

Nâng cao - tham khảo

LIỀU LÂY NHIỄM CỦA VIRUS DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI KHI CHO LỢN UỐNG NƯỚC HOẶC ĂN THỨC ĂN BỊ NHIỄM VIRUS MỘT CÁCH TỰ NHIÊN

Megan C. Niederwerder, Ana M.M. Stoian, Raymond R.R. Rowland, Steve S. Dritz, Vlad Petrovan, Laura A. Constance, Jordan T. Gebhardt, Matthew Olcha, Cassandra K. Jones, Jason C. Woodworth, Ying Fang, Jia Liang, Trevor J. Hefley
Đại học tiểu bang Kansas, Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA

TÓM TẮT

Dịch tả lợn châu Phi (ASF) là một bệnh động vật truyền nhiễm, lây lan nhanh chóng, xuyên biên giới và là mối đe dọa lớn cho sản xuất thịt lợn trên toàn cầu. Mặc dù thức ăn nguồn gốc thực vật đã được xác định là một đường truyền lây virus tiềm năng ở trang trại lợn, vẫn còn ít hiểu biết về những nguy cơ truyền ASFV qua thức ăn. Mục đích của chúng tôi là xác định liều lây nhiễm tối thiểu và trung bình của chủng ASFV Georgia 2007 thông qua tiếp xúc đường miệng trong khi ăn, uống tự nhiên. Liều nhiễm trùng tối thiểu của ASFV trong thức uống là 10^0 liều lây nhiễm 50% tế bào nuôi cấy ($TCID_{50}$), so với 10^4 $TCID_{50}$ trong thức ăn. Liều lây nhiễm trung bình là $10^{1.0}$ $TCID_{50}$ với thức uống và $10^{6.8}$ $TCID_{50}$ với thức ăn. Phát hiện của chúng tôi chứng minh rằng ASFV Georgia 2007 có thể dễ dàng được truyền bằng đường miệng, mặc dù liều cao hơn là cần thiết để gây nhiễm qua đường ăn thức ăn nguồn gốc thực vật. Những dữ liệu này cung cấp thông tin quan trọng có thể được kết hợp vào các mô hình nghiên cứu nguy cơ truyền lây ASFV.

Virus Dịch tả lợn châu Phi (ASFV) là mối đe dọa mới nổi cho sản xuất lợn ở Bắc Mỹ và châu Âu. Trong thập kỷ qua, ASFV đã lan sang Đông Âu và Nga, gần đây nhất là Trung Quốc và Bỉ. Bệnh do ASFV gây ra đặc trưng bởi xuất huyết nghiêm trọng và tỷ lệ mắc bệnh bị tử vong là 100%. Virus là thành viên của họ *Asfarviridae* và là virus DNA lây truyền qua véc tơ duy nhất được biết đến. Việc kiểm soát bệnh gặp khó khăn do chưa có vaccin phòng bệnh hiệu quả, lợn hoang và ve là những động vật mang/vật chủ trung gian truyền ASFV. Vì chưa có vaccin cũng như biện pháp điều trị hiệu quả, việc ngăn ngừa ASFV xuất hiện là mục tiêu chính của các quốc gia chưa có dịch bệnh xuất hiện. Chiến lược giảm nhẹ bùng phát dịch Dịch tả lợn châu Phi (ASF) tập trung vào việc hạn chế vận chuyển lợn và tiến hành tiêu huỷ quy mô lớn các đàn lợn bị nhiễm bệnh. Ước tính ASFV tấn công vào Hoa Kỳ đã gây thiệt hại chi phí sản xuất đến hơn 4 tỷ đô la.

Các đợt bùng phát lịch sử, bao gồm ASFV tấn công vào vùng Kavkaz vào năm 2007 và sau đó lan sang Nga, đã được cho là do ăn các sản phẩm thịt lợn bị nhiễm bệnh hoặc trực tiếp tiếp xúc với lợn (10). ASFV sống sót trong thịt và máu trong nhiều tháng ở nhiệt độ phòng, có khả năng đề kháng với nhiệt độ và pH khắc nghiệt. Đặc tính phân tử của ASFV xâm nhập gần đây nhất vào Trung Quốc và Siberia chỉ ra sự tương đồng giữa các chủng virus phân lập được với chủng Georgia 2007. Các vụ dịch này đã xảy ra trong các đàn lợn cách nhau hàng nghìn ki-lô-mét. Ví dụ, ASFV lây lan khoảng 2.100 km từ thành phố Thẩm Dương ở miền bắc Trung Quốc đến thành phố Ôn Châu, phía nam Thượng Hải trong khoảng 3 tuần. Ngoài ra, sự xâm nhập của ASFV đã được báo cáo gần đây tại một trang trại quy mô lớn có điều kiện an toàn sinh học tốt ở Romania. Nước sông Danube bị ô nhiễm có

liên quan đến việc ASFV lây lan đến 140.000 trang trại chăn nuôi lợn. Thức ăn bị ô nhiễm là một nguồn truyền lây bệnh xuyên biên giới vào những khu vực chăn nuôi có điều kiện an toàn sinh học tốt được công nhận là một yếu tố nguy cơ chính kể từ khi vụ dịch tiêu chảy ở lợn do virus xảy ra ở Mỹ vào năm 2013. Bài học rút ra từ dịch lợn tiêu chảy do virus cho thấy sự cần thiết phải kiểm soát nguy cơ làm lây lan dịch bệnh động vật khác qua biên giới của thức ăn chăn nuôi. Tuy nhiên, dữ liệu xác định nguy cơ lan truyền ASFV thông qua thức ăn hoặc các nguyên liệu dùng chế biến thức ăn chăn nuôi vẫn còn hạn chế.

Vào năm 2014, sự xâm nhập và lây lan của ASFV ở Latvia có liên quan tới việc cho lợn ăn cỏ hoặc cây trồng tươi bị nhiễm virus. Hơn nữa, nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng ASFV sống sót trong nguyên liệu chế biến thức ăn chăn nuôi, chẳng hạn như thức ăn thông thường từ đậu nành, thức ăn đậu nành hữu cơ, bánh dầu nành, và choline, trong điều kiện mô phỏng một chuyến hàng được vận chuyển qua Đại Tây Dương từ Đông Âu đến Mỹ. Các báo cáo này cho thấy sự lây lan của ASFV có thể do những đường lây truyền ít được ghi nhận hơn, chẳng hạn như thức ăn, nước uống.

ASFV có thể được lây truyền qua nhiều đường khác nhau, bao gồm đường tiêm bắp, mũi họng hay qua những tiếp xúc trực tiếp. Tuy nhiên, trong rất nhiều nghiên cứu về sự truyền lây qua đường mũi họng, ASFV đã được đặt trực tiếp vào miệng hoặc trên hạch amidan. Liều lây nhiễm ASFV trong thức ăn thực vật hoặc thức ăn dạng lỏng được tiêu thụ tự nhiên còn thiếu; hơn nữa, chưa có báo cáo nào về việc ASFV Georgia 2007 lây truyền qua thức ăn. Mặc dù các báo cáo trong lĩnh vực dịch tễ học cung cấp thông tin giả thuyết về đường lây truyền, nhưng chúng cung cấp rất ít thông tin về liều lây nhiễm. Vì vậy, mục đích của chúng tôi là 1) xác định mối quan hệ giữa khả năng nhiễm và liều nhiễm, 2) xác định liều gây nhiễm tối thiểu (MID) hoặc liều thấp nhất đủ để ASFV nhiễm vào 1 con lợn trở lên, và 3) xác định liều gây nhiễm trung bình (ID_{50}) hay liều cần thiết để gây nhiễm 50% lợn thí nghiệm của

ASFV Georgia 2007 khi tiêu thụ tự nhiên thức ăn hoặc đồ uống bị nhiễm virus.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1.1. Chuẩn bị ASFV để gây nhiễm

Chủng ASFV Georgia 2007/1 đã được sử dụng trong nghiên cứu này. Virus sử dụng trong thí nghiệm đã được tạo ra từ mô bào lá lách của lợn nhiễm ASFV trong vụ dịch Dịch tả lợn châu Phi ở Georgia năm 2007. Mô bào lá lách được cắt nhỏ và bảo quản trong môi trường bảo quản tế bào chứa dung dịch muối phốt phát (PBS) có bổ sung penicillin/streptomycin và chất kháng nấm. Huyền dịch được ly tâm 4000 x g trong 30 phút, phần huyền phù thu được được bảo quản ở 4°C. Phần cặn thu được sau ly tâm được hòa tan trong dung dịch PBS vô trùng có bổ sung kháng sinh và kháng nấm và trải qua 3 chu kỳ đông đá và rã đông để thu được huyền dịch virus. Huyền dịch thu được được ly tâm và phần dịch nổi trong có chứa virus được bảo quản ở 4°C.

Để định lượng virus, các đại thực bào phế nang lợn (PAMs) đã được thu thập bằng cách rửa phổi lợn con 3 - 5 tuần tuổi. PAMs được nuôi cấy trong môi trường RPMI có bổ sung 10% huyết thanh thai bò và kháng sinh, ủ ấm ở 37°C có 5% CO_2 trong 2 ngày. Sau đó, bộ pha loãng 10 lần liên tiếp đã được chuẩn bị, lặp lại 3 lần và dịch pha loãng PAMs được nhỏ vào các giếng của đĩa nhựa 96 giếng. Đĩa nhựa chứa hỗn dịch PAMs đã pha loãng được ủ ở 37°C trong 3 ngày, sau đó các tế bào đã được cố định bằng cách sử dụng acetone 80% trong 10 phút. Các tế bào được nhuộm màu bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng p30 được pha loãng 1:6.000. Đĩa 96 giếng được ủ ấm ở 37°C trong 1h và rửa 3 lần bằng PBS. Kháng thể đã gắn được phát hiện bằng kháng thể chuột kháng dê (AlexaFluor 488; Thermo Fisher Scientific, <https://www.thermofisher.com> External Link) được pha loãng 1:400 và ủ ấm trong 1 giờ ở 37°C. Các tế bào đã nhuộm được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang soi ngược (Evos FL; Thermo Fisher Scientific) và tính toán liều gây nhiễm 50% tế bào nuôi cấy trong 1 ml ($TCID_{50}/mL$) dựa theo phương pháp Reed và Muench (28).

Phần dịch nổi trong chứa ASFV Georgia 2007 thu được từ mô bào lá lách lợn được pha loãng bằng môi trường RPMI, với liều từ 10^0 TCID₅₀ đến 10^8 TCID₅₀ được bổ sung đến thể tích cuối cùng thu được là 100ml RPMI hoặc 100g thức ăn hoàn chỉnh. Thức ăn gồm ngô và đậu nành được phối hợp khẩu phần dinh dưỡng cân đối phù hợp với khuyến nghị của Hội đồng nghiên cứu quốc gia dành cho lợn có trọng lượng từ 10-25kg. Khẩu phần ăn không chứa bất kỳ một thành phần thức ăn có nguồn gốc động vật nào. Để trộn virus vào thức ăn, 10ml virus được sử dụng để hấp phụ vào 100g thức ăn trong lọ mật độ cao polyethylene, hình tròn, miệng rộng (Nalgene, Thermo Fisher Scientific) trong 30 giây, trước khi đồng nhất bằng cách xoay tròn và lắc lọ nhẹ nhàng bằng tay.

1.2. Động vật và chuồng nuôi

Việc sử dụng lợn và virus trong nghiên cứu được thực hiện theo Hướng dẫn cách chăm sóc và sử dụng động vật nông nghiệp trong Nghiên cứu và giảng dạy của Liên đoàn Khoa học xã hội động vật, Luật phúc lợi động vật và Quy định phúc lợi động vật của Bộ Nông nghiệp Mỹ. Nghiên cứu này đã được chấp thuận bởi Ủy ban Chăm sóc và sử dụng động vật của Trường Đại học bang Kansas và Ủy ban thể chế an toàn sinh học.

Chúng tôi đã nhận 84 con lợn lai (tuổi trung bình $51,8 \pm 2,2$ ngày) từ một nguồn cung cấp lợn sạch duy nhất. Lợn được nhốt trong 3 phòng giống nhau có diện tích 66 m² tại Viện nghiên cứu sinh học của Đại học bang Kansas và được nuôi trong điều kiện an toàn sinh học nông nghiệp cấp độ 3. Môi trường trong phòng được kiểm soát, và trao đổi không khí hoàn toàn diễn ra 14,5 lần/giờ trong mỗi phòng. Mỗi lợn được nhốt riêng trong lồng 1,9 m², và mỗi lồng được đặt cách nhau >1,5m trong phòng. Các lồng thép không gỉ được treo lên và có sàn lót có rãnh. Ba mặt của lồng chắc chắn, mặt thứ tư có các song thép và một cổng. Tất cả các biện pháp đã được thực hiện để ngăn ngừa sự lây lan của virus trong không khí. Những con lợn đối chứng âm được nhốt trong phòng nhằm mục đích giám sát khả năng lây nhiễm chéo giữa các lồng.

1.3. Thiết kế thí nghiệm

Chúng tôi thiết kế thí nghiệm và cách tiếp cận để xác định liều truyền nhiễm trung bình của ASFV Georgia 2007 dựa trên việc ứng dụng và điều chỉnh quy trình trước đây đã áp dụng với virus Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn. Chúng tôi tiến hành lặp lại 7 lần đối với cả nước uống và thức ăn, mỗi lần gồm 6 lợn cho uống và 6 lợn cho ăn thức ăn. Trong mỗi lần lặp lại đối với thức ăn hoặc nước uống, chúng tôi áp dụng liều ASFV đặc hiệu cho 5 lợn; 1 lợn được dùng làm đối chứng âm. Một thiết kế nghiên cứu thích nghi được tích hợp trong suốt quá trình thử nghiệm để mang lại ước tính ID₅₀ chính xác nhất trong khi tối đa hóa thông tin thu được từ phép thử. ID₅₀ được ước lượng dựa trên các kết quả đã công bố trước đây. Chúng tôi sử dụng thông tin này để xác định liều gây nhiễm thí nghiệm ban đầu là 10^3 TCID₅₀ đối với thức uống và 10^4 TCID₅₀ đối với thức ăn. Sau khi hoàn thành lần lặp lại đầu tiên, chúng tôi sử dụng phương pháp đánh giá liên tục để cập nhật ước lượng ID₅₀. Kết quả của mỗi lần lặp lại đã được sử dụng để lựa chọn liều cho lần lặp lại tiếp theo; về tổng thể, quá trình này dẫn đến việc tăng liều lượng thức uống và lượng thức ăn thì giảm dần sau khi hoàn thành lần lặp lại ban đầu. Toàn bộ các lần thử nghiệm và số lượng lợn cho mỗi liều được trình bày ở bảng 1.

Với đường uống, lợn tiêu thụ ASFV trộn trong thể tích 100ml môi trường RPMI. Chắt lỏng được cung cấp thông qua một bình uống nước có núm vú bị giới hạn lưu lượng (Arato 76 Piglet Drinker; Ag Works International, <http://www.agworksintl.com>) được gắn trên một khung giá mạ kẽm có thể điều chỉnh được (1,3cm × 61cm pipe; SMB Manufacturing, <https://www.smbmfg.com>). Nếu lợn không muốn uống nước từ núm vú, đồ uống được đặt trong một bát nhỏ bằng thép không gỉ để cho lợn uống. Đối với thức ăn, lợn tiêu thụ ASFV trộn lẫn với khối lượng thức ăn hoàn chỉnh 100g được cung cấp qua máng ăn bằng thép không gỉ rộng 23 cm (Vittetoe Inc.). Mức độ lây nhiễm của virus trong mỗi độ pha loãng được chuẩn độ lại trên PAMs bằng phương pháp chuẩn độ điểm cuối (TCID₅₀/mL) để xác định liều lượng chính

Bảng 1. Thử nghiệm cho lợn tiếp xúc với ASFV bằng miệng qua nước uống hoặc thức ăn dựa trên thiết kế thí nghiệm thích nghi tuần tự để xác định liều ASFV gây nhiễm khi được tiêu thụ tự nhiên*

Liều ASFV, TCID ₅₀	Thử nghiệm với nước uống, số được kiểm tra (số dương tính)							Thử nghiệm với thức ăn nguồn gốc thực vật, số được kiểm tra (số dương tính)						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
10 ⁰	-	-	-	-	3 (3)	-	5 (0)	-	-	-	-	-	-	-
10 ¹	-	-	5 (3)	5 (1)+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ²	-	4 (2)	-	-	2 (2)	2 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ³	5 (5)	1 (0)	-	-	-	-	-	-	5 (0)	-	-	-	-	-
10 ⁴	-	-	-	-	-	3 (3)	-	5 (2)+	-	-	-	-	-	-
10 ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5 (2)	5 (2)	-	-	-
10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3 (0)	-	5 (2)
10 ⁷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (0)	3 (2)	-
10 ⁸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (1)	-

*Dữ liệu được trình bày của 5 con lợn nhiễm bệnh. Trong mỗi lần lặp lại, có 1 con lợn đối chứng âm. ASFV, Virus Dịch tả lợn châu Phi; TCID₅₀ liều lây nhiễm 50% tế bào nuôi cấy; -: không có lợn thí nghiệm. + Một lợn trong một các lần lặp lại bị chết trước 5 ngày sau khi tiêm do nguyên nhân khác ASF và đã được loại trừ khỏi dữ liệu phân tích.

xác. Lợn đối chứng âm được cho ăn thức ăn và uống môi trường RPMI không chứa virus với liều lượng tương tự các lợn thí nghiệm.

Lợn được thích nghi với thiết bị cho uống và cho ăn trong khoảng 3-4 ngày trước khi gây nhiễm virus. Trong thời gian thích nghi này, nước và thức ăn (đường uống) hoặc riêng thức ăn (đường cho ăn) được giấu đi trước khi cho lợn ăn hoặc uống khoảng 10-14 giờ. Lợn được theo dõi trong suốt quá trình ăn hoặc uống. Khi lợn đã tiêu thụ hết lượng thức uống và thức ăn xác định, chúng sẽ được tự do ăn uống cho đến thời gian giấu thức ăn, nước uống tiếp theo. Sau khi thích nghi, 5 con lợn của mỗi lần thử nghiệm được cho ăn hoặc uống lượng thức ăn hoặc nước uống có chứa liều ASFV xác định, sau đó thì được ăn và uống tự do.

Chúng tôi đánh giá các dấu hiệu lâm sàng của lợn được đánh giá hai lần mỗi ngày để kiểm tra ASF và lấy mẫu máu của mỗi lợn ở ngày 0 và ngày 5 sau khi gây nhiễm (dpi). Những lợn có biểu hiện lâm sàng trước 5dpi được cho chết nhân đạo, mẫu máu và mô bào được thu thập.

Những lợn còn lại được cho chết nhân đạo vào 5dpi, và tiến hành mổ khám toàn diện. Chúng tôi đã xác định tình trạng nhiễm dựa vào realtime PCR để phát hiện ASFV trong máu hoặc lá lách và phân lập virus từ lá lách. Chúng tôi thiết lập đường cong liều đáp ứng và tính toán ID₅₀ như đã mô tả trong bài báo này.

1.4. ASFV PCR

Axit nucleic từ huyết thanh và huyền dịch lá lách được chiết tách bằng Kit MagMAX-96 Viral RNA Isolation (Thermo Fisher Scientific). Để tách axit nucleic, chúng tôi kết hợp 50 µL mẫu với 20 µL hạt/Bi (có chứa dung dịch làm tan/gắn, RNA vận chuyển, và isopropanol 100%) trong giếng của đĩa nhựa 96 giếng, đáy chữ U. Dung dịch tế bào bằng cách sử dụng 130 µL dung dịch làm tan/gắn và lắc bằng máy lắc trong 5 phút. Các hạt được gắn bởi các thanh từ và rửa 2 lần bằng 150 µL dung dịch rửa 1 và 2, axit nucleic được thu lại trong dung dịch dung ly (elution buffer) với thể tích cuối cùng là 50 µL.

Đoạn gen p72 được khuếch đại bằng phương pháp PCR theo phương pháp của King *et al.*

(41). Hỗn hợp mẫu và mẫu dò, được tổng hợp và thương mại hóa bằng cách sử dụng PrimeTime Mini qPCR Assay (IDT Technologies), được sử dụng trong nghiên cứu này: trình tự mẫu dò (5'-[6-FAM]- CCA CGG GAG ZEN GAA TAC CAA CCC AGT G-3'-[IBFQ]), trình tự mẫu xuôi (5'-CTG CTC ATG GTA TCA ATC TTA TCG A-3'), và trình tự mẫu ngược (5'-GAT ACC ACA AGA TCR GCC GT-3'). 15 μ L dung dịch dùng chạy PCR gồm: 10 μ L 2X iTaq Universal Probes Supermix (Bio-Rad Laboratories), 1 μ L 1X PrimeTime Mini (500 nM các mẫu và 250 nM mẫu dò), và 4 μ L nước không chứa nuclease. Hỗn hợp phản ứng PCR được nhỏ vào đĩa nhựa cứng trong suốt 96 giếng - (Hard-Shell optical 96 well reaction plate Bio-Rad Laboratories), bổ sung DNA mẫu, và ly tâm nhanh đĩa nhựa để loại bỏ bọt khí. Phản ứng real-time PCR sử dụng hệ thống CFX96 Real-Time (Bio-Rad Laboratories) được thực hiện với các điều kiện sau: 95°C trong 2 phút, 45 chu kỳ tiếp theo, mỗi chu kỳ 94°C trong 30 giây, 58°C trong 1 phút, và 60°C trong 30 giây. Dữ liệu thu được được phân tích bằng phần mềm CFX96 và kết quả được báo cáo là giá trị ngưỡng của chu kỳ.

1.5. Phân tích dữ liệu

Chúng tôi đánh giá tính lây nhiễm bằng cách sử dụng 3 phương pháp chẩn đoán (PCR mẫu lá lách, PCR mẫu huyết thanh, và phân lập virus từ lá lách), từ đó tạo nên 3 biến phản ứng nhị phân (chẳng hạn dương tính hay âm tính) cho mỗi lợn. Nếu có từ một trong các phép chẩn đoán trở lên cho kết quả dương tính với virus, chúng tôi gọi là nhiễm trùng. Chúng tôi phân tích tất cả các phản ứng nhị phân đồng thời để đánh giá các thử nghiệm không thỏa mãn các điều kiện đặt ra.

Ngoài việc thừa nhận kết quả về mối quan hệ giữa liều và xác suất nhiễm trùng, chúng tôi còn sử dụng một mô hình hồi quy tuyến tính bất buộc. Các ràng buộc được sử dụng bị giới hạn để giả thiết rằng xác suất nhiễm trùng tăng khi tăng liều và sự tương quan là liên tục. Chúng tôi sử dụng hồi quy tuyến tính bất buộc trong mô hình Bayesian để ước lượng xác suất nhiễm trùng của mỗi liều đối với một lần phơi nhiễm dựa vào kết quả của 3 phương pháp chẩn đoán. Dựa vào

mỗi lần phơi nhiễm, chúng tôi cũng mô hình hóa các lần phơi nhiễm lặp lại, giả thiết các lần phơi nhiễm lặp lại là những sự kiện độc lập. Từ đó, chúng tôi tính toán xác suất nhiễm trùng với nhiều lần phơi nhiễm là $1 - (1 - p)^q$, trong đó p là xác suất nhiễm trùng của một lần phơi nhiễm và q là số lần phơi nhiễm. Các phơi nhiễm được lặp lại có thể được quan sát sự tác động lẫn nhau qua mạng (<https://trevorhefley.shinyapps.io/asfv>). Chúng tôi đã sử dụng thuật toán được mô tả trước đây để thiết lập mô hình thống kê bằng cách sử dụng gói cgam trong R. Chúng tôi đã cung cấp một hướng dẫn các chi tiết tính toán, chú thích mã máy để hỗ trợ độc giả thực hiện các mô hình tương tự, và mã cần thiết để tái tạo kết quả và số liệu liên quan đến phân tích.

II. KẾT QUẢ

Tóm tắt kết quả gây nhiễm được trình bày ở bảng 2.

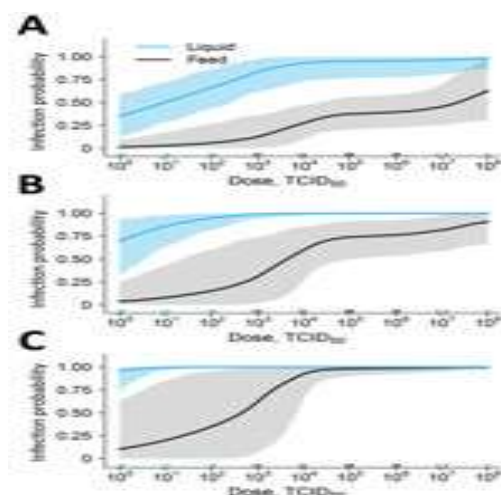
Tổng số 68 con lợn được sử dụng trong nghiên cứu này. Không dấu hiệu nhiễm ASF nào được phát hiện ở 14 con lợn đối chứng âm. Điều này chứng tỏ rằng điều kiện an ninh sinh học đã được duy trì tốt trong suốt thời gian thí nghiệm. Trong số 32 con lợn có biểu hiện nhiễm ASFV, 16 con (50%) đã phân lập được virus và cho phản ứng PCR từ mẫu lá lách dương tính, 8 con (25%) chỉ phân lập được virus từ mẫu lá lách và 8 (25%) cho kết quả dương tính ở cả 3 chỉ tiêu phân tích. 34 con lợn dùng cho thử nghiệm cho ăn đã ăn hết 100g thức ăn trong khoảng thời gian trung bình $14,8 + 5,5$ phút (tối thiểu 7 phút, tối đa 30 phút). Với thử nghiệm cho uống, 34 con lợn thí nghiệm đã uống hết 100ml hỗn dịch ASFV trong khoảng thời gian trung bình là $21,1 + 18,2$ phút (tối thiểu 3 phút, tối đa 63 phút). Một số ít lợn (3/34 [8,8%]) không muốn mút bú từ núm vú có giới hạn lưu lượng, những lợn này đã uống hỗn dịch virus từ bát.

Nhìn chung, xác suất lây nhiễm tăng dần theo liều tăng dần đối với cả thức ăn và nước uống (hình 1). Liều thấp nhất cần thiết để gây nhiễm ASFV cho >1 con lợn, MID sau khi uống virus là 10^0 TCID₅₀, trong khi 10^4 TCID₅₀ là MID cần thiết để gây nhiễm lợn sau khi cho ăn thức ăn

Bảng 2. Tóm tắt kết quả thử nghiệm cho lợn tiếp xúc với ASFV trong thức uống và thức ăn bằng đường miệng để xác định liều gây nhiễm của ASFV trong điều kiện ăn uống tự nhiên*

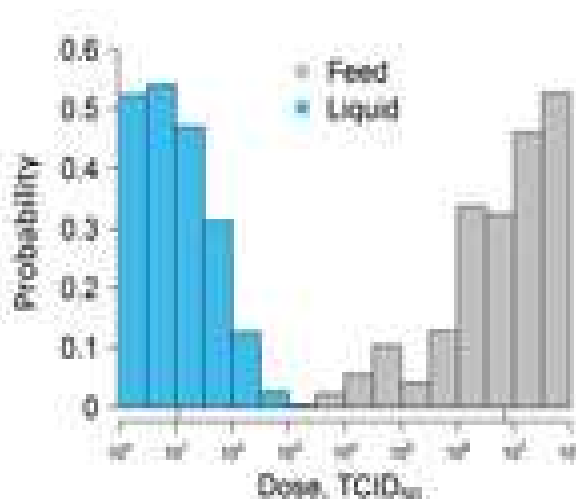
Liều ASFV, TCID ₅₀	Môi trường lỏng			Thức ăn nguồn gốc thực vật		
	Số kiểm tra	Số dương tính	% dương tính	Số kiểm tra	Số dương tính	% dương tính
10 ⁰	8	3	37,5	-	-	-
10 ¹	9	4	44,4	-	-	-
10 ²	8	6	75	-	-	-
10 ³	6	5	83,3	5	0	0
10 ⁴	3	3	100	5	2	40
10 ⁵	-	-	-	9	4	44,4
10 ⁶	-	-	-	8	2	25
10 ⁷	-	-	-	5	2	40
10 ⁸	-	-	-	2	1	50

*ASFV, Virus Dịch tả lợn châu Phi; TCID₅₀ Liều gây nhiễm 50% tế bào nuôi cấy; -, Số lợn được kiểm tra.



Hình 1. Ước tính xác suất lây nhiễm do chất lỏng (đường màu xanh) và thức ăn (đường màu đen) ở liều gây nhiễm virus ASF khác nhau qua đường miệng dựa trên các dữ liệu thử nghiệm xác định liều gây nhiễm của ASFV trong điều kiện ăn uống tự nhiên.

Dữ liệu thể hiện cho 1 lần phơi nhiễm (A), 3 lần phơi nhiễm (B), và 10 lần phơi nhiễm (C). Dải tô màu là thể hiện 95% CIs. Số lượng lợn ở mỗi liều được biểu thị bằng các gạch đánh màu xanh hoặc đen ở sát phía trên trục hoành. Các lần phơi nhiễm được lặp lại có thể quan sát tương tác trực tuyến (<https://trevorhefley.shinyapps.io/asfv>).



Hình 2. Phân phối ID₅₀ của virus Dịch tả lợn châu Phi (ASFV) trong nghiên cứu xác định liều ASFV gây nhiễm khi ăn, uống tự nhiên.

Đối với đồ uống, ID₅₀ là 10^{1.0}, và đối với đồ ăn, ID₅₀ là 10^{6.8} (thể hiện bằng gạch đánh dấu màu xanh lá cây ở trục hoành). ID₅₀, liều gây nhiễm trung bình (liều cần thiết để gây nhiễm virus ASF cho 50% lợn thí nghiệm); TCID₅₀, liều gây nhiễm 50% tế bào nuôi cấy

chứa virus. Với phơi nhiễm đơn, đồ uống có xác suất gây nhiễm cao hơn so với thức ăn, liều lên tới $10^{7.5}$ TCID₅₀ ở 95% CIs (hình 1 - A). Ở liều thử nghiệm cho uống lớn hơn (10^4 TCID₅₀) 100% lợn thí nghiệm bị nhiễm ASFV; không có liều cho ăn nào gây nhiễm virus trên 100% lợn thí nghiệm trong thử nghiệm này.

Khi nhiều lần phơi nhiễm được cân nhắc, xác suất gây nhiễm tăng lên ở tất cả các mức độ liều đối với cả đồ uống và thức ăn (hình 1B và 1C). Với 10 lần phơi nhiễm virus bằng đường uống, xác suất nhiễm trùng tăng lên gần đến 1 ở liều ASFV thấp nhất là TCID₅₀. Với đường cho ăn, khi phơi nhiễm nhiều lần, chúng tôi thấy có sự tăng theo chiều rộng với 95% CI ở những liều thấp hơn, chứng tỏ rằng, với những phơi nhiễm lặp lại, xác suất lây nhiễm tăng không rõ ràng. Kết quả này có thể là do một số ít lợn bị nhiễm ở liều thấp hơn và xác suất lây nhiễm thấp hơn ở lần phơi nhiễm đơn. Sự phân phối các liều có vẻ đáng tin cậy phù hợp với khả năng gây nhiễm cho 50% lợn thí nghiệm được trình bày ở hình 2. ID₅₀ là $10^{1.0}$ (95% CI 10^0 – $10^{2.3}$) đối với thức uống và $10^{6.8}$ (95% CI $10^{4.6}$ – 10^{8+}) với thức ăn.

III. THẢO LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi khẳng định khả năng truyền lây của ASFV qua đường miệng bằng thức ăn và nước uống mà không cần phải tiếp xúc với các sản phẩm thịt lợn bị ô nhiễm và cung cấp dữ liệu định tính về chủng Georgia 2007. Những nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng liều hấp phụ 50% hồng cầu (HAD₅₀) tối thiểu là 10^5 HAD₅₀ của ASFV KWH/12 là cần thiết để gây ra nhiễm trùng đường miệng bằng uống sữa (38). Sau đó, Howey và cs. (35) đã phát hiện tiềm năng truyền nhiễm của 3 liều ASFV Malawi 1983 truyền qua đường tiêu hóa cho các lợn thương phẩm. Mặc dù ở liều thấp, 10^2 HAD₅₀ không gây ra hiện tượng nhiễm trùng (0/2), liều trung bình (10^4 HAD₅₀) và liều cao (10^6 HAD₅₀) là đủ để gây ra hiện tượng nhiễm trùng cho 100% lợn thí nghiệm (4/4) (35). Gần đây, một nghiên cứu đã chứng minh rằng ngay cả ở liều thấp hơn của chủng ASFV mới phân lập có liên quan đến ASFV Georgia 2007 cũng có khả năng gây nhiễm trùng. Đặc biệt,

Pietschmann và cs. (34) đã cho thấy rằng liều nhiễm trùng qua đường hầu họng thấp như 3 và 25 đơn vị hấp phụ hồng cầu của ASFV Armenia 2008, khi được truyền trong 2ml huyền dịch lá lách, cũng gây ra hiện tượng nhiễm virus cho lợn rừng. Khả năng miễn cảm tăng đã được chứng minh ở lợn rừng được mô tả là yếu và trong điều kiện thiếu thốn (34).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi khẳng định khả năng gây nhiễm của ASFV Georgia 2007 thông qua đường uống nước bằng miệng. Cần ghi chú rằng các lợn trong nghiên cứu của chúng tôi đã uống nước chứa virus một cách tự nhiên và đã được chứng minh là hoàn toàn khỏe mạnh. Khả năng gây nhiễm đã thu được trên khoảng 40% lợn đã được phơi nhiễm với nước uống có chứa ASFV ít nhất là 1 TCID₅₀. Liều gây nhiễm ASFV thấp qua đường uống tự nhiên có thể được xem xét như một yếu tố có thể làm lây lan ASFV qua nước uống, phù hợp với các bằng chứng dịch tễ học về mối liên quan giữa sông Danube đến sự lây lan ASFV ở Romania.

ASFV truyền qua chất lỏng theo đường hầu họng hoặc tiêu hóa gây nhiễm trùng do virus tiếp xúc qua mũi-họng, bao gồm cả các hạch hoặc qua đường dạ dày-ruột. Do khả năng tồn tại tốt của ASFV trong khoảng pH rộng (từ 4 đến 10), virus có thể sống sót trong môi trường axit dạ dày, nhưng không hề dễ dàng. Nhiều khả năng là môi trường chất lỏng cung cấp một chất nền lý tưởng cho virus tiếp xúc với các hạch, ở đó các virus được nhân lên sau khi tiếp xúc tự nhiên với ASFV.

Nhiều báo cáo bằng văn bản về thực nghiệm gây nhiễm ASFV qua thức ăn bị nhiễm virus có bao gồm việc tiêu thụ các tế bào của động vật nhiễm virus. Vào năm 1954, đã có báo cáo cho rằng để ASFV truyền lây qua đường miệng bằng cho ăn thức ăn thì cần liều ít nhất là 10^5 . Parker và cs. đã không thành công trong việc gây nhiễm cho lợn bằng huyền dịch mô bào của lợn hoang châu Phi có chứa $10^{3.7}$ – $10^{6.1}$ HAD₅₀ ASFV bằng cách cho ăn thức ăn rắn. Ngược lại, Colgrove và cs. lại thành công trong việc gây nhiễm cho các lợn nuôi bằng cách bổ sung 50g lách và gan cắt nhỏ của một con lợn bị nhiễm virus bằng thức ăn rắn. Mỗi

gram mô bào có chứa $10^{7.0}-10^{7.5}$ HAD₅₀ ASFV chủng Hinde WH II. Nghiên cứu thử nghiệm của chúng tôi sử dụng chủng virus Georgia 2007 cho thấy để gây nhiễm ASFV qua con đường ăn thức ăn nguồn gốc thực vật thì cần liều cao hơn so với đồ ăn lỏng. So với môi trường lỏng, thức ăn cần phải kích hoạt các proteaza tuyến nước bọt làm cho virus bị suy yếu. Hơn nữa, cấu trúc của thức ăn cứng có thể đã hạn chế sự tiếp xúc với các hạch, làm giảm sự tiếp xúc của virus với các tế bào lâm ba và tế bào biểu mô trước khi đi vào dạ dày-ruột.

Trong nghiên cứu này, mặc dù MID trong thức ăn cao hơn so với thức uống, chúng tôi giả thiết rằng thức ăn đã có thể là một mối nguy hại cao hơn so với nguồn nước uống trong hệ thống chăn nuôi lợn hiện đại. Sự vận chuyển thức ăn là hoạt động có tần suất cao, và sản xuất thức ăn có tính tập trung cao; vì thế, thức ăn bị nhiễm virus có thể dễ dàng được phân phối với số lượng lớn qua các trang trại lợn. Tương tự, lợn cũng có thể tiêu thụ một lượng thức ăn lớn hơn (>100 g) và với tần suất cao hơn so với tần suất đã được thử nghiệm trong nghiên cứu này (>1 exposure). Khả năng gây ra hiện tượng nhiễm sau khi ăn thức ăn hoàn chỉnh bị nhiễm ASFV tăng lên đáng kể sau 3 hoặc 10 lần phơi nhiễm (hình 1B và 1C). Bởi vậy, dù là sự nhiễm virus sau khi ăn thức ăn bị nhiễm ASFV có xác suất thấp hơn so với chất lỏng, tần suất phơi nhiễm cao vẫn có thể biến thức ăn trở thành yếu tố nguy cơ quan trọng cho sự truyền lây virus. Thêm vào nguy cơ này, trong thực tế, thức ăn được sản xuất có tính tập trung cao và có thể các nguyên liệu được dùng trong sản xuất lại được cung cấp từ một nguồn cung cấp toàn cầu. Chẳng hạn như, cá thức ăn còn lại trong kho của một trang trại lợn ở giữa tây Hoa Kỳ chỉ ra rằng các nguyên liệu sản xuất thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc từ 12 nước ở Bắc Mỹ, châu Á và châu Âu (S.S. Dritz, 2018).

Tháng 2 năm 2019, ASFV đã lây lan đến cả những trang trại có điều kiện an toàn sinh học cao ở Romania và nó đã được phát hiện ở các đàn lợn khác nhau nuôi ở hơn 25 tỉnh của Trung Quốc, kể cả thủ đô Bắc Kinh, khoảng cách giữa các đàn bị virus tấn công là hàng nghìn km. Làm

thế nào mà ASFV có thể di chuyển qua các vùng rộng lớn trong cường quốc sản xuất thịt lợn trên thế giới này vẫn chưa được biết; tuy nhiên, sự di chuyển của virus qua thức ăn hoặc các nguyên liệu sản xuất thức ăn nên được xem xét. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng, ASFV có thể dễ dàng được truyền lây bằng miệng khi ăn thức ăn hoặc uống nước bị nhiễm virus một cách tự nhiên, cũng cố thêm vai trò tiềm tàng của thức ăn trong việc phát tán virus đến những quần thể lợn mới trên toàn thế giới.

Lời người dịch

Bài dịch này được người dịch dịch từ bài báo có tên tiếng Anh nguyên gốc là: "Infectious Dose of African Swine Fever Virus When Consumed Naturally in Liquid or Feed" của TS. Megan C. Niederwerder và các cộng sự, đã được đăng trên Tạp chí khoa học quốc tế "Emerging Infectious Diseases", tập 25, số 5, tháng 5 năm 2019. TS. Niederwerder là trợ lý giáo sư về virus tại Khoa Chẩn đoán Y học/Sinh lý bệnh của Trường Đại học tiểu bang Kansas, Manhattan, Kansas. Cô quan tâm nghiên cứu các vấn đề về sinh bệnh học, phòng ngừa và kiểm soát các bệnh virus mới nổi ở lợn. Kinh phí để thực hiện nghiên cứu này được cấp bởi National Pork Checkoff và Quỹ Hỗ trợ dự phòng cho Nông nghiệp và Sinh học quốc gia của tiểu bang Kansas. Một phần kinh phí nghiên cứu cũng được tài trợ bởi Tổng cục Khoa học và Công nghệ của US Department of Homeland Security. Người dịch đã cố gắng dịch bài báo từ tiếng Anh sang tiếng Việt đúng với những gì mình hiểu để chia sẻ thông tin đến các bạn đọc có quan tâm. Tác giả chính của bài báo nguyên gốc tiếng Anh có cung cấp thêm một số dữ liệu bổ sung trong phần phụ lục (supplement data). Tuy nhiên, trong giới hạn bài dịch và khả năng chuyên môn sâu, người dịch không thể truyền tải hết đến bạn đọc. Vì vậy, bạn đọc quan tâm muốn tìm hiểu cụ thể hơn, xin mời truy cập đường dẫn sau: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6478231/>.

Người dịch: Ngô Chung Thủy - Viện Thú y.