

Phát triển phương pháp multiplex RT-LAMP phát hiện nhanh vi-rút gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV)

Trần Hồng Diễm, Trần Thị Hậu, Phạm Nguyễn Minh Trang, Phùng Thị Thu Hương

Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành
thdiem@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn là một trong những bệnh phức tạp và nguy hiểm nhất, với tỉ lệ tử vong cao cho cả đàn lợn. Cho đến nay, việc chẩn đoán bệnh vẫn dựa chủ yếu vào các dấu hiệu lâm sàng khi lợn phát bệnh và các phương pháp dùng kháng thể, chẩn đoán phân tử RT-PCR thường đòi hỏi nhiều thời gian và kỹ thuật phức tạp cho xét nghiệm bệnh. Trong khi đó, phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt RT-LAMP thừa hưởng tất cả ưu điểm của PCR về độ nhạy, độ đặc hiệu nhưng kỹ thuật đơn giản và thời gian thực hiện nhanh chóng. Vì thế, mục tiêu chính của nghiên cứu này là xây dựng quy trình phát hiện nhanh vi rút gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV) bằng multiplex RT-LAMP. Quy trình multiplex RT-LAMP được tối ưu trong nghiên cứu có khả năng phát hiện trình tự mục tiêu PRRSV với giới hạn phát hiện $10^{0.5}$ TCID₅₀/mL, phản ứng được thực hiện tại một nhiệt độ cố định (65 °C) trong thời gian 25 phút, có thể đọc kết quả nhanh bằng mắt thường thông qua màu sắc của phản ứng.

Nhận 15/03/2023
Được duyệt 15/07/2023
Công bố 12/09/2023

Từ khóa
PRRS, PRRSV,
RT-LAMP, màu sắc,
multiplex

© 2023 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Mở đầu

Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS) là một bệnh phổ biến gây ra bởi PRRSV, một loại thuộc nhóm Arteriviruses, đây là vi rút có vật chất di truyền là RNA sợi dương, có màng bao bọc [1]. PRRS được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1987 tại Mỹ, cho đến nay đã lan rộng trên toàn thế giới và gây ra thiệt hại kinh tế nặng nề hàng năm cho ngành nông nghiệp chăn nuôi [2]. Gần đây, các đợt bùng phát dịch PRRS với quy mô lớn lan rộng trên nhiều tỉnh thành tại Việt Nam cũng đã gây ra nhiều tổn thất nghiêm trọng [3]. Điều kiện tiên quyết để kiểm soát bệnh chính là phải xác định nhanh chóng và chính xác vi rút PRRSV – tác nhân gây bệnh [3]. Việc phát hiện vi rút bằng phương pháp phân lập PRRSV là rất khó, do tế bào được phân lập thường phải là đại thực bào phế nang lợn và cần được thu nhận từ lợn (6-8) tuần tuổi. Phương pháp này yêu cầu phòng thí nghiệm chuyên dụng, kỹ thuật phức tạp và tốn nhiều thời gian [4]. Cho đến nay, phương pháp RT-PCR hay real-time RT-PCR vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng

trong chẩn đoán phát hiện PRRSV. Tuy nhiên, các xét nghiệm dựa trên phương pháp PCR này thường yêu cầu thiết bị chuyên biệt để xác định kết quả phản ứng, điều đó làm các phương pháp này chỉ có thể thực hiện trong môi trường phòng thí nghiệm và không thể áp dụng cho việc chẩn đoán nhanh tại hiện trường, ngay khu vực chuồng trại [5-7]. Do đó, việc phát triển một phương pháp đơn giản, nhanh chóng đồng thời tiết kiệm chi phí nhưng vẫn đảm bảo độ đặc hiệu và độ nhạy mong muốn để phát hiện PRRSV trong các mẫu thực địa là việc cần thiết. Kể từ khi được phát triển bởi Notomi và cộng sự vào năm 2000, phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt trung gian vòng lặp (LAMP) đã được sử dụng và phát triển rộng rãi để phát hiện vi khuẩn, vi rút gây bệnh khác nhau trên người và động vật [8]. Ưu điểm chính của LAMP là quá trình thực hiện đơn giản, phản ứng xảy ra tại một nhiệt độ duy nhất nhưng vẫn có độ nhạy và độ đặc hiệu cao [8]. Theo đó, phản ứng LAMP được phát triển dựa trên khả năng thay thế mạch và tổng hợp mạch mới của enzyme *Bst* polymerase trong điều kiện đẳng nhiệt ở nhiệt độ từ 60 °C đến 65 °C, vì thế phản

ứng chỉ cần một thiết bị gia nhiệt đơn giản mà không cần thiết bị chuyên biệt trong phòng thí nghiệm [9]. Cùng với đó, LAMP có tính đặc hiệu cao vì trình tự mục tiêu được nhận dạng và khuếch đại bởi 6 trình tự mỗi của phương pháp. Đồng thời, kết quả LAMP có thể quan sát trực tiếp bằng chất nhuộm huỳnh quang (SYBR I) hay bằng màu sắc của phản ứng dưới sự hiện diện của chất chỉ thị ion (hydroxy naphthol blue) hay chất chỉ thị pH [8]. Thực tế cho thấy, phương pháp LAMP với trình tự mục tiêu RNA (RT-LAMP) đã được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán lâm sàng để phát hiện sự hiện diện của một số mầm bệnh vi rút quan trọng, bao gồm PEDV [10], TGEV [11], vi rút sốt lợn cổ điển (CSFV) [12] và phân nhóm H10N8 của vi rút cúm A [13]. Thực tế cho thấy, đã có nhiều nghiên cứu thực hiện và thành công trong việc phát hiện PRRSV một cách nhanh chóng và chính xác. Nghiên cứu này phát triển một quy trình RT-LAMP có khả năng phát hiện chủng PRRSV (NA) phổ biến tại Việt Nam, phản ứng được thực hiện với quy trình đơn giản, ủ tại nhiệt độ duy nhất trong máy ủ nhiệt khô và kết quả phản ứng có thể quan sát trực tiếp bằng mắt thường thông qua màu

sắc phản ứng, theo đó màu hồng ban đầu của phản ứng sẽ chuyển sang màu cam vàng của phản ứng dương và giữ nguyên màu sắc với phản ứng âm, ngoài ra kết quả của phản ứng được xác nhận thông qua chất nhuộm huỳnh quang SYBR I. Việc tối ưu về quy trình thực hiện với kỹ thuật cơ bản, thiết bị đơn giản, nhỏ gọn, chi phí phù hợp, dễ dàng mang đến hiện trường làm cho quy trình RT-LAMP được sử dụng trong nghiên cứu này là có khả năng ứng dụng cao khi phát triển các kit dựa vào các phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt để chẩn đoán nhanh vi rút PRRS, tại khu vực chuồng trại.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Các chủng vi sinh vật được sử dụng trong nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng các chủng vi sinh vật trong Bảng 1 được thu nhận từ mẫu lợn nhiễm bệnh (mẫu máu, mẫu mô, mẫu huyết thanh), sau đó được phân lập và nuôi cấy bởi Học viện Nông nghiệp Việt Nam và phân lập từ Phòng thí nghiệm Vi sinh, Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT.

Bảng 1 Các chủng và nguồn gốc vi sinh vật được sử dụng trong nghiên cứu

Tên vi sinh vật	Dạng mẫu	Nguồn gốc	Số lượng
<i>Samonella enterica</i>	Khuẩn lạc	Phân lập	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	Khuẩn lạc	Phân lập	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Khuẩn lạc	Phân lập	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	Khuẩn lạc	Phân lập	1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Khuẩn lạc	Phân lập	1
PRRSV	Huyết thanh	Học viện Nông nghiệp Việt Nam	10
Vi rút tả lợn châu Phi (ASFV)	RNA	Học viện Nông nghiệp Việt Nam	1
Vi rút tả lợn cổ điển (CSFV)	RNA	Học viện Nông nghiệp Việt Nam	1
Vi rút tiêu chảy cấp ở lợn (PEDV)	RNA	Học viện Nông nghiệp Việt Nam	1
Vi rút viêm dạ dày truyền nhiễm trên lợn (TGEV)	RNA	Học viện Nông nghiệp Việt Nam	1

2.2 Thiết kế môi đặc trưng cho phản ứng multiplex RT-LAMP

Trình tự bảo tồn phân tích từ gen *M* và gen *nsp* của PRRSV được sử dụng để thiết kế môi đặc trưng cho phản ứng multiplex RT-LAMP. Bộ môi được thiết kế dựa trên phần mềm PrimerExplorerV5 [14] theo các thông số tối ưu cho LAMP. Theo đó, bộ môi bao gồm 4 môi khuếch đại cho mỗi gen có trình tự được thể hiện tại Bảng 2, được tổng hợp bởi Công ty Phù Sa Genomics (Việt Nam) được sử dụng cho toàn bộ nghiên cứu.

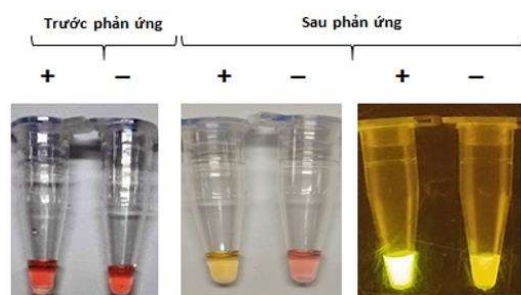
Bảng 2 Các trình tự môi sử dụng trong nghiên cứu

Tên	Trình tự 5'-3'
PRRS_LAMP_F3_nsp	AACCAGTCCAGAGGCAAGG
PRRS_LAMP_B3_nsp	GCAAACATAACTCCACAGTGTA
PRRS_LAMP_FIP_nsp	AGTGATGCCTGACGTCATCT-AGAAAAACCCGGAGAAGCC

PRRS_LAMP_BIP_nsp	ACCCCTAGTGAGCGGCAAT-CTGACAGGGCACAAGTTCC
PRRS_LAMP_F3_M	CCTCCAGATGCCGTTTGTG
PRRS_LAMP_B3_M	AGCTTTTCTGCCACCCAAC
PRRS_LAMP_FIP_M	ATGAAAGCCCGCGGCACTTT-CTAGGCCGCAAGTACATCC
PRRS_LAMP_BIP_M	TAACCACGCATTTGTCGTCCGG-ACGAGGCTTTTCAACCCG

2.3 Phản ứng multiplex RT-LAMP

Phản ứng multiplex RT-LAMP được thực hiện bằng kit LAMP thương mại theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Theo đó, mỗi phản ứng có thể tích 15 μ L bao gồm 1,6 μ M mỗi môi FIP/BIP, 0,8 μ M mỗi môi F3/B3, 7,5 μ L WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (NEB, UK), 5 μ L mạch khuôn cần phân tích và nước sinh học phân tử. Phản ứng được ủ tại nhiệt độ (58-65) °C trong thời gian (30-60) phút. Kết quả được quan sát trực tiếp bằng mắt thường qua thuốc sự thay đổi màu sắc của phản ứng và SYBR I soi dưới ánh sáng bước sóng 460 nm (Hình 1).



Hình 1 Phương pháp ghi nhận kết quả LAMP

2.4 Khảo sát nhiệt độ và thời gian tối ưu cho phản ứng multiplex RT-LAMP

Nhiệt độ tối ưu cho phản ứng multiplex RT-LAMP được khảo sát trong khoảng (58-65) °C mỗi mốc nhiệt độ cách nhau 1 °C. Khoảng nhiệt độ (58-65) °C được lựa chọn khảo sát trong nghiên cứu này được dựa theo các nghiên cứu trước đó và theo hướng dẫn của nhà sản xuất về nhiệt độ tối ưu của enzyme *Bst* dùng trong phản ứng. Trong đó, phản ứng sử dụng RNA bộ gen có nồng độ 10^4 TCID₅₀/mL trong thời gian 60 phút, các phản ứng được ủ tại các nhiệt độ khác nhau, kết quả được quan sát bằng màu sắc phản ứng và chất nhuộm huỳnh quang SYBR I.

Nhiệt độ tối ưu sau đó sẽ được dùng làm nhiệt độ ủ cho khảo sát thời gian tối ưu của phản ứng. Thời gian phản ứng được khảo sát trong (15-45) phút phản ứng, kết quả cũng được quan sát bằng màu sắc và SYBR I.

2.5 Phương pháp khảo sát giới hạn phát hiện và tính đặc hiệu của phản ứng

Giới hạn phát hiện của phản ứng được xác định bằng mẫu RNA được tách chiết từ mẫu vi rút nuôi cấy có nồng độ $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL được pha loãng theo bậc 10 về các nồng độ ($10^{4.5}$ - $10^{-4.5}$) TCID₅₀/mL và thực hiện phản ứng multiplex RT-LAMP với các điều kiện được tối ưu trước đó. Tính đặc hiệu của multiplex RT-LAMP được kiểm tra bằng thực hiện phản ứng LAMP đã tối ưu với các mẫu RNA/DNA tách chiết từ các chủng vi rút gây bệnh trên lợn có đặc điểm tương tự PRRSV và các vi khuẩn phổ biến được liệt kê tại Bảng 1.

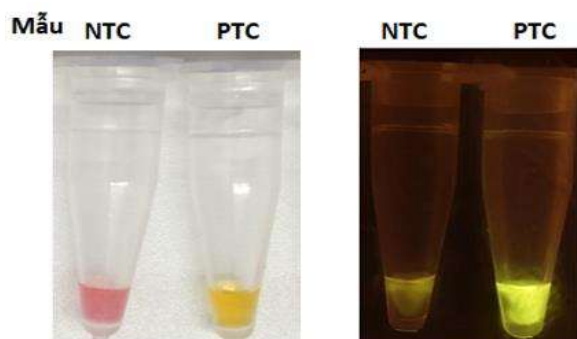
2.6 Quy trình multiplex RT-LAMP với RNA tách từ các mẫu bệnh phẩm khác nhau

13 mẫu huyết thanh bệnh phẩm PRRSV được thu nhận, tách chiết RNA bằng kit tách chiết Monarch® Total RNA Miniprep Kit (NEB, UK) và được xác nhận bằng RT-qPCR. Các mẫu RNA này sau đó được sử dụng làm mạch khuôn cho quy trình multiplex RT-LAMP đã được tối ưu. Kết quả được ghi nhận bởi màu sắc và chất nhuộm SYBR I.

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Kết quả kiểm tra môi và các thành phần dùng cho multiplex RT-LAMP

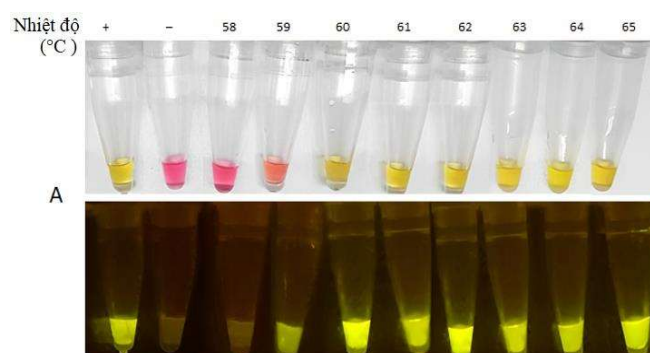
Các phản ứng multiplex RT-LAMP ban đầu được ủ tại nhiệt độ 65 °C trong thời gian 45 phút. Phản ứng sử dụng 2 bộ môi đặc trưng được thiết kế cho gen *M* và *nsp* của PRRSV và RNA bộ gen có nồng độ 10^4 TCID₅₀/mL. Kết quả kiểm tra cho thấy, có sự thay đổi từ màu hồng sang vàng đối với mẫu dương chứa RNA của PRRSV mục tiêu và giữ nguyên màu hồng đối với mẫu âm (Hình 2). Sự thay đổi màu sắc cho thấy sản phẩm khuếch đại đã được tạo ra và có thể quan sát bằng mắt thường, chứng minh rằng bộ môi và các thành phần được lựa chọn cho phản ứng RT-LAMP đã phát hiện được trình tự mục tiêu của PRRSV và dùng cho các phản ứng tiếp theo.



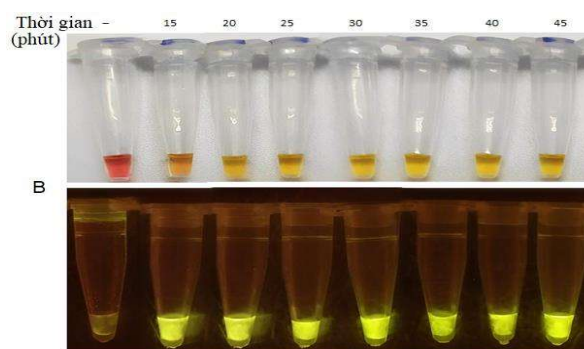
Hình 2 Kết quả kiểm tra môi multiplex RT-LAMP được thiết kế đặc trưng cho PRRSV.

3.2 Kết quả tối ưu điều kiện phản ứng multiplex RT-LAMP

Nhiệt độ phản ứng được khảo sát trong khoảng (58-65) °C, trong thời gian phản ứng 45 phút. Theo kết quả khảo sát, sản phẩm RT-LAMP có thể quan sát bằng SYBR tại nhiệt độ 60 °C, tuy nhiên phải từ nhiệt độ (61-65) °C, sự thay đổi màu sắc phản ứng thể hiện rõ



ràng khi quan sát bằng mắt thường (Hình 3A), kết quả đồng nhất giữa các lần lặp lại của khảo sát. Cùng với chỉ dẫn của nhà sản xuất và các nghiên cứu trước đó, nhiệt độ 61 °C là nhiệt độ tối ưu cho phản ứng trong nghiên cứu này, đồng thời nhiệt độ này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Thời gian kéo dài của phản ứng RT-LAMP quyết định số lượng sản phẩm được hình thành trong phản ứng. Kết quả khảo sát cho thấy, sản phẩm khuếch đại của phản ứng có thể được nhìn thấy ở thời gian 15 phút là thời gian ít nhất để tạo ra sự thay đổi về màu sắc, bên cạnh đó kết quả ở thời gian 25 phút, phản ứng RT-LAMP cho kết quả màu và kết quả SYBR rõ nhất (Hình 3B). Việc sử dụng hai bộ môi trong cùng một phản ứng đã làm tăng hiệu suất phản ứng và rút ngắn thời gian phản ứng đáng kể so với thời gian phản ứng (40-60) phút của các nghiên cứu trước đó [15-17]. Vì vậy thời gian 25 phút là thời gian tối ưu nhất được lựa chọn áp dụng cho các khảo sát tiếp theo.

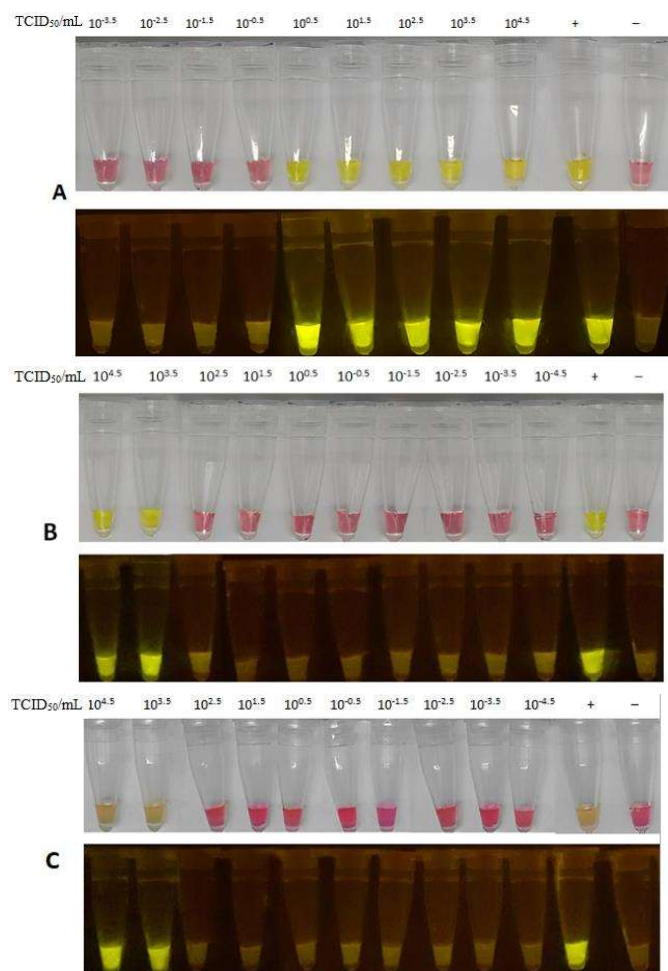


Hình 3 Kết quả tối ưu nhiệt độ và thời gian cho phản ứng multiplex RT-LAMP.

3.3 Kết quả khảo xác giới hạn phát hiện của multiplex RT-LAMP

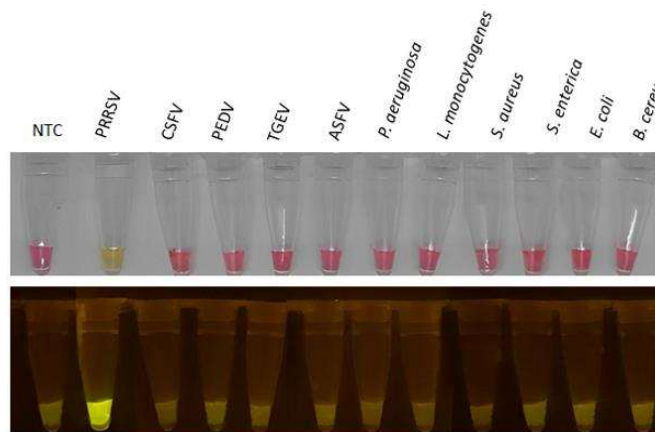
Giới hạn phát hiện phương pháp multiplex RT-LAMP được khảo sát với mẫu RNA tách chiết từ vi rút có nồng độ ban đầu $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL. Theo đó, mẫu RNA ban đầu được pha loãng theo bậc 10 về các nồng độ trong khoảng ($10^{4.5}$ đến $10^{-4.5}$) TCID₅₀/mL và phản ứng multiplex RT-LAMP được thực hiện với các mẫu RNA này, đồng thời so sánh kết quả với phản ứng RT-LAMP đơn gen. Phản ứng sử dụng mẫu RNA bộ gen PRRSV có nồng độ 104 TCID₅₀/mL. Phản ứng được ủ tại các nhiệt độ khác nhau trong 25 phút. Kết quả được ghi nhận bằng màu sắc phản ứng, thuốc nhuộm SYBR I và được thể hiện tại Hình 4 (trong đó: (A) kết quả multiplex RT-LAMP, (B) kết quả khảo sát với bộ môi *nsp*, (C) kết quả khảo sát với bộ môi *M*). Kết quả cho thấy, phản ứng RT-LAMP đã được tối ưu có khả

năng phát hiện $10^{0.5}$ TCID₅₀/mL, nhạy hơn 100 lần so với kết quả RT-LAMP đơn gen và kết quả có giá trị ngang bằng với giới hạn phát hiện của một số kit RT-qPCR chẩn đoán PRRSV có trên thị trường. Đồng thời, giới hạn phát hiện của quy trình RT-LAMP đã tối ưu trong nghiên cứu thể hiện khả năng phát hiện PRRSV có hiệu quả hơn so với các nghiên cứu trước đó khi sử dụng cùng phương pháp [18-19]. Kết quả thể hiện ưu điểm về giới hạn phát hiện của multiplex RT-LAMP so với phản ứng RT-LAMP đơn giản và điều này chứng minh khả năng phát triển cao của phương pháp multiple RT-LAMP trong việc phát hiện các mẫu bệnh phẩm có nồng độ thấp và vật nuôi chưa thể hiện triệu chứng bệnh.



Hình 4 Kết quả khảo sát giới hạn phát hiện của multiplex RT-LAMP đối với RNA bộ gen của PRRSV.

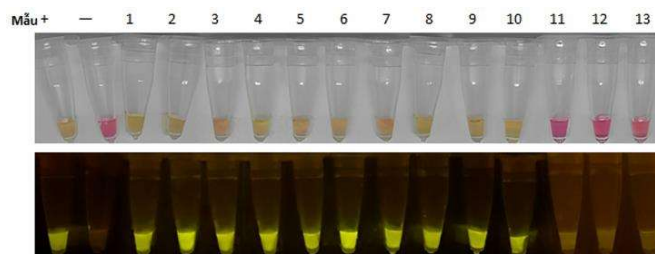
3.4 Kết quả khảo sát tính đặc hiệu của bộ môi thiết kế
 Tính đặc hiệu của bộ môi cho PRRSV được đánh giá bằng việc thực hiện phản ứng multiplex RT-LAMP với các chủng vi rút gây bệnh trên lợn với các triệu chứng tương đồng với PRRS và một số vi khuẩn phổ biến trong chuồng trại (Bảng 1). Quan sát kết quả tại Hình 5 cho thấy, multiplex RT-LAMP trong nghiên cứu này có thể phân biệt trình tự gen mục tiêu của PRRSV so với các vi khuẩn gần gũi, RT-LAMP chỉ khuếch đại khi RNA mục tiêu PRRSV có trong phản ứng. Kết quả chứng minh rằng, bộ môi lựa chọn thực hiện phương pháp RT-LAMP đã được tối ưu có tính chuyên biệt cao cho PRRSV.



Hình 5 Kết quả khảo sát tính đặc hiệu của bộ môi được thiết kế.

3.5 Hoạt động của RT-LAMP đối với RNA tinh sạch từ mẫu huyết thanh bệnh phẩm

13 mẫu huyết thanh bệnh phẩm được thu nhận, tách chiết và kiểm tra xác nhận bằng phương pháp RT-qPCR tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam, trong đó có 10 mẫu dương tính với PRRSV và 3 mẫu âm tính với PRRSV. Các mẫu RNA này được dùng làm mạch khuôn cho multiplex RT-LAMP đã được tối ưu. Kết quả cho thấy multiplex RT-LAMP có khả năng phát hiện RNA bộ gen của PRRS (Hình 6) trên 10 mẫu RNA tách chiết từ các mẫu bệnh phẩm có nồng độ khác nhau, trong khi đó 3 RNA tách từ mẫu âm không chứa vi rút cho cũng kết quả âm tính. Điều này cho thấy khả năng ứng dụng của phương pháp khi thực hiện với mẫu thực tế một cách chính xác và hiệu quả.



Hình 6 Khả năng phát hiện của multiplex RT-LAMP đối với các mẫu RNA có nồng độ khác nhau.

4 Kết luận

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn đến nay vẫn là một trong những bệnh gây ra thiệt hại nặng nề cho ngành chăn nuôi tại Việt Nam. Việc phát hiện bệnh sớm, tại giai đoạn ủ bệnh có ý nghĩa quan trọng. Hiện nay, các phương pháp chính để phát hiện bệnh chủ yếu dựa vào phân lập, huyết thanh học và RT-PCR phát hiện trình tự đặc trưng [20]. Trong khi quy trình phân

lập và huyết thanh học đòi hỏi nhiều thời gian hóa chất mắc tiền thì RT-PCR yêu cầu thiết bị chuyên biệt trong phòng thí nghiệm. Trong nghiên cứu này, quy trình multiplex RT-LAMP đã được tối ưu thành công phát hiện nhanh PRRSV trong thời gian 25 phút tại 61 °C. Giới hạn phát hiện của phương pháp là $10^{0.5}$ TCID₅₀/mL nhạy hơn 100 lần so với phản ứng RT-LAMP đơn gen. Bộ mỗi được lựa chọn có tính chuyên biệt cao so với các chủng vi rút gây bệnh trên lợn, vốn

đễ nhầm lẫn với PRRSV khi xét về các dấu hiệu lâm sàng ban đầu. Phương pháp RT-LAMP trong nghiên cứu này được thực hiện đơn giản, dễ thao tác, kết quả quan sát trực tiếp bằng mắt thường, có khả năng phát hiện bệnh cho các quy trình phát hiện nhanh, tại chỗ.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ – Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2022.01.131/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Done S.H., Paton D.J., and White M.E.C. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): A review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects. *British Veterinary Journal*, 152(2), pp. 153-174.
2. Nodelijk G. (2002). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis: A review. *Veterinary Quarterly*, 24(2), pp. 95-100.
3. Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp trên heo - PRRS - Thuốc thú y Biovet Chất lượng Vàng. Thuốc thú y tiêu chuẩn GMP-WHT. <<http://biovet.vn/hoi-chung-roi-loan-sinh-san-va-ho-hap-tren-heo-prrs/>>, accessed: 07/06/2021.
4. Yoon I.J., Joo H.S., Christianson W.T., et al. (1992). Isolation of a cytopathic virus from weak pigs on farms with a history of swine infertility and respiratory syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(2), pp. 139–143.
5. Tu T., Pang M., Jiang D., et al. (2023). Development of a Real-Time TaqMan RT-PCR Assay for the Detection of NADC34-like Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Veterinary Sciences*, 10(4), pp. 279.
6. Yang K., Tian Y., Zhou D., et al. (2017). A Multiplex RT-PCR Assay to Detect and Discriminate Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses in Clinical Specimens. *Viruses*, 9(8), pp. 205.
7. Wernike K., Bonilauri P., Dauber M., et al. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: interlaboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction detection methods. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(5), pp. 855-866.
8. Mori Y., Kanda H., and Notomi T. (2013). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19(3), pp. 404-411.
9. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., et al. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), pp. e63.
10. Li C., Liang J., Yang D., et al. (2022). Visual and Rapid Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) Using Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *Animals (Basel)*, 12(19), pp. 2712.
11. Li P. and Ren X. (2011). Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of Transmissible Gastroenteritis Virus. *Current Microbiology*, 62(3), pp. 1074-1080.
12. Chowdry V.K., Luo Y., Widén F., et al. (2014). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay combined with a lateral flow dipstick for rapid and simple detection of classical swine fever virus in the field. *Journal of Virological Methods*, 197, pp. 14-18.

13. Bao H., Feng X., Ma Y., et al. (2015). Rapid Detection of Subtype H10N8 Influenza Virus by One-Step Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(12), pp. 3884-3887.
14. LAMP primer designing software [PrimerExplorer]. <https://primerexplorer.jp/e/v5_manual/index.html>, accessed: 05/23/2023.
15. Li Q., Zhou Q., Xue C., et al. (2009). Rapid detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Virological Methods*, 155(1), pp. 55-60.
16. Park J.-Y., Park S., Park Y.-R., et al. (2016). Reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the visual detection of European and North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Journal of Virological Methods*, 237, pp. 10-13.
17. Zhang L., Liu Y., Chen L., et al. (2011). Rapid and Sensitive Detection of PRRSV by a Reverse Transcription-Loop-mediated Isothermal Amplification Assay. *zgbdx*, 26(4), pp. 252-259.
18. Gou H., Deng J., Pei J., et al. (2014). Rapid and sensitive detection of type II porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a vertical flow visualization strip. *Journal of Virological Methods*, 209, pp. 86-94.
19. Rovira A., Abrahante J., Murtaugh M., et al. (2009). Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(3), pp. 350-354.
20. TCVN 8400-21:2014 Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 8400-21:2014 Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán - phần 21: Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn. <<https://luattrongtay.vn/ViewFullText/Id/adb69763-a27e-44dc-a491-ef69345bc134>>, accessed: 07/06/2021.

Multiplex RT-LAMP method development for rapid detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)

Diem Hong Tran, Hau Thi Tran, Trang Minh Pham Nguyen, Huong Thi Thu Phung

NTT Hi-tech Institute, Nguyen Tat Thanh University
thdiem@ntt.edu.vn

Abstract Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is one of the most complex and dangerous diseases in pigs, with a high herd mortality rate. To date, disease diagnosis has been primarily based on clinical signs at the onset of the disease and antibody methods, as RT-PCR molecular diagnosis frequently requires a prolonged period of time and complicated testing techniques. Meanwhile, RT-LAMP inherits all of PCR's advantages in terms of sensitivity and specificity, but with a simpler technique and a shorter implementation time. As a result, the primary goal of this study was to develop a protocol for rapid detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) using multiplex RT-LAMP. The study's optimized RT-LAMP multiplex procedure detected the PRRSV target sequence with a detection limit of $10^{0.5}$ TCID₅₀/mL; the reaction was carried out at a fixed temperature (65 °C) for 25 minutes, and the results can be read quickly with the naked eye via the reaction color.

Keywords PRRS, PRRSV, RT-LAMP, colorimetric, multiplex

