

PHÁT TRIỂN PHƯƠNG PHÁP LAMP KHÔ TRỰC TIẾP ĐỂ CHẨN ĐOÁN BỆNH DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI TẠI THỰC ĐỊA

Souriya Viliddeth¹, Trần Thị Hương Giang¹,
Đồng Văn Hiếu¹, Nguyễn Thị Hương Giang², Đặng Hữu Anh¹, Mai Thị Ngân^{1*}

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

*Tác giả liên hệ: mtngan@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 06.11.2023

Ngày chấp nhận đăng: 07.03.2024

TÓM TẮT

Bệnh dịch tả lợn châu Phi (African swine fever - ASF) do virus ASF (ASFV) họ Asfarviridae gây ra, với tỷ lệ tử vong lên tới 100%. Các nghiên cứu về phương pháp LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) trong chẩn đoán ASF hiện tại chỉ là kỹ thuật LAMP ướt không khả thi cho ứng dụng thực địa do yêu cầu điều kiện lạnh. Nghiên cứu này nhằm mục đích phát triển phương pháp LAMP khô trực tiếp hỗ trợ cho công tác chẩn đoán sớm ASF ngay tại thực địa. Phương pháp tiêu chuẩn real-time PCR được sử dụng để đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của phương pháp LAMP khô trực tiếp. Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp đông khô LAMP hai bước có hiệu quả khuếch đại DNA cao hơn so với phương pháp LAMP một bước. Cả hai phương pháp LAMP khô đều cho hiệu quả khuếch đại DNA tốt ở các điều kiện bảo quản sau 2 tháng. Độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp LAMP khô hai bước sau 2,5 tháng bảo quản ở 4°C là 88,1% và 100%. Như vậy, phương pháp LAMP khô hứa hẹn là công cụ hữu hiệu cho chẩn đoán bệnh ASF tại thực địa, giúp hỗ trợ sàng lọc các cá thể bị nhiễm bệnh, nâng cao hiệu quả của công tác phòng chống bệnh.

Từ khóa: ASF, LAMP khô một bước, LAMP khô hai bước, điều kiện bảo quản.

Developing Direct Dry LAMP Method for Field Diagnosis of African Swine Fever

ABSTRACT

African swine fever (ASF) is caused by the ASF virus (ASFV) of the family Asfarviridae with a mortality rate of up to 100%. Currently, studies on the LAMP method (Loop-mediated isothermal amplification) for ASF diagnosis are based on wet LAMP, which is not feasible for field application due to the requirement of cold conditions. This study aimed to evaluate the effectiveness of dry LAMP methods to support early field diagnosis of ASF. The gold standard real-time PCR method was used to evaluate the sensitivity and specificity of the direct dry LAMP method. The results show that the two-step dry LAMP method was more effective in DNA amplification than the one-step dry LAMP method. Both dry LAMP methods showed good DNA amplification efficiency in both storage conditions after 2 months. The sensitivity and specificity of the two-step dry LAMP method after 2.5 months at 4°C were 88.1% and 100%. Thus, the dry LAMP method is promising as an early diagnosis tool for ASF, helping to support the screening of infected individuals at the field and to improve the effectiveness of prevention and control of ASF.

Keywords: African Swine Fever, one-step dry LAMP, two-step dry LAMP, storage conditions.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dịch tả lợn châu Phi (African swine fever - ASF) do virus ASF (ASFV), họ Asfarviridae gây ra (Dixon & cs., 2013). Bệnh

có khả năng gây chết lợn với tỷ lệ lên tới 100%. ASF xuất hiện lần đầu ở Kenya năm 1921 và nhanh chóng lan ra một số quốc gia châu Phi. Năm 2007, ASF tái xuất ở Georgia và tiếp tục lan ra các quốc gia thuộc Đông Âu. Do đó, giám

sát sự lưu hành của ASFV là ưu tiên hàng đầu của châu Âu. Tại Việt Nam, ASF lần đầu tiên được công bố vào tháng 2/2019. Việc tiêu hủy toàn đàn có con bị bệnh gây ra thiệt hại kinh tế lớn cho người chăn nuôi. Với khả năng tồn tại dai dẳng nên dịch bệnh có nguy cơ tái phát, lây lan trên diện rộng vẫn luôn hiện hữu, ảnh hưởng nghiêm trọng đến việc tổ chức tái đàn, tăng đàn và bảo đảm nguồn cung. Do không có biện pháp điều trị đặc hiệu và chưa có vaccin phòng bệnh hiệu quả nên việc chẩn đoán sớm và chính xác là rất cần thiết cho việc giám sát và tiến tới loại trừ bệnh. Việc giám sát sự lưu hành ASFV được cho là ưu tiên hàng đầu của châu Âu dựa trên cơ sở chẩn đoán nhanh và chính xác, giết mổ và tiêu hủy những con bị nhiễm bệnh (Sánchez-Vizcaíno & cs., 2015). Xét nghiệm tại thực địa giúp giảm thời gian vận chuyển mẫu, đẩy nhanh quá trình xét nghiệm, đồng thời hạn chế nguy cơ mang và phát tán mầm bệnh do quá trình vận chuyển mẫu.

Phương pháp chẩn đoán PCR hoặc real-time PCR có ưu điểm là độ nhạy và độ đặc hiệu cao nhưng tốn thời gian (3-4 giờ), thực hiện trên thiết bị đắt tiền và thường yêu cầu các chuyên gia có tay nghề cao. Do đó, các phương pháp này không khả thi cho việc chẩn đoán bệnh tại thực địa, điều rất cần thiết cho công tác quản lý dịch bệnh tại các địa phương. Kỹ thuật khuếch đại gen đẳng nhiệt LAMP đã được phát triển và ứng dụng rộng rãi với ưu điểm là nhanh, chính xác, đơn giản, tiết kiệm (Notomi & cs., 2000; Nagamine & cs., 2002). Điều kiện đẳng nhiệt cho phương pháp LAMP dễ dàng được thực hiện ở bể ủ nhiệt trong vòng 30 phút mà không yêu cầu thiết bị đắt tiền. Hơn nữa, kết quả của phản ứng LAMP có thể dễ dàng quan sát qua mắt thường bằng cách sử dụng các loại chỉ thị màu hoặc thuốc nhuộm DNA (Hayashida & cs., 2015). Phương pháp LAMP cũng đã được phát triển và ứng dụng trong chẩn đoán nhanh ASF (James & cs., 2010; Mee & cs., 2020; Wang & cs., 2020; Tran & cs., 2021). Tuy nhiên, các xét nghiệm ASF bằng phương pháp LAMP đã phát triển đều dựa trên kỹ thuật LAMP ướt với mẫu đã được

chiết tách DNA nên hạn chế chính là kém khả thi cho ứng dụng tại thực địa. Gần đây, kỹ thuật LAMP khô trực tiếp đã được phát triển cho chẩn đoán tại thực địa *Trypanosoma evansi* gây bệnh ở lạc đà (Salim & cs., 2018), vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* (Thapa & cs., 2019) và loài trùng roi *Trypanosomiasis* gây bệnh ở người (Hayashida & cs., 2015) giúp khắc phục được hạn chế của kỹ thuật LAMP ướt. Trong các nghiên cứu này, chỉ thị màu kép CFI (colori fluorescent indicator) đã được sử dụng bao gồm chỉ thị màu kim loại Hydroxynaphthol blue và thuốc nhuộm DNA GelGreen giúp cho việc đọc kết quả phản ứng LAMP không bị ảnh hưởng bởi màu của mẫu xét nghiệm. Nghiên cứu trước đây cho thấy chế phẩm LAMP khô vẫn cho kết quả khuếch đại DNA tốt sau 4 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng (Salim & cs., 2018). Do đó, mục đích nghiên cứu của chúng tôi nhằm thiết lập phương pháp LAMP khô trực tiếp để chẩn đoán ASF tại thực địa, hỗ trợ công tác giám sát phòng chống bệnh ngay tại thực địa.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Mẫu máu lợn nghi mắc ASF từ các trại lợn được thu thập bảo quản trong các ống chứa mẫu đã được vô trùng. Các mẫu bệnh phẩm này đã được xét nghiệm bằng kỹ thuật real-time PCR để chẩn đoán ASFV.

Sáu môi dùng cho phản ứng LAMP được thiết kế từ gen đích mã hoá protein p72 bằng phần mềm Primer Explorer 5 (<https://primerexplorer.jp>) gồm cặp môi ngoài (F3, B3), cặp môi trong (FIP, BIP) và cặp môi vòng (LF, LB) (Bảng 1). Tính đặc hiệu của các cặp môi dùng cho phương pháp LAMP cho chẩn đoán ASFV đã được chỉ ra trong nghiên cứu trước của nhóm tác giả, cụ thể 6 môi được thiết kế từ vùng gen bảo tồn P72 và khi so sánh với trình tự của 216 chủng ASFV khác cho thấy các đoạn môi được thiết kế không chứa bất kỳ trình tự không đặc hiệu nào hoặc khớp với trình tự của mầm bệnh ngoài ASFV (Ngan & cs., 2023).

Bảng 1. Trình tự nucleotide của các cặp mồi LAMP để phát hiện vùng gen p72 của ASFV

Tên mồi	Trình tự (5' to 3')	Vị trí
ASF-F3	GGAAAAAGTCTCCGTA CTG	106214-106232
ASF-B3	ATATGGCATCAGGAGGAG	106519-106502
ASF-FIP	TTGAGTCAAATCGAAGAAACACATACACTTTATTGTATTCAAACCCTA	106373-106349, 106287-106309
ASF-BIP	GCAAGTCTTGGGCCAAGATACTTTTTGTCTTATTGCTAACGATGG	106442-106461, 106501-106477
ASF-LF	GCATTTTAATGCACATTTTAAGCCTT	106344-106319
ASF-LB	AATCTTGTGCGCCTTCC	106461-106477

Sinh phẩm, hóa chất dùng cho phản ứng LAMP: Tris-HCl (311-90391, Wako Pure Chemical, Missouri, Hoa Kỳ), KCl, Betaine và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (58221, B0300-5VL, 76399-10ML-F Sigma - Aldrich, Đức), MgSO_4 (B1003S, New England Biolabs, Massachusetts, Hoa Kỳ), Bst DNA polymerase (M0275S, New England Biolabs, Massachusetts, Hoa Kỳ), hydroxynaphthol blue - HNB (33936-10G, Wako Pure Chemicals, Missouri, Hoa Kỳ), GelGreen (41005-T, 10.000X Sol, Biotium, Fremont, CA, Hoa Kỳ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách chiết DNA trực tiếp

Sodium dodecylbenzene sulphonate (SDBS) và Triton X-100 là các chất tẩy hoạt động bề mặt có tác dụng phá màng tế bào và màng nhân, giải phóng DNA và phân huỷ các protein liên kết với DNA.

Phương pháp tách chiết DNA trực tiếp bằng SDBS 1%

Mẫu máu toàn phần có kết quả dương tính với ASF bằng real-time PCR (ct: 16,72) được trộn với SDBS 1% (tỷ lệ 1:1) bằng pipet 5-10 lần rồi ủ ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, ly tâm với tốc độ 1.200G trong 5 phút theo các nghiên cứu trước (Yamazaki & cs., 2020; Ngan & cs., 2023). Sau đó, 20µl dịch nổi phía trên được thu sang ống mới làm khuôn mẫu cho phản ứng LAMP.

Phương pháp tách chiết DNA trực tiếp bằng TritonX-100 0,1%

200µl máu toàn phần có kết quả dương tính với ASF bằng real-time PCR (ct: 16,72) được chuyển vào ống chứa 1.800µl dung dịch

TritonX-100 0,1% (tỷ lệ 1:9) và trộn đều theo nghiên cứu trước (Tran & cs., 2021). Sau đó, 10µl mẫu đã ly giải được sử dụng cho phản ứng LAMP.

2.2.2. Phương pháp real-time PCR

Phương pháp real-time PCR được thực hiện bằng bộ kit real-time PCR Median ((NS-ASF-31, Median Diagnostics Inc., Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chu trình nhiệt của phản ứng real-time PCR như sau: 10 phút ở 95°C, 40 chu kỳ ở 95°C trong 15 giây và 58°C trong 60 giây; tín hiệu huỳnh quang thu được qua kênh FAM ở cuối quá trình khuếch đại của mỗi chu kỳ. Sau quá trình khuếch đại, giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct - cycle threshold) được xác định. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã áp dụng giá trị Ct giới hạn là 37,0 dựa vào kết quả xác định giới hạn phát hiện, với các mẫu được xác định là dương tính khi giá trị trung bình cho giá trị Ct < 37,0.

2.2.3. Phương pháp real-time LAMP

Phương pháp real-time LAMP được thực hiện với thể tích phản ứng là 25µl theo kết quả tối ưu về thành phần và điều kiện của phản ứng theo nghiên cứu của (Ngan & cs., 2023) bao gồm 2µl DNA mẫu, các mồi bên trong (1,6µM mỗi loại), mồi vòng lặp (0,8µM mỗi loại), mồi ngoài (mỗi loại 0,2µM), 1,6mM dNTPs, 5M betaine, 20mM Tris-HCl (pH 8,8), 10mM KCl, 10mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4mM MgSO_4 , 8U enzyme Bst DNA polymerase và 1µl chỉ thị màu kép CFI bao gồm 3mM HNB và 0,35% v/v GelGreen. Phản ứng real-time LAMP được thực hiện trong hệ thống LightCycler® 96 (Roche, Basel, Thụy Sĩ). Chu kỳ nhiệt cho real-time LAMP tiến hành như

sau: 60 chu kỳ 65°C trong 30 giây và 65°C trong 30 giây. Sau khi thu thập tín hiệu huỳnh quang ở cuối bước 65°C × 30 giây thứ hai của mỗi chu kỳ, phản ứng bị bất hoạt bằng cách giữ ở 95°C trong 2 phút, tiếp theo là phân tích đường cong nóng chảy từ 65°C đến 97°C ở 0,15°C/giây. Kết quả real-time LAMP được phát hiện bằng tín hiệu huỳnh quang với kênh FAM bởi thuốc nhuộm GelGreen. Phản ứng real-time LAMP dương tính được biểu thị bằng sự tăng huỳnh quang theo cấp số nhân và giá trị T_p (time-to-positivity) là thời gian cần thiết để đường cong khuếch đại đạt đến giá trị ngưỡng được thiết lập tự động, đồng thời T_a (temperature of annealing) nằm trong khoảng giá trị $84 \pm 2^\circ\text{C}$. Các mẫu có giá trị huỳnh quang đạt đến ngưỡng trong vòng 60 phút là dương tính.

2.2.4. Phương pháp đông khô LAMP

Phương pháp đông khô LAMP một bước

Quy trình thực hiện phương pháp LAMP khô được thực hiện và tối ưu dựa vào quy trình đã công bố của tác giả Thapa & cs. (2019) (Hình 1A).

LAMP khô một bước là 25 μl hỗn hợp chế phẩm bao gồm: 1,3 μl hỗn hợp môi (bao gồm 100mM môi bên ngoài (F3 và B3), môi trong (FIP và BIP) và môi vòng ((LF và LB)); 0,35 μl dNTPs 100mM; 2,5 μl Trehalose 2M; 0,5 μl

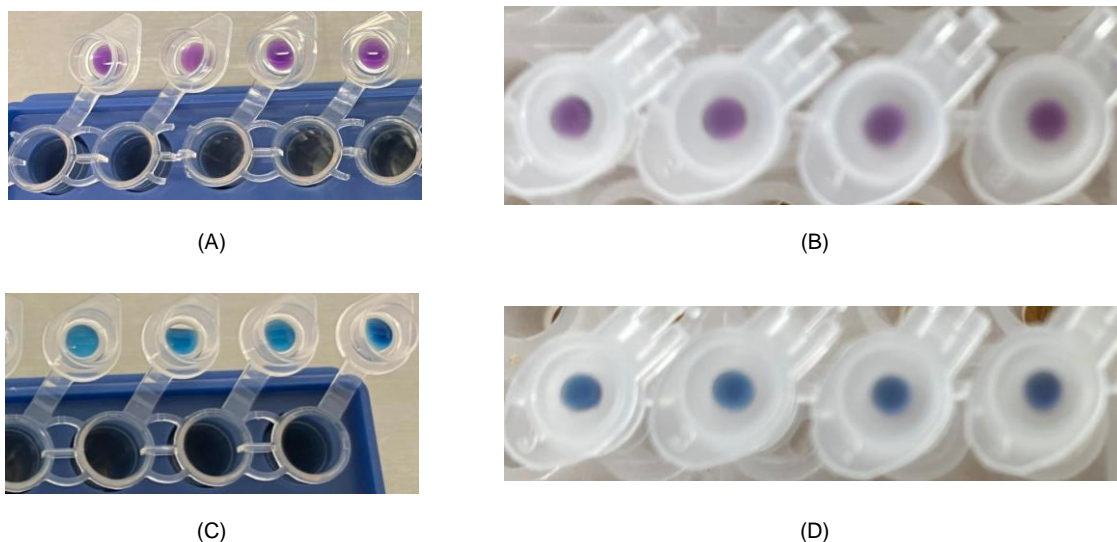
Tris-HCl 1M [pH 8,8], 0,25 μl KCl 1M); 1,8 μl MgSO₄ 100mM; 1 μl Bst DNA polymerase 2.0 và 1 μl chỉ thị màu CFI bao gồm 3mM HNB và 0,35% v/v GelGreen. Để làm khô hỗn hợp, hỗn hợp phản ứng đã chuẩn bị được đặt ở ngoại vi của mặt trong nắp ống 0,2ml và được làm khô ở nhiệt độ phòng, giữ dưới luồng không khí sạch trong tủ an toàn sinh học cấp 2 trong 6 giờ.

Phương pháp đông khô LAMP hai bước

Quy trình thực hiện phương pháp LAMP khô được thực hiện và tối ưu dựa vào quy trình đã công bố của tác giả Salim & cs. (2018) (Hình 1B).

Chế phẩm LAMP khô hai bước bao gồm 1 μl Bst DNA polymerase 2.0; 0,35 μl dNTPs 100mM; 2 μl Trehalose 2M đặt ở nắp ống 0,2ml và để khô trong vòng 30 phút, sau đó bổ sung 1,3 μl hỗn hợp môi (bao gồm 100mM môi bên ngoài (F3 và B3), môi trong (FIP và BIP) và môi vòng (LF và LB); 1 μl chỉ thị màu kép Colori fluorescent indicator (CFI) bao gồm 3mM HNB và 0,35% v/v GelGreen. Tiếp tục làm khô ở nhiệt độ phòng dưới luồng không khí sạch trong tủ an toàn sinh học cấp 2 cho đến khi khô hoàn toàn, khoảng 3h.

Sau khi làm khô hàng tuần sẽ tiến hành đánh giá độ bền, hiệu quả của chế phẩm LAMP khô ở các nhiệt độ bảo quản khác nhau (4°C và nhiệt độ phòng).



Hình 1. Sản phẩm LAMP khô một bước (A - trước làm khô và B - sau làm khô) và sản phẩm LAMP khô hai bước (C - trước làm khô và D - sau làm khô)

2.2.5. Phương pháp LAMP khô

Phương pháp LAMP khô một bước

Bổ sung thêm 20µl DW và 5µl DNA từ mẫu máu có kết quả dương tính với ASF bằng real-time PCR (ct: 16,72) đã ly giải bằng TritonX-100 0,1% để có thể tích cuối là 25µl vào mỗi ống đông khô.

Phương pháp LAMP khô hai bước

Bổ sung đệm với thành phần: 0,5µl Tris-HCL 1M ; 0,25µl KCL 1M; 1,8µl MgSO₄ 100mM; 17,5µl Triton X-100 0,1% với dung lượng 20µl và 5µl DNA từ mẫu máu có kết quả dương tính với ASF bằng real-time PCR (ct: 16,72) đã ly giải bằng TritonX-100 0,1% để có thể tích cuối là 25µl vào mỗi ống đông khô.

Các ống LAMP khô một bước và hai bước sau khi đã bổ sung dung dịch đệm và DNA vào mỗi ống thì úp ngược các ống trong thời gian 1 phút để hoàn nguyên phân hóa chất đông khô, vortex và spin. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được ủ ở điều kiện 65°C trong thời gian 60 phút, sau đó tăng lên 80°C trong thời gian 5 phút để dừng phản ứng. Đọc kết quả phản ứng bằng mắt thường qua sự thay đổi màu của chỉ thị màu kim loại HNB và bằng đèn UV có bước sóng 315nm với sự có mặt chỉ thị màu huỳnh quang GelGreen do cực đại kích thích/phát xạ của GelGreen là 500nm/530nm.

2.2.6. Phương pháp xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp LAMP khô

Phương pháp real-time PCR được sử dụng làm phương pháp tiêu chuẩn để đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của phương pháp LAMP trong chẩn đoán ASFV từ các mẫu thực địa. Tổng số 49 mẫu máu đã được kiểm tra đồng thời bằng cả hai phương pháp real-time PCR và LAMP khô. Trên cơ sở đó, độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp LAMP khô sẽ được đánh giá như sau:

		Phương pháp real-time PCR	
		Dương tính	Âm tính
Phương pháp	Dương tính	a	b
LAMP khô	Âm tính	c	d

$$\text{Độ nhạy (Se)} = a/(a + c),$$

$$\text{Độ đặc hiệu (Sp)} = d/(b + d).$$

2.3. Xử lý số liệu

Độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp LAMP khô được tính toán bằng phần mềm MedCalc.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. So sánh hiệu quả của các phương pháp tách chiết DNA trực tiếp

Để giảm giá thành, chúng tôi tách chiết DNA từ mẫu bệnh phẩm trực tiếp mà không sử dụng kit chiết tách thương mại mà xử lý mẫu với đệm ly giải có bổ sung chất tẩy rửa kết hợp với xử lý nhiệt. Sự có mặt của các chất tẩy rửa như Triton X-100, SDBS kết hợp với xử lý nhiệt sẽ làm biến tính hoàn toàn cấu trúc hạt virus, giải phóng DNA vào đệm chiết. Các thành phần của đệm ly giải sẽ được tối ưu để đảm bảo hiệu suất thu hồi DNA, cũng như loại bỏ chất ức chế phản ứng LAMP khô. Hiệu quả của hai phương pháp tách chiết DNA trực tiếp bằng SDBD 1% và Triton X-100 0,1% được so sánh thông qua phản ứng real-time LAMP. Kết quả cho thấy với phương pháp tách chiết DNA trực tiếp bằng Triton X-100 0,1% cho kết quả dương tính Tp (Time of positivity) ở 22 phút 59 (đường khuếch đại màu xanh) và phương pháp tách chiết DNA trực tiếp bằng SDBS 1% cho kết quả dương tính Tp ở 25 phút 45 giây (đường khuếch đại màu xám) (Hình 2A). Điều này có thể cho thấy phương pháp tách chiết DNA trực tiếp bằng Triton X-100 0,1% cho hiệu quả thu hồi DNA cao hơn.

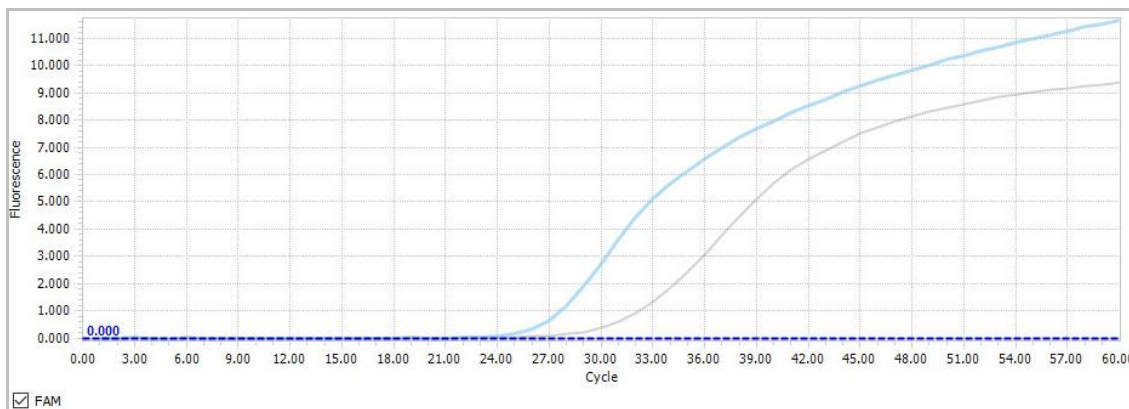
Tuy nhiên, kết quả phản ứng khi quan sát bằng mắt thường thì LAMP sử dụng phương pháp tách chiết DNA trực tiếp bằng SDBS 1% dễ đọc kết quả hơn (Hình 2B). Còn phản ứng LAMP sử dụng phương pháp tách chiết DNA trực tiếp bằng Triton X-100 0,1% thì kết quả khó quan sát hơn (Hình 2C). Điều này có thể là do LAMP sử dụng phương pháp tách chiết DNA trực tiếp bằng Triton X-100 0,1% mẫu máu chưa được xử lý nhiệt nên gây ra hiện tượng tán huyết do máu đông làm ảnh hưởng đến việc đọc kết quả của phản ứng bằng mắt thường. Tuy nhiên, màu của mẫu máu không ảnh hưởng tới kết quả của phản ứng khi quan sát kết quả dưới đèn UV (Hình 2D). Trong khi LAMP sử dụng

phương pháp tách chiết DNA trực tiếp bằng SDBS 1%, mẫu máu sau khi bổ sung SDBS đã được làm nóng ở 95°C sẽ đông lại, do đó việc ly tâm và thu dịch nổi có tác dụng làm giảm hiện tượng tán huyết, giúp cho việc đọc kết quả bằng mắt thường dễ dàng hơn. SDBS 1% cũng đã được sử dụng hiệu quả trong tách chiết DNA trực tiếp cho chẩn đoán BLV bằng phương pháp LAMP (Yamazaki & cs., 2020). Triton X-100 0,1% cũng đã được sử dụng để chiết tách DNA trực tiếp cho phương pháp LAMP cho chẩn đoán ASF (Tran & cs., 2021), tuy nhiên mẫu chẩn đoán là huyết thanh nên cần thời gian để xử lý sau khi lấy mẫu để thu huyết thanh.

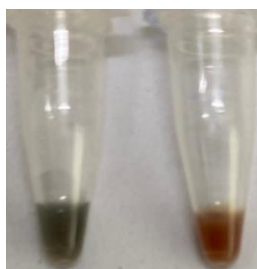
3.2. So sánh hiệu quả của các phương pháp đông khô LAMP

Quy trình đông khô các hóa chất LAMP trong điều kiện tự nhiên như sau: các phụ gia

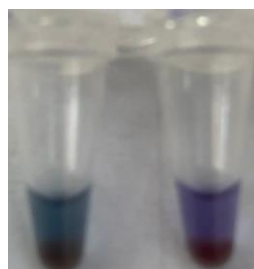
(glycerol, trehalose) sẽ được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng LAMP (toàn bộ các hóa chất trừ DNA). LAMP khô 1 bước, tất cả các thành phần phản ứng LAMP bao gồm môi, enzyme, chỉ thị màu, dNTPs, các thành phần đệm (Tris-HCL; KCL; MgSO₄) đã được bổ sung và làm khô trong một bước. Trong LAMP khô 2 bước, chỉ các thành phần môi, enzyme, chỉ thị màu, dNTPs được làm khô trong hai bước, còn lại các thành phần đệm (Tris-HCL; KCL; MgSO₄) của phản ứng LAMP không được làm khô mà kết hợp với Triton X-100 0,1% làm dung môi hoà tan khi tiến hành phản ứng. Kết quả đánh giá hiệu quả của các phương pháp đông khô LAMP cho thấy, với LAMP đông khô hai bước cho kết quả dương tính Tp ở 30 phút 54 (đường khuếch đại màu xám) và LAMP đông khô một bước cho kết quả dương tính Tp ở 36 phút 59 giây (đường khuếch đại màu xanh) (Hình 3).



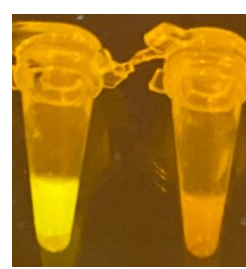
(A)



(B)



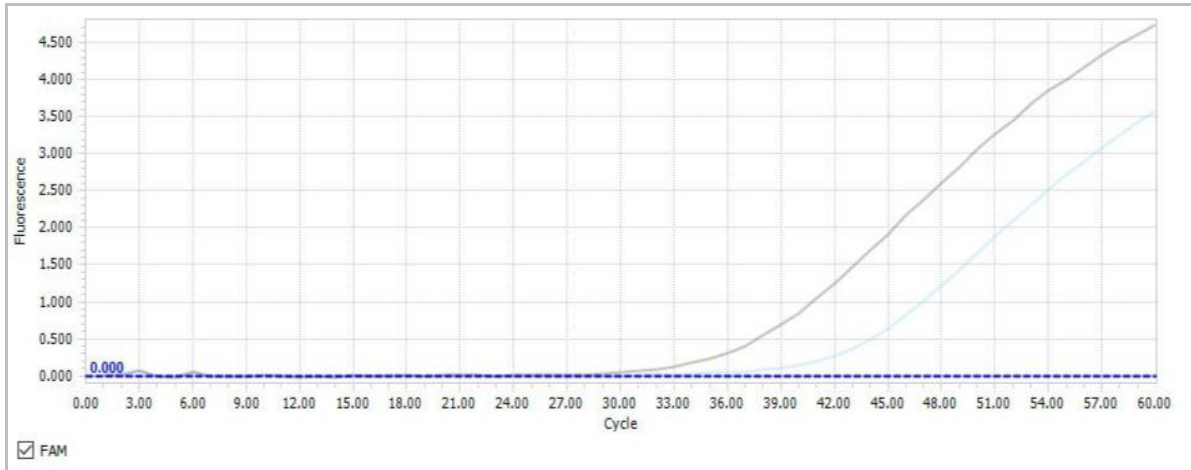
(C)



(D)

Ghi chú: A: Real-time LAMP, B: Kết quả quan sát bằng mắt thường phương pháp LAMP tách chiết DNA trực tiếp bằng SDBS 1% (ống bên trái là dương tính và ống bên phải là âm tính). C: Kết quả quan sát bằng mắt thường phương pháp LAMP tách chiết DNA trực tiếp bằng Triton X-100 0,1% (ống bên trái là dương tính và ống bên phải là âm tính). D: Kết quả quan sát dưới đèn UV sản phẩm LAMP tách chiết DNA trực tiếp bằng Triton X-100 0,1% (ống bên trái là dương tính và ống bên phải là âm tính).

Hình 2. So sánh hiệu quả của các phương pháp tách chiết ADN trực tiếp



Hình 3. So sánh hiệu quả của các phương pháp đông khô LAMP

Như vậy, LAMP đông khô hai bước cho hiệu quả khuếch đại nhanh hơn so với LAMP đông khô một bước. Điều này có thể là do Trehalo, chất có tác dụng bảo quản protein đã được sử dụng trong bước một của quá trình đông khô hai bước vì ở bước này enzyme Bst DNA polymerase là thành phần mẫn cảm với nhiệt độ nhất trong phản ứng LAMP đã được bảo quản bởi Trehalo do enzyme Bst DNA polymerase hoạt động tối ưu trong khoảng nhiệt độ 60-65°C (Oscorbin & Filipenko, 2023). Enzyme Bst DNA polymerase đã được bảo quản nhanh ở bước làm khô đầu do trehalo có tác dụng bảo vệ protein không ổn định khỏi bị hư hại và biến tính do hiện tượng hút ẩm và stress oxy hóa.

3.3. Đánh giá ảnh hưởng của các điều kiện bảo quản

Các ống đông khô được chia đều vào hai lọ thủy tinh tối màu có các gói hút ẩm và bọc trong giấy bạc chắn sáng để hạn chế tác động của ánh sáng vì các thành phần phản ứng có hoá chất mẫn cảm với ánh sáng và được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau (4°C và nhiệt độ phòng) (Thapa & cs., 2019). Sau đó, hàng tuần sẽ tiến hành đánh giá độ bền của chế phẩm LAMP khô ở các nhiệt độ bảo quản khác nhau. Kết quả kiểm tra độ bền của chế phẩm LAMP khô ở các điều kiện khác nhau được trình bày ở bảng 2.

Kết quả cho thấy phương pháp LAMP khô một bước vẫn cho hiệu quả chẩn đoán tốt sau 2

tháng bảo quản ở cả 4°C và nhiệt độ phòng, còn phương pháp LAMP khô hai bước ở nhiệt độ 4°C vẫn cho hiệu quả chẩn đoán tốt sau 2,5 tháng bảo quản. Nghiên cứu trước đây cho thấy chế phẩm LAMP khô vẫn cho kết quả khuếch đại DNA tốt sau 4 tháng bảo quản ở nhiệt độ phòng (Salim & cs., 2018). Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, chế phẩm LAMP khô khi bảo quản ở nhiệt độ phòng có tính ổn định kém hơn. Điều này có thể là do chúng tôi tiến hành đông khô tại thời điểm đầu mùa hè với điều kiện thời tiết đặc trưng ở miền Bắc nước ta là ẩm độ cao và nhiệt độ cao nên có thể làm ảnh hưởng tới hiệu suất của enzym cũng như các thành phần khác trong chế phẩm LAMP khô.

3.4. Độ nhạy, độ đặc hiệu của phương pháp LAMP khô

Tổng cộng 49 mẫu máu đã được sử dụng để đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp LAMP khô hai bước sau 2,5 tháng bảo quản trong chẩn đoán ASFV. Kết quả cho thấy, có 37/49 mẫu dương tính với real-time PCR đều cho kết quả dương tính với LAMP khô (Bảng 3). Năm mẫu dương tính với phương pháp real-time PCR nhưng lại cho kết quả âm tính với phương pháp LAMP khô. Không có mẫu nào âm tính với phương pháp real-time PCR mà lại cho kết quả dương tính với LAMP khô. Do đó, độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp LAMP khô là 88,1% và 100%.

Bảng 2. Độ bền của chế phẩm LAMP khô ở các điều kiện bảo quản khác nhau

Thời gian	LAMP khô một bước		LAMP khô hai bước	
	4°C	Nhiệt độ phòng	4°C	Nhiệt độ phòng
1 tuần	+	+	+	+
2 tuần	+	+	+	+
1 tháng	+	+	+	+
2 tháng	+	+	+	+
2,5 tháng	-	-	+	-

Ghi chú: +: Kết quả LAMP dương tính; -: Kết quả LAMP âm tính.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp LAMP khô

Phương pháp		Phương pháp real-time PCR		
		Dương tính	Âm tính	Tổng
LAMP khô	Dương tính	37	0	37
	Âm tính	5	7	12
	Tổng	42	7	49

Một số nghiên cứu trước đây cũng đã đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp LAMP khô bằng các mẫu thực nghiệm (Yoshikawa & cs., 2014; Thapa & cs., 2019). Phương pháp LAMP khô trong chẩn đoán Mycobacterium tuberculosis từ 69 mẫu thực địa cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 92,8% và 96,3% (Thapa & cs., 2019). Trong nghiên cứu của chúng tôi, phương pháp LAMP khô có độ nhạy thấp hơn có thể là do số lượng mẫu thực địa còn ít, đồng thời trong nghiên cứu này, 5 mẫu dương tính với phương pháp real-time PCR nhưng lại âm tính với phương pháp LAMP khô có thể là do những mẫu này có tải lượng virus thấp hơn vì những mẫu này đều có giá trị ct là > 28. Giới hạn phát hiện của LAMP khô là những mẫu có giá trị ct ≤ 28". Nhược điểm chính của phương pháp LAMP khô trực tiếp khi sử dụng Triton X-100 0,1% để chiết tách DNA là đọc kết quả bằng mắt thường gặp khó khăn do hiện tượng tán huyết, tuy nhiên lại không bị ảnh hưởng khi đọc kết quả dưới đèn UV. Nghiên cứu trước của Ngan & cs. (2023) cho thấy phương pháp LAMP khi tách chiết DNA trực tiếp bằng SDBS 1% thì việc đọc kết quả

bằng mắt thường không bị ảnh hưởng do không có hiện tượng tán huyết. Phương pháp LAMP có độ nhạy cao, nên cần thực hiện làm khô trong tủ an toàn sinh học cấp 2, các ống sản phẩm phản ứng sau khi khuếch đại tuyệt đối không mở nắp để tránh tạp nhiễm.

Hạn chế trong nghiên cứu hiện tại của chúng tôi là chưa sử dụng ADN virus, vi khuẩn khác để đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp LAMP khô. Đồng thời trong nghiên cứu này mới chỉ so sánh hai phương pháp chiết tách trực tiếp với nhau, chưa so sánh được với phương pháp tách chiết bằng kit thương mại. Thời gian bảo quản của các chế phẩm LAMP khô còn ngắn. Phương pháp làm khô trong buồng cấy sinh học cấp II mới chỉ đáp ứng số lượng nhỏ. Cần tiếp tục nghiên cứu biện pháp làm khô khác nhằm đưa vào sản xuất số lượng lớn. Hơn nữa việc đọc kết quả bằng mắt thường còn kém nhạy.

4. KẾT LUẬN

Việc ứng dụng Triton X-100, SDBS kết hợp với xử lý nhiệt để chiết tách trực tiếp DNA là công cụ hữu hiệu giúp giảm giá thành trong xét

nghiệm. Phương pháp LAMP khô hai bước có hiệu quả khuếch đại DNA cao hơn so với phương pháp LAMP một bước. Cả hai phương pháp LAMP khô đều có hiệu quả tốt ở các điều kiện bảo quản sau 2 tháng. Độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp LAMP khô hai bước là 88,1% và 100%. Như vậy, phương pháp LAMP khô hứa hẹn là công cụ hữu hiệu cho chẩn đoán sớm bệnh ASF, giúp hỗ trợ sàng lọc các cá thể bị nhiễm bệnh tại thực địa, nâng cao hiệu quả của công tác phòng chống bệnh. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi là thời gian bảo quản của chế phẩm LAMP khô còn ngắn, do đó cần có các nghiên cứu sâu hơn để duy trì tính ổn định lâu dài của enzyme ở nhiệt độ cao cũng như tránh nhu cầu về chuỗi lạnh nhằm kéo dài thời gian bảo quản của chế phẩm LAMP khô.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 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.
- Hayashida K., Kajino K., Hachaambwa L., Namangala B. & Sugimoto C. (2015). Direct blood dry LAMP: a rapid, stable, and easy diagnostic tool for Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 9(3): e0003578.
- James H.E., Ebert K., Mcgonigle R., Reid S.M., Boonham N., Tomlinson J.A., Hutchings G.H., Denyer M., Oura C.A., Dukes J.P. & King D.P. (2010). Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods.* 164(1-2): 68-74.
- Mee P.T., Wong S., O'riley K.J., Da Conceição F., Bendita Da Costa Jong J., Phillips D.E., Rodoni B.C., Rawlin G.T. & Lynch S.E. (2020). Field Verification of an African Swine Fever Virus Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay During an Outbreak in Timor-Leste. *Viruses.* 12(12).
- Nagamine K., Hase T. & Notomi T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 16(3): 223-229.
- Ngan M.T., Thi My Le H., Xuan Dang V., Thi Bich Ngoc T., Phan L. V., Thi Hoa N., Quang Lam T., Thi Lan N., Notsu K., Sekiguchi S., Yamazaki Y. & Yamazaki W. (2023). Development of a highly sensitive point-of-care test for African swine fever that combines EZ-Fast DNA extraction with LAMP detection: Evaluation using naturally infected swine whole blood samples from Vietnam. *Veterinary Medicine and Science.* 9(3): 1226-1233.
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N. & Hase T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28(12): e63-e63.
- Oscorbin I. & Filipenko M. (2023). Bst polymerase - a humble relative of Taq polymerase. *Comput Struct Biotechnol J.* 21: 4519-4535.
- Salim B., Hayashida K., Mossaad E., Nakao R., Yamagishi J. & Sugimoto C. (2018). Development and validation of direct dry loop mediated isothermal amplification for diagnosis of *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Parasitology.* 260: 53-57.
- Sánchez-Vizcaíno J.M., Mur L., Gomez-Villamandos J. C. & Carrasco L. (2015). An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J Comp Pathol.* 152(1): 9-21.
- Thapa J., Maharjan B., Malla M., Fukushima Y., Poudel A., Pandey B.D., Hyashida K., Gordon S.V., Nakajima C. & Suzuki Y. (2019). Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by a dry methyl green loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Tuberculosis (Edinb).* 117: 1-6.
- Tran D.H., Tran H.T., Le U.P., Vu X.D., Trinh T.B.N., Do H.D.K., Than V.T., Bui L.M., Vu V.V., Nguyen T.L., Phung H.T.T. & Le V.P. (2021). Direct colorimetric LAMP assay for rapid detection of African swine fever virus: A validation study during an outbreak in Vietnam. *Transbound Emerg Dis.* 68(4): 2595-2602.
- Wang D., Yu J., Wang Y., Zhang M., Li P., Liu M. & Liu Y. (2020). Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and visual LAMP assay for detection of African swine fever virus (ASFV). *J Virol Methods.* 276: 113775.
- Yamazaki Y., Thongchankaew-Seo U., Nagao K., Mekata H. & Yamazaki W. (2020). Development and evaluation of a point-of-care test with a combination of EZ-Fast DNA extraction and real-time PCR and LAMP detection: evaluation using blood samples containing the bovine leukaemia DNA. *Lett Appl Microbiol.* 71(6): 560-566.
- Yoshikawa T., Matsuo T., Kawamura Y., Ohashi M., Yonekawa T., Kanda H., Notomi T. & Ihira M. (2014). Direct detection of human herpesvirus 6B by the LAMP method using newly developed dry-reagents. *Journal of Virological Methods.* 201: 65-67.