S.K. & Jones D.L. (2018). Two-Step Concentration of Complex Water Samples for the Detection of Viruses. Methods Protoc. 1(3).

Farkas K., Pellett C., Alex-Sanders N., Bridgman Matthew T.P., Corbishley A., Grimsley Jasmine M.S., Kasprzyk-Hordern B., Kevill Jessica L., Pântea I., Richardson-O'neill India S., Lambert-Slosarska K., Woodhall N. & Jones Davey L. (2022). Comparative Assessment of Filtration- and Precipitation-Based Methods for the Concentration of SARS-CoV-2 and Other Viruses from Wastewater. Microbiology Spectrum. 10(4): e01102-22.

Hjelmsø M.H., Hellmér M., Fernandez-Cassi X., Timoneda N., Lukjancenko O., Seidel M., Elsässer D., Aarestrup F.M., Löfström C., Bofill-Mas S., Abril J.F., Girones R. & Schultz A.C. (2017). Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. PLoS One. 12(1): e0170199.

Lê Trần Hoàng Anh, Bùi Lệ Thủy, Đặng Thị Hằng, Trần Thị Mỹ An, Đàm Quốc Khánh & Mai Thị Ngân (2025). Tối ưu phương pháp xử lý mẫu nước bọt để nâng cao độ nhạy trong chẩn đoán bệnh dịch tả lợn châu Phi. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 23(1): 27-35.

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. Emerg Infect Dis. 25(7): 1433-1435.

Mailepessov D., Arivalan S., Kong M., Griffiths J., Low S.L., Chen H., Hapuarachchi H.C., Gu X., Lee W.L., Alm E.J., Thompson J., Wuertz S., Gin K., Ng L.C. & Wong J.C.C. (2022). Development of an efficient wastewater testing protocol for high-throughput country-wide SARS-CoV-2 monitoring. Sci Total Environ. 826: 154024.

Montgomery R.E. (1921). On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). Journal of comparative pathology and therapeutics. 34: 159-191.

Niederwerder M.C., Stoian A.M.M., Rowland R.R.R., Dritz S.S., Petrovan V., Constance L. A., Gebhardt J.T., Olcha M., Jones C.K., Woodworth J.C., Fang Y., Liang J. & Hefley T.J. (2019). Infectious Dose of African Swine Fever Virus When Consumed Naturally in Liquid or Feed. Emerg Infect Dis. 25(5): 891-897.

Ozawa H., Kitamura K. & Yoshida H. (2025). Optimizing solid-based methods for SARS-CoV-2 detection in wastewater: addressing PCR inhibition and variant challenges. Applied and Environmental Microbiology. 91(8): e00589-25.

Sapula S.A., Whittall J.J., Pandopulos A.J., Gerber C. & Venter H. (2021). An optimized and robust PEG precipitation method for detection of SARS-CoV-2 in wastewater. Science of The Total Environment. 785: 147270.

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.

Trần Thị Hà, Trương Hà Thái, Chu Thị Thanh Hương & Lại Thị Lan Hương (2021). Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ học bệnh dịch tả lợn châu Phi (ASF) tại huyện Quỳnh Phụ, tỉnh Thái Bình. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 19(11): 1436-1445.

Wang W., Li R., Chen S., Chen L., Jiang Y., Xiang J., Wu J., Li J., Chen Z. & Wu C. (2025). Wastewater-Based Surveillance of SARS-CoV-2 and Modeling of COVID-19 Infection Trends. Trop Med Infect Dis. 10(9).

Woah (2025). African swine fever (ASF) - Situation Reports 63 [Online]. Retrieved from https://www.woah.org/en/document/african-swine-fever-asf-situation-reports-63/ on Dec 23, 2025.

Yang S., Jiao Y., Dong Q., Li S., Xu C., Liu Y., Sun L. & Huang X. (2024). Evaluating approach uncertainties of quantitative detection of SARS-CoV-2 in wastewater: Concentration, extraction and amplification. Science of The Total Environment. 951: 175285.

Zhang D., Duran S.S.F., Lim W.Y.S., Tan C.K.I., Cheong W.C.D., Suwardi A. & Loh X.J. (2022). SARS-CoV-2 in wastewater: From detection to evaluation. Mater Today Adv. 13: 100211.

Zheng X., Wang M., Deng Y., Xu X., Lin D., Zhang Y., Li S., Ding J., Shi X., Yau C.I., Poon L.L.M. & Zhang T. (2023). A rapid, high-throughput, and sensitive PEG-precipitation method for SARS-CoV-2 wastewater surveillance. Water Res. 230: 119560.