

PHÁT TRIỂN PHƯƠNG PHÁP LAMP KẾT HỢP SỬ DỤNG CHỈ THỊ MÀU KÉP TRONG CHẨN ĐOÁN PHÁT HIỆN VIRUS GÂY TIÊU CHẢY CẤP Ở LỢN

*Mai Thị Ngân¹, Nguyễn Văn Giáp¹,
Cao Thị Bích Phượng¹, Huỳnh Thị Mỹ Lệ¹, Satoshi Sekiguchi²*

TÓM TẮT

Đánh giá kết quả của các phản ứng LAMP trong chẩn đoán virus gây tiêu chảy cấp ở lợn (PEDV) hiện tại là tốn thời gian và làm tăng nguy cơ tạp nhiễm cho các phản ứng tiến hành sau đó. Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đã phát triển phương pháp LAMP kết hợp sử dụng chỉ thị màu kép cho chẩn đoán phát hiện PEDV. Với việc bổ sung thêm chỉ thị màu kép trong thành phần phản ứng LAMP, kết quả của quá trình khuếch đại này có thể quan sát bằng mắt thường. Bằng việc bổ sung thêm cặp mồi vòng lặp, thời gian của phương pháp LAMP trong chẩn đoán PEDV đã được tối ưu hóa ở 63°C trong 40 phút. Kết quả xét nghiệm từ 91 mẫu thực địa cho thấy đây là một phương pháp nhân gen đẳng nhiệt nhanh, đơn giản, có độ nhạy và độ đặc hiệu cao và kết quả của phản ứng có thể dễ dàng đánh giá bằng mắt thường. Do đó, kết quả nghiên cứu của chúng tôi có tính ứng dụng cao trong công tác chẩn đoán nhanh PEDV cũng như các tác nhân gây bệnh khác.

Từ khóa: Phương pháp LAMP, PEDV, chỉ thị màu kép, RT-PCR.

Development of LAMP method incorporating the use of double color indicator in diagnosing and detecting porcine epidemic diarrhea virus

*Mai Thi Ngan, Nguyen Van Giap,
Cao Thi Bích Phượng, Huynh Thi My Le, Satoshi Sekiguchi*

SUMMARY

Current LAMP assays for detecting PEDV are time-consuming and carry contamination risk for the following reactions. In this study, we developed the LAMP method combining a dual-color indicator for the detection of PEDV. With the addition of a dual-color indicator in the LAMP reaction, the results of this amplification process could be observed by the naked eyes. In addition, by adding loop primer pairs, the LAMP assay for the detection of PEDV was optimized in 40 minutes at 63°C. The result of testing 91 field samples showed that this was a method of simple, sensitive, fast isothermal gene multiplication, and the result of reaction could be easily judged by the naked eyes. Therefore, our research results can be highly applicable in the quick PEDV diagnosis as well as other pathogen detection.

Keywords: LAMP assay, PEDV, dual-color indicator, RT-PCR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh tiêu chảy cấp tính trên lợn (Porcine epidemic diarrhea - PED) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm do một loại virus thuộc họ *Coronaviridae* gây ra, với các triệu chứng lâm sàng đặc trưng là nôn mửa, tiêu chảy

và mất nước. Dịch PED xảy ra ở mọi lứa tuổi, tỷ lệ chết cao ở lợn con dưới 7 ngày tuổi (90-100%). Dịch PED xuất hiện lần đầu tiên ở châu Âu vào năm 1971, sau đó bệnh lây lan ra nhiều quốc gia khác ở châu Á như Trung Quốc, Đài Loan, Nhật, Hàn Quốc và Thái Lan (D. Song và cs., 2015).

Tại Việt Nam, dịch PED lần đầu tiên được phát hiện vào năm 2009 (Tien Duy Do và cs., 2011) và từ đó đến nay dịch bệnh thường xuyên

¹. Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

². Khoa Nông nghiệp, Đại học Miyazaki, Nhật Bản

xảy ra, gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi lợn trong cả nước. Do tính phức tạp của các đợt dịch PED trong thời gian gần đây; việc chẩn đoán nhanh, chính xác sự có mặt của PEDV là công việc hết sức quan trọng trong công tác phòng chống bệnh. Nhiều kỹ thuật đã được sử dụng trong việc phát hiện PEDV như miễn dịch huỳnh quang, phản ứng ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), tuy nhiên các kỹ thuật này tiêu tốn nhiều thời gian, độ nhạy và độ đặc hiệu thấp. Các kit phân tích Immunochromatography cũng được sử dụng phổ biến ở các trại chăn nuôi để phát hiện PEDV với độ nhạy 92% và độ đặc hiệu 98%. Kỹ thuật này cho phép chẩn đoán nhanh, tuy nhiên độ chính xác kém hơn RT-PCR (D. Song và B. Park, 2012). Phương pháp nested-RT-PCR cũng đã được sử dụng để phát hiện PEDV (Nguyen Dinh Quat và cs., 2011). Một số nghiên cứu cũng đã ứng dụng phương pháp RT-PCR để chẩn đoán phát hiện PEDV (Nguyễn Trung Tiến và cs., 2013). Phương pháp RT-PCR có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, tuy nhiên chi phí xét nghiệm cao và sự phụ thuộc vào các thiết bị đắt tiền.

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) là một phương pháp khuếch đại nucleic acid đẳng nhiệt đặc hiệu, đơn giản, nhanh chóng và tiết kiệm (Notomi T. và cs., 2000). Ưu điểm của LAMP là khả năng khuếch đại trực tiếp acid nucleic với khả năng khuếch đại lên đến 10^8 - 10^9 lần trong vòng một giờ ở điều kiện đẳng nhiệt nên quá trình khuếch đại có thể được thực hiện bằng cách sử dụng tủ ấm hay bể ủ nhiệt, khắc phục sự phụ thuộc vào thiết bị đắt tiền. Vì LAMP sử dụng 4 hoặc 6 mồi khác nhau được thiết kế đặc biệt nhận ra 6 đến 8 đoạn riêng biệt trên gen đích nên tính đặc hiệu là rất cao. Đặc biệt khi kết hợp với enzyme sao chép ngược, phương pháp này cũng có thể khuếch đại chuỗi RNA với hiệu quả cao. Trong những năm gần đây, LAMP đã được ứng dụng trong chẩn đoán nhiều bệnh truyền nhiễm tuy nhiên vẫn còn rất ít nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật này trong chẩn đoán dịch bệnh ở gia súc, gia cầm tại Việt Nam. Gần đây, kỹ thuật

LAMP sử dụng 4 mồi đã được phát triển và ứng dụng trong chẩn đoán nhanh một số bệnh như dịch tả lợn, PRRS,... (Phạm Minh Hằng và cs., 2020). Kỹ thuật LAMP với 6 mồi, bao gồm một cặp mồi vòng lặp sẽ làm tăng tốc độ phản ứng lên nhiều lần (K. Nagamine và cs., 2002). Hơn nữa, việc phân tích sản phẩm LAMP bằng điện di trên thạch cũng tốn thời gian đồng thời làm tăng nguy cơ tạp nhiễm cho các phản ứng tiếp hành sau. Do đó trong nghiên cứu này chúng tôi phát triển phương pháp LAMP đơn giản, sử dụng 6 mồi trong chẩn đoán phát hiện PEDV bằng mắt thường với việc bổ sung thêm chỉ thị màu kép trong thành phần phản ứng LAMP. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi sẽ góp phần hỗ trợ cho công tác chẩn đoán nhanh, giúp cho công tác phòng chống PED cũng như các bệnh truyền nhiễm khác có hiệu quả hơn.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Mẫu bệnh phẩm là các mẫu phân của lợn nghi nhiễm bệnh tiêu chảy cấp PED được thu thập tại các trại chăn nuôi lợn thuộc 4 tỉnh/thành gồm Hà Nội, Hà Nam, Vĩnh Phúc và Thái Nguyên. Mẫu bệnh phẩm được vận chuyển về phòng thí nghiệm ở điều kiện 4 - 8°C và được bảo quản trong các ống vô trùng ở nhiệt độ -20°C.

PEDV chủng Q3/Q5 phân lập tại thực địa và đã được nuôi cấy thích nghi trên môi trường tế bào Vero được sử dụng để xác định độ nhạy của phương pháp RT-LAMP. Huyền dịch sau gây nhiễm được pha loãng 10 lần liên tiếp. Sau đó RNA tổng số được chiết xuất từ 250 µl huyền dịch sau gây nhiễm ở các nồng độ pha loãng bằng bộ kit chiết RNA (ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System, Promega, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. RNA tổng số được sử dụng làm khuôn mẫu cho cả RT-LAMP và RT-PCR.

2.2. Phương pháp tách chiết RNA

Các mẫu phân được pha loãng với tỷ lệ 10% bằng dung dịch PBS và được ly tâm với tốc độ 2300xg ở 4°C trong vòng 10 phút. 250 µl

dịch nổi được sử dụng cho chiết tách RNA tổng số bằng kit chiết tách ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. RNA tổng số được sử dụng làm khuôn mẫu để phát hiện PEDV bằng kỹ thuật RT-PCR và RT-LAMP.

2.3. Phản ứng RT-PCR

Phản ứng RT-PCR được thực hiện với thể tích phản ứng là 20 µl bằng bộ kit RT-PCR i-TGEV/PEDV (Lucerna Chem AG, Switzerland) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các thông số RT-PCR bao gồm bước sao chép ngược 45°C trong 30 phút và bước ủ 94°C trong 5 phút; 40 chu kỳ ở 94°C trong 20 giây, 55°C trong 30 giây và 72°C trong 50 giây, tiếp theo là phần mở rộng cuối cùng

ở 72°C trong 5 phút. Các sản phẩm RT-PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,5% với ethidium bromide. Kích thước sản phẩm là 525bp.

2.4. Phản ứng RT-LAMP

2.4.1. Môi

6 môi dùng trong phản ứng RT-LAMP được thiết kế từ gen có tính ổn định cao - gen M của PEDV chủng CV777 (GenBank mã số: KT323979) bằng phần mềm Primer Explorer 4, bao gồm một cặp bên ngoài (F3, B3), cặp môi bên trong (FIP, BIP) và một cặp vòng lặp (loopF, loopB) (TN. Mai và cs., 2018). Trình tự nucleotide hiển thị vùng gen đích của LAMP được thể hiện trong hình 1.

```

1: ATGTCTAACGGTTTTATTCCCGTTGATGAGGTGATTGAACACCTTAGAACTGGAATTTCT
61: ACATGGAATATCATACTGACGATACTACTTGTAGTGCTTCAGTATGGCCATTACAAGTAC
121: TCTGTGTTCTTGTATGGTGTCAAGATGGCTATTCTATGGATACTTTGGCCTCTTGTGTTG
181: GCACTGTCACTTTTTTGTATGCATGGGCTAGCTTCCAGGTCAACTGGGTCTTTTTTCGCTTTC
      PED-F3
241: AGCATCCTTATGGCTTGCATCACTCTTATGCTGTGGATAATGTATTTGTCAATAGCATT
      PED-F2                                PED-LF
301: CGGTTGTGGCGCAGGACACATTCTTGGTGGTCTTTCATCCTGAAACTGACGCGCTTCTCTC
      PED-F1c                                PED-B1c
361: ACTACTTCTGTGATGGGCGGACAGGTCTGCATTCCAGTGCTTGGAGCACTCACTGGGTGTA
      PED-LB                                PED-B2
421: ACGCTAACACTCCTTAGTGGTACATTGTTTGTAGAGGGCTATAAGGTTGCTACTGGCGTA
      PED-B3
481: CAGGTAAGTCAATTGCCTGATTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAACAATTGTCTAT
541: GGACGTGTTGGTCGTTTCAGTCAATGCTTCATCTGGCACTGGTTGGGCTTTCTATGTCCGG
601: TCAAAACACGGCGACTACTCAGCTGTGAGTAATCCGAGTGCGGTTCTCACAGATAGTGAG
661: AAAGTGCTTCATTTAGTCTAA

```

Hình 1. Trình tự từng phần gen M của PEDV chủng CV777 (GenBank mã số: KT323979) hiển thị vùng gen đích của LAMP. Vị trí các đoạn môi được đánh dấu bằng nền màu vàng

2.4.2. Chỉ thị màu kép

Chỉ thị màu kép là sự kết hợp giữa chỉ thị màu kim loại hydroxynaphthol blue metal (HNB) và chỉ thị màu huỳnh quang GelGreen. Chỉ thị màu kép bao gồm 3 mM HNB (Wako Pure Chemicals, Missouri, USA) và 0,35% v/v GelGreen (10.000 × Sol, Biotium, Fremont,

CA) đã được hòa tan và đồng nhất trong nước cất như trong nghiên cứu của K. Hayashida và cs. (2015).

2.4.3. Phản ứng RT-LAMP

Phản ứng RT-LAMP được thực hiện với thể tích phản ứng là 25µl bao gồm 2 µl RNA mẫu; các môi bên trong (1,6 µM mỗi loại); cặp mỗi

vòng lặp (0,8 μM mỗi loại); cặp mồi ngoài (mỗi loại 0,2 μM); 1,6 mM dNTPs; 5M betaine; 20 mM Tris-HCl (pH=8,8); 10 mM KCl; 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 4 mM MgSO_4 ; 8U enzyme Bst DNA polymerase (New England Biolabs, Massachusetts, USA); 0,15U enzyme sao chép ngược AMV Reverse Transcriptase (Invitrogen, California, USA). Bổ sung thêm 1 μl chỉ thị màu kép vào thành phần phản ứng trước khi tiến hành để giúp cho quá trình đọc kết quả bằng mắt thường. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở điều kiện 63°C trong 40 phút sau đó tăng lên 80°C trong 5

phút để dừng phản ứng (TN. Mai và cs., 2018).

2.5. Phương pháp xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp RT-LAMP

Để đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng RT-LAMP trong chẩn đoán PEDV từ các mẫu thực địa, phương pháp RT-PCR đã được sử dụng làm phương pháp tiêu chuẩn. Tổng số 91 mẫu phân đã được kiểm tra đồng thời bằng cả hai phương pháp RT-PCR và RT-LAMP. Trên cơ sở đó, độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp RT-LAMP sẽ được đánh giá như sau:

Phương pháp RT-PCR			
Phương pháp RT-LAMP	Dương tính	Dương tính	
	Âm tính	a	b
		c	d
Độ nhạy (Se) = $a/(a+c)$		Độ đặc hiệu (Sp) = $d/(b+d)$	

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

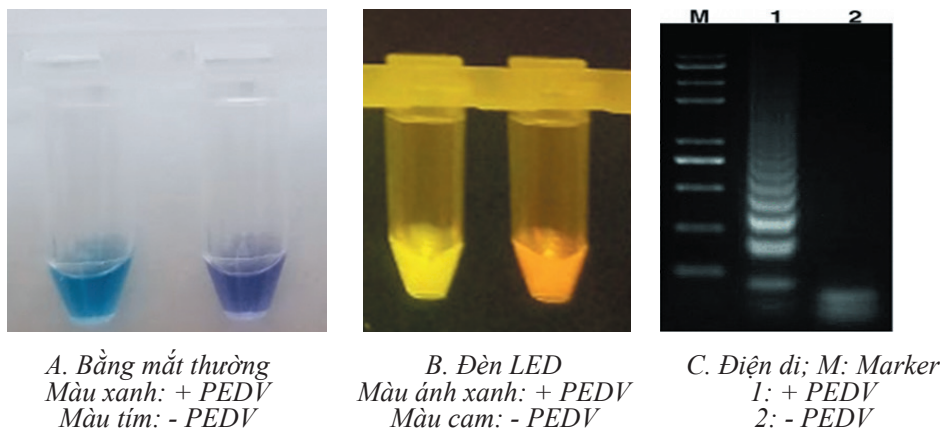
3.1. Đọc kết quả phản ứng RT-LAMP với chỉ thị màu kép

Sử dụng chỉ thị màu kép bao gồm GelGreen và HNB bổ sung vào thành phần phản ứng RT-LAMP, kết quả có thể đọc theo hai cách.

Bằng sự thay đổi màu của chỉ thị màu kim loại HNB, dung dịch chuyển màu xanh lam là phản ứng

dương tính, phản ứng âm tính là vẫn giữ nguyên màu tím của HNB. Sự thay đổi màu trong phản ứng RT-LAMP xảy ra bởi nồng độ ion Mg^{2+} giảm do trong quá trình khuếch đại sản phẩm tạo thành là magiê pyrophosphate không hòa tan (hình 2A).

Bằng đèn LED với ánh sáng ở bước sóng 470nm, ống phát sáng màu xanh lục là kết quả dương tính, trong khi ống không có DNA PEDV khuếch đại phát sáng màu đỏ cam (hình 2B).



Hình 2. Các phương pháp đọc kết quả phản ứng RT-LAMP

Trong cả hai cách phát hiện, việc thay đổi màu sắc đều có thể nhìn thấy rõ bằng mắt thường.

Việc chẩn đoán phát hiện PEDV bằng phản ứng RT-LAMP đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây (Gou H. và cs., 2015; Ren X. và Li P., 2011; TN. Mai và cs., 2018). Trong các nghiên cứu này, việc đọc kết quả phản ứng thông qua phương pháp điện di trên trên thạch; đọc bằng mắt thường dựa vào sự hình thành kết tủa trắng muối magie pyrophosphate trong quá trình khuếch đại hoặc sự thay đổi màu sắc bằng cách bổ sung thêm thuốc nhuộm ADN (Pico Green) vào thành phần phản ứng sau khi kết thúc quá trình khuếch đại; hoặc các thiết bị đo huỳnh quang. Phương pháp điện di trên thạch tuy không tốn kém nhưng mất thêm thời gian cho điện di và cần phải có hệ thống máy điện di. Việc phát hiện độ đục bằng mắt thường là phương pháp đơn giản và tiết kiệm chi phí nhất để đọc kết quả phản ứng RT-LAMP, tuy nhiên phương pháp này yêu cầu kỹ năng chuyên nghiệp để đánh giá kết quả. Việc bổ sung thuốc nhuộm ADN sau khi phản ứng kết thúc sẽ dẫn đến tăng nguy cơ tạp nhiễm cho các phản ứng LAMP tiếp theo vì thao tác mở ống nghiệm để thêm thuốc nhuộm. Thuận lợi của thiết bị đo cường độ huỳnh quang là nhanh chóng và định lượng, tuy nhiên lại đòi hỏi các thiết bị đắt tiền như máy đo quang phổ. Những vấn đề nêu trên đã hạn chế rất nhiều việc áp dụng rộng rãi kỹ thuật LAMP trong công tác chẩn đoán xét nghiệm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng chỉ thị kép bao gồm HNB và thuốc nhuộm ADN đã được sử dụng trong chẩn đoán phát hiện bệnh sán lá gan châu Phi ở người (K. Hayashida và cs., 2015). HNB có thể làm giảm tín hiệu nền khi GelGreen được sử dụng dưới ánh sáng phát xạ màu xanh lam. Ở ống âm tính, HNB loại bỏ hoàn toàn huỳnh quang nền từ GelGreen. Do vậy, việc sử dụng chỉ thị kép giúp cho sự khác biệt về màu sắc giữa mẫu dương tính và mẫu âm tính là rõ ràng. Bổ sung HNB vào thành phần phản ứng trước khi khuếch đại và đã được chứng minh là không ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình khuếch đại (Cardoso T.C. và cs., 2010). Đèn LED với ánh sáng ở bước sóng 470nm là một thiết bị đơn giản và kinh tế, có thể tự chế, dễ dàng áp dụng trong các phòng thí nghiệm nhỏ mà ít được

trang bị. Hơn nữa, GelGreen là một thuốc nhuộm ADN có tính an toàn cao, đồng thời đèn LED phát ra ánh sáng xanh lục là an toàn cho mắt người sử dụng hơn so với việc sử dụng đèn UV. Phương pháp này có những ưu điểm vượt trội so với các phương pháp đọc kết quả hiện có cho phản ứng LAMP.

3.2. Giới hạn phát hiện của phương pháp RT-LAMP

Để đánh giá độ nhạy của phương pháp RT-LAMP, giới hạn phát hiện được so sánh với phương pháp RT-PCR bằng cách khuếch đại acid nucleic của các nồng độ pha loãng 10 lần liên tiếp huyền dịch nuôi cấy tế bào sau gây nhiễm của chủng PEDV thực địa Q3/Q5. Giới hạn phát hiện của phương pháp RT-PCR là ở độ pha loãng 10^{-3} , trong khi đó giới hạn phát hiện của phương pháp RT-LAMP là ở độ pha loãng 10^{-5} (bảng 1). Như vậy, độ nhạy của phương pháp RT-LAMP cao hơn 100 lần so với phương pháp RT-PCR. Hơn nữa, cường độ thay đổi màu sắc ở các nồng độ pha loãng khác nhau là như nhau. Kết quả của chúng tôi cho thấy, phương pháp RT-LAMP với chỉ thị kép là rất nhạy cho chẩn đoán phát hiện PEDV bằng mắt thường. Nghiên cứu của Ren và cs. (2011) cũng đã chỉ ra rằng giới hạn phát hiện của RT-PCR là $4,8 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ trong khi đó giới hạn phát hiện của RT-LAMP là $4,8 \times 10^{-6} \mu\text{g/ml}$ trong chẩn đoán phát hiện PEDV. Trong nghiên cứu này, để tăng tốc độ phản ứng RT-LAMP, một cặp môi vòng lặp đã được bổ sung (LF và LB) vào thành phần phản ứng. Vị trí của mỗi vòng lặp là vùng giữa F2 và F1 (hoặc B1 và B2) theo hướng F1 đến F2 (hoặc B1 đến B2). Hơn nữa, sự thay đổi màu sắc ở các nồng độ pha loãng xảy ra khi các phản ứng được thực hiện trong vòng 40 phút. Do đó, điều kiện phản ứng tối ưu của phương pháp RT-LAMP trong chẩn đoán PEDV với việc bổ sung thêm cặp môi vòng lặp là ở 63°C trong 40 phút. Việc bổ sung cặp môi vòng lặp đã làm tăng số lượng điểm khởi đầu cho tổng hợp DNA trong phương pháp RT-LAMP. Với phương pháp LAMP không có vòng lặp, 4 trong 6 vòng được tạo ra sẽ không được sử dụng. Nhưng thông qua việc sử dụng cặp môi vòng lặp, tất cả các vòng lặp đều có thể được sử dụng làm điểm khởi đầu cho quá trình tổng hợp DNA (K. Nagamine và cs., 2002).

Bảng 1. So sánh giới hạn phát hiện của phương pháp RT-LAMP và RT-PCR trong chẩn đoán phát hiện PEDV

Huỷn dịch sau gây nhiễm PEDV chủng Q3/Q5	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
RT-PCR	+	+	+	-	-	-	
RT-LAMP	+	+	+	+	+	-	-

Ghi chú: +: Dương tính, -: Âm tính

3.3. Độ nhạy, độ đặc hiệu của phản ứng RT-LAMP

Tổng cộng 91 mẫu phân đã được thu thập từ 4 tỉnh được sử dụng để đánh giá độ nhạy và độ đặc

hiệu của phương pháp RT-LAMP trong chẩn đoán phát hiện so với phương pháp chuẩn RT-PCR. Kết quả cho thấy tất cả 24/91 mẫu dương tính với RT-PCR đều cho kết quả dương tính với RT-LAMP (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp RT-LAMP

Địa điểm	Số mẫu kiểm tra	RT-PCR		RT-LAMP	
		Số mẫu dương tính	Số mẫu âm tính	Số mẫu dương tính	Số mẫu âm tính
Hà Nam	22	8	14	10	12
Hà Nội	30	5	25	6	24
Vĩnh Phúc	29	8	21	8	21
Thái Nguyên	10	3	7	3	7
Tổng	91	24	67	27	64

Do đó, độ nhạy của phương pháp RT-LAMP là cao (100%). Ngoài ra, trong 67 mẫu âm tính bằng phương pháp RT-PCR, còn phát hiện thêm 3 mẫu dương tính với PEDV bằng phản ứng RT-LAMP. Như vậy, độ đặc hiệu của phương pháp RT-LAMP có sử dụng chỉ thị màu kép cho chẩn đoán phát hiện bằng mắt thường là 95,52%.

Tuy nhiên trên thực tế, kết quả nghiên cứu của chúng tôi không có kết quả âm tính hoặc dương tính giả. Vì trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng kit multi RT-PCR iPEDV/TGEV dùng để phát hiện hai loại kháng nguyên PEDV và TGEV cùng thuộc nhóm *Coronavirus* nhóm I mà có liên quan chặt chẽ với nhau. Tuy nhiên trong tất cả các mẫu nghiên cứu, không có mẫu nào cho kết quả dương tính với TGEV. Bên cạnh đó, RT-LAMP đã được chỉ ra là có tính đặc hiệu rất cao do dùng 6

mỗi để nhận biết 8 đoạn gen khác nhau trên gen đích. Đồng thời, trong các nghiên cứu trước đây cho chẩn đoán phát hiện PEDV bằng RT-LAMP, các kết quả nghiên cứu đều chỉ ra rằng RT-LAMP là rất đặc hiệu và có độ nhạy cao hơn nhiều lần so với RT-PCR, dù bằng nhiều phương pháp đọc kết quả khác nhau (Gou H. và cs., 2015; Ren X. và Li P., 2011). Nghiên cứu của TN. Mai và cs. (2018) cũng đã chỉ ra rằng độ nhạy và độ đặc hiệu của RT-LAMP trong chẩn đoán phát hiện PEDV đều là 100%, và nhạy hơn RT-PCR 100 lần. Vì vậy, trong nghiên cứu này, việc phát hiện thêm 3 mẫu dương tính bằng phản ứng RT-LAMP từ các mẫu âm tính với RT-PCR chỉ có thể được lý giải là do RT-LAMP nhạy hơn và số lượng virus trong các mẫu này là thấp nên đã cho kết quả âm tính với phản ứng RT-PCR.

IV. KẾT LUẬN

Việc sử dụng thêm cặp mồi vòng lặp đã làm tăng tốc độ phản ứng RT-LAMP. Đồng thời với việc bổ sung thêm chỉ thị màu kép vào thành phần phản ứng RT-LAMP trước khi khuếch đại là một giải pháp ổn định và hiệu quả về chi phí, có những ưu điểm vượt trội hơn so với các phương pháp đọc kết quả đơn giản hiện có bởi vì các thao tác mở ống nghiệm sau khi quá trình khuếch đại là không cần thiết. Đây là một phương pháp nhân gen đẳng nhiệt nhanh, nhạy và đơn giản; kết quả của phản ứng có thể dễ dàng đánh giá bằng mắt thường. Do đó, kết quả nghiên cứu của chúng tôi có tính ứng dụng cao trong công tác chẩn đoán nhanh PEDV cũng như các tác nhân gây bệnh khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Trung Tiến, Vũ Thị Thu Hằng, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Nguyễn Bá Hiên và Lê Văn Phan, 2015. Một số đặc điểm sinh học phân tử của virus gây ra dịch tiêu chảy cấp ở lợn (Porcine epidemic diarrhea – PED) tại Quảng Trị, Thái Nguyên và Thái Bình từ năm 2013-2014. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* Tập 13, Số 7.
2. Cardoso T.C., Ferrari H.F., Bregano L. C., Silva-Frade C., Rosa A.C. and Andrade A.L., 2010. Visual detection of turkey coronavirus RNA in tissues and feces by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) with hydroxynaphthol blue dye. *Mol Cell Probes*, 24(6):415-417.
3. Do, Tien Duy, Tat Toan. Nguyen, Puranaveja. Suphasawatt and Thanawongnuwech. Roongroje. 2011. Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates from Southern Vietnam during 2009–2010 outbreaks. *Thai J Vet Med*, 41(1):55-64.
4. Gou H., Deng J., Wang J., Pei J., Liu W., Zhao M. and Chen J., 2015. Rapid and sensitive detection of porcine epidemic diarrhea virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a vertical flow visualization strip. *Mol Cell Probes*, 29(1):48-53.
5. Hayashida, K., K. Kajino, L. Hachaambwa, B. Namangala and C. Sugimoto, 2015. Direct blood dry LAMP: a rapid, stable, and easy diagnostic tool for Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(3):e0003578.
6. Nguyen Dinh Quat, Pham Hoang Diep, Dang Thi Thanh Nguyen, Trinh Thi Thanh Huyen, Nguyen Thi Thu Nam, Nguyen Thi Phuoc Ninh, Tran Thi Dan and Nguyen Tat Toan, 2011. First detection of porcine epidemic diarrhea virus by nested reverse transcription-polymerase chain reaction (rRT-PCR) technique in Vietnam. Pattaya, Thailand.
7. Ren X. and Li P., 2011. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Genes*, 42(2):229-235.
8. Song, D., H. Moon and B. Kang., 2015. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin. Exp. Vaccine. Res.*, 4(2):166-176.
9. Song, D. and B. Park., 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*, 44(2):167-175.
10. Mai, TN., Nguyen VD, Yamazaki W, Okabayashi T, Mitoma S, Notsu K, Sakai Y, Yamaguchi R, Norimine J and Sekiguchi S., 2018. Development of pooled testing system for porcine epidemic diarrhoea using real-time fluorescent reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC Vet Res*, 14(1):172.
11. Nagamine, K., T. Hase and T. Notomi., 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 16(3):223-229.
12. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N. and Hase T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28(12):e63-e63.
13. Phạm Minh Hằng, Phan Thanh Hương, Phạm Thị Thu Thủy và Nguyễn Viết Không, 2020. Phát triển và đánh giá kỹ thuật LAMP trong phát hiện virus PRRS, CSF, PED và PCV2. *Tạp chí khoa học kỹ thuật Thú y*, Tập XXVII, số 1.

Ngày nhận 30-7-2020

Ngày phản biện 3-10-2020

Ngày đăng 1-1-2021