

Xây dựng quy trình khuếch đại vòng xoắn đẳng nhiệt phát hiện nhanh vi rút gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn

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

Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành

*thdiem@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS) gây ra bởi vi rút PRRS (PRRS virus - PRRSV) là một trong những bệnh phức tạp và nguy hiểm nhất ở lợn với tỉ lệ tử vong cao. Tại Việt Nam, các đợt bùng phát PRRS xảy ra hàng năm ở nhiều tỉnh thành gây thiệt hại về kinh tế cho người chăn nuôi và rủi ro về sức khỏe người tiêu dùng. Hiện nay, RT-PCR (Realtime Polymerase Chain Reaction) đang là phương pháp vàng trong chẩn đoán PRRS, cùng với các phương pháp sinh học phân tử khác luôn được quan tâm nghiên cứu. Trong bài báo này, nhóm tác giả đã nghiên cứu phát triển phương pháp khuếch đại vòng xoắn (Polymerase spiral reaction - PSR) đẳng nhiệt. Nhờ tối ưu quy trình PSR đã đạt được kết quả phát hiện PRRSV nhanh và chính xác trong điều kiện đẳng nhiệt (không cần thiết bị luân nhiệt đắt tiền) với giới hạn phát hiện $10^{0.5}$ TCID₅₀/mL, phản ứng được thực hiện ở một nhiệt độ cố định (65 °C) trong thời gian 40 phút và có thể đọc kết quả tại chỗ bằng mắt thường qua màu của phản ứng.

Nhận 19.10.2021

Được duyệt 05.11.2021

Công bố 10.11.2021

Từ khóa
RT-PCR, PRRSV,
isothermal

© 2021 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS) gây ra bởi Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) là một loại Arterivirus, họ Arteriviridae [1]. Vi rút phát triển, tăng nhanh làm suy giảm nghiêm trọng sức đề kháng của lợn bệnh, từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho các vi khuẩn và vi rút khác xâm nhập gây các triệu chứng nặng cho lợn [1, 2].

PRRS có thể được phát hiện thông qua các triệu chứng lâm sàng có thể quan sát trực tiếp, tuy nhiên, các biểu hiện của bệnh thường dễ nhầm lẫn với các bệnh do nguyên nhân khác xảy ra trên lợn [3]. Do đó, cần kết hợp các phương pháp khác trong chẩn đoán bệnh như phát hiện kháng thể bằng phương pháp ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) [3], phương pháp IPMA (Immunoperoxidase monolayer assay) [3], phương pháp khuếch đại axit nucleic (RT-PCR) [3]. Hiện nay RT-PCR vẫn được coi là tiêu

chẩn vàng trong việc chẩn đoán sự có mặt của PRRSV. RT-PCR có thể cho kết quả với độ nhạy và độ đặc hiệu cao, tuy nhiên, phương pháp đòi hỏi về máy móc đắt tiền trong phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn xét nghiệm và an toàn sinh học, cũng như kỹ thuật viên có kinh nghiệm về sinh học phân tử [4, 5]. Chính vì vậy, song song với việc phát triển kit xét nghiệm RT-PCR để tăng hiệu quả định lượng vi rút trong các phòng thí nghiệm trung tâm thì việc phát triển phương pháp sàng lọc có khả năng xét nghiệm nhanh vi rút với các yêu cầu tối thiểu về trang thiết bị và đào tạo nhân sự chuyên môn ở thực địa và các tuyến cơ sở là cần thiết để bổ sung cho bộ máy y tế dự phòng.

Trong khi đó, phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt vòng xoắn Polymerase spiral reaction (PSR) được giới thiệu vào năm 2015 thừa hưởng tất cả các ưu điểm của PCR về độ nhạy và độ đặc hiệu [6]. PSR là phương

pháp đẳng nhiệt mới được phát triển trong thời gian gần đây với nhiều ưu điểm để phát triển các quy trình phát hiện nhanh, tại chỗ [7]. Phương pháp này chỉ cần hoạt động của một cặp mồi được thiết kế đặc biệt với khả năng tạo vòng xoắn và khuếch đại DNA mục tiêu qua các chu kỳ dưới hoạt động của enzyme *Bst* polymerase [6], phản ứng xảy ra ở một nhiệt độ cố định và kết quả có thể quan sát trực tiếp qua việc quan sát sự thay đổi màu của sản phẩm sau phản ứng khi có sự hiện diện của chất chỉ thị màu. Với sự kết hợp enzyme phiên mã ngược và *Bst* polymerase, PSR có khả năng phát hiện được RNA mục tiêu trong một phản ứng duy nhất [7]. Vì thế, trong nghiên cứu này, phương pháp PSR được tối ưu để phát hiện chính xác trình tự RNA mục tiêu của PRRSV, kết quả có thể được ghi nhận trực tiếp thông qua màu sắc phản ứng với quy trình thực hiện đơn giản, không yêu cầu thiết bị phức tạp. Kết quả chứng minh rằng PSR có thể trở thành một phương pháp hữu ích cho chẩn đoán lâm sàng.

Bảng 1 Các trình tự sử dụng trong nghiên cứu

Tên	Trình tự 5'-3'
PRRS_PSR_F	ACGATTTCGTACATAGAAGTATAG-AGAAAAACCCGGAGAAGCCC
PRRS_PSR_R	GATATGAAGATACATGCTTAGCA-ATCTGACAGGGCACAAGTTCC
M_gblock	GGAGCAGTAGTTGCACTTCTTTGGGGAGTGTACTCAGCCATAGAA ACCTGGAAATTCATCACCTCCAGATGCCGTTTGTGCTTGCTAGGC CGCAAGTACATCCTGGCCCCTGCCACCACGTCGAAAGTGCCGC GGGCTTTCATCCGATTGCGGCAAATGATAACCACGCATTTGTGCGT CCGGCGTCCCGGCTCCACTACGGTCAACGGCACATTGGTGCCCGG GTTGAAAAGCCTCGTGTTGGGTGGCAGAAAAGCTGTAAAGCAGG GAGTGGTAAACCTTGTTAAATATGCCAA

Tách chiết RNA vi rút

Mẫu RNA vi rút được cung cấp bởi Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã được tách chiết bằng kit tách chiết RNA - QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, USA) và được định lượng bằng phương pháp nuôi cấy vi rút kết hợp phương pháp RT-qPCR. Mẫu RNA tách chiết sau kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch được lưu trữ tại -80°C để sử dụng cho phản ứng PSR.

Phương pháp PSR

Tất cả các phản ứng PSR thực hiện trong nghiên cứu này được thực hiện với thể tích cuối cùng là 15 μL . Hỗn hợp phản ứng gồm 5 μL mẫu, hỗn hợp mồi (1,6 μM mồi PRRS-PSR-F, 1,6 μM PRRS-PSR-R), 7,5 μL WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix

2 Vật liệu và phương pháp

Thiết kế mồi PSR đặc hiệu cho PRRSV

Dựa theo các nghiên cứu trước đó, gen *M* được lựa chọn làm gen mục tiêu phát hiện do tính ổn định và độ bảo tồn cao của trình tự gen ở PRRSV [8, 9]. Trình tự mồi PSR được thiết kế đặc trưng cho PRRSV được thiết kế bằng phần mềm PrimerExplorerV5 dựa trên trình tự bộ gen PRRSV có số hiệu JX512910, trình tự mồi được kiểm tra bằng PCR insilico bằng phần mềm Geneious Prime các trình tự này cũng được tổng hợp bởi Công ty Sinh Hóa Phù Sa (Việt Nam) và sử dụng làm mồi cho tất cả các thí nghiệm trong nghiên cứu này. Trình tự gen có vị trí từ 14510 đến 14805 trên bộ gen của PRRSV No. JX512910.2 được tổng hợp bởi Công ty Sinh Hóa Phù Sa dùng làm trình tự mục tiêu cho các bước đánh giá điều kiện ban đầu, đồng thời làm chứng dương cho khảo sát. Trình tự mục tiêu dạng tổng hợp và mồi được thể hiện tại Bảng 1.

(NEB, UK) và nước sinh học phân tử. Các phản ứng PSR ban đầu được thực hiện tại 65°C trong thời gian 45 phút.

Kết quả của phản ứng được ghi nhận thông qua màu sắc của phản ứng và phương pháp nhuộm huỳnh quang. Theo đó, phản ứng dương thể hiện màu sắc phản ứng thay đổi từ màu hồng ban đầu sang màu vàng, màu sắc không thay đổi (màu hồng) đối với phản ứng âm. Mặt khác, 1 μL SYBR Green I dye (Thermo Fisher Scientific, USA) nồng độ 100X được cho vào mỗi ống sản phẩm và quan sát sự phát quang dưới ánh sáng 460 nm.

Khảo sát điều kiện phản ứng



Thời gian tối ưu của phản ứng được khảo sát trong khoảng (5 – 50) phút phản ứng, mỗi mốc cách nhau 5 phút. Phản ứng được đặt ở nhiệt độ 65 °C, xác định kết quả thông qua màu sắc phản ứng và nhuộm SYBR.

Nhiệt độ tối ưu của phản ứng PSR được khảo sát trong khoảng nhiệt độ từ (56 - 67) °C, mỗi mốc nhiệt độ cách nhau 1 °C. Phản ứng được ủ với thời gian đã tối ưu trước đó, kết quả được quan sát bằng màu sắc phản ứng và nhuộm SYBR.

Khảo sát giới hạn phát hiện của phản ứng

Số bản sao của DNA mạch khuôn được tính toán bằng chương trình Endmem <http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>; 10⁹ bản sao trình tự gen M đích của PRRSV dạng tổng hợp, được pha loãng theo bậc 10 về các nồng độ cuối cùng 10⁸ – 10² bản sao và tiến hành thực hiện phản ứng với các điều kiện và thành phần theo nghiên cứu trước đó. Sản phẩm được phân tích bằng màu sắc sau phản ứng và nhuộm SYBR.

Mẫu RNA được tách chiết từ mẫu virus nuôi cấy có nồng độ 10^{5.5} TCID₅₀/mL cũng được pha loãng về các nồng độ cuối cùng 10^{4.5}, 10^{3.5}, 10^{2.5}, 10^{1.5}, 10^{0.5} và 10⁰ TCID₅₀/mL và tiến hành thực hiện phản ứng với các điều kiện tối ưu. Sản phẩm được phân tích bằng màu sắc sau phản ứng và nhuộm SYBR

Khảo sát tính đặc hiệu của phản ứng PSR

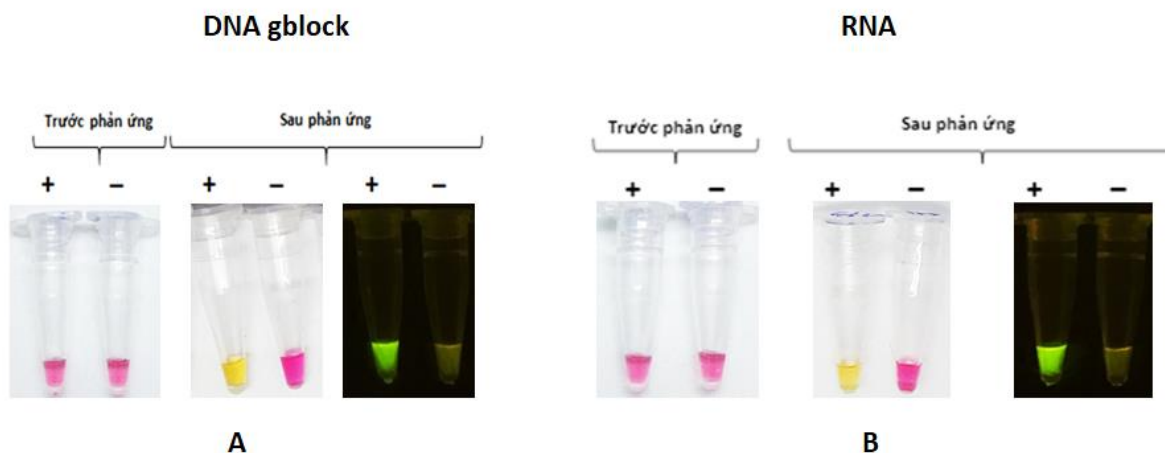
Trong khảo sát này, RNA các vi rút gây bệnh phổ biến trên lợn với các triệu chứng gây bệnh có nhiều điểm tương đồng với PRRS (CSFV, PEDV, ASFV) các vi khuẩn thông thường phổ biến ngoài môi trường được sử dụng để thực hiện phản ứng PSR *S. enterica*, *S.*

aureus, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* với các thành phần và điều kiện đã được khảo sát.

3 Kết quả

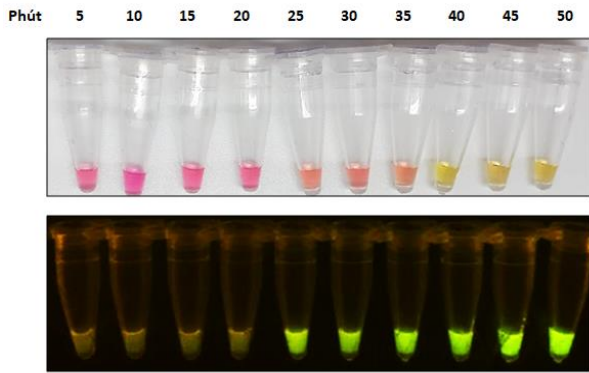
Thiết lập phản ứng PSR

Các phản ứng PSR ban đầu được thực hiện nhằm kiểm tra hoạt động của mỗi và các thành phần phản ứng. Phản ứng được thực hiện bởi 2X warmstart LAMP colorimetric mastermix dưới sự hiện diện của phenolred – chất chỉ thị màu cho phản ứng. Phản ứng được đặt tại nhiệt độ 65 °C trong thời gian 45 phút, kết quả cho thấy, màu sắc phản ứng thay đổi từ màu hồng ban đầu sang vàng đối với mẫu dương chứa trình tự mục tiêu dạng tổng hợp và giữ nguyên màu sắc ban đầu đối với mẫu âm (Hình 1A). Mặt khác kết quả PSR với RNA tinh sạch của PRRSV tại Hình 1B cho thấy, PSR có khả năng khuếch đại RNA mục tiêu, thể hiện màu sắc sau phản ứng rõ nét. Kết quả của phản ứng cũng đồng thời được ghi nhận bằng phương pháp nhuộm SYBR, theo đó chúng dương phát quang dưới ánh sáng có bước sóng 460 nm trong khi chúng âm không thể hiện tính hiệu phát quang. Các kết quả trên cho thấy, bộ môi được thiết kế có khả năng khuếch đại thành công trình tự mục tiêu PRRSV tổng hợp và RNA bộ gen đã được tách chiết, kết quả có thể quan sát trực tiếp bằng mắt thường qua màu sắc của phản ứng và có kết quả tương đồng với phương pháp nhuộm huỳnh quang. Vì vậy, bộ môi này đã được chọn cùng với các thành phần phản ứng được áp dụng cho các khảo sát tiếp theo.



Hình 1 Phản ứng PSR kiểm tra các thành phần phản ứng
 Phản ứng được ủ tại 65 °C trong 45 phút, kết quả được thể hiện qua màu sắc và soi SYBR.
 Trong đó: A. Phản ứng với trình tự mục tiêu dạng tổng hợp. B. Phản ứng với RNA bộ gen PRRSV

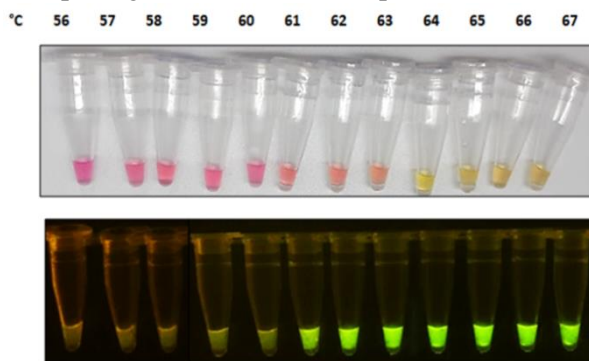
Tối ưu nhiệt độ và thời gian cho phản ứng PSR



Hình 2 Kết quả khảo sát thời gian phản ứng

Phản ứng ủ ở nhiệt độ 65 °C tại các mốc thời gian từ (5 – 50) phút. Kết quả thể hiện bằng màu và tín hiệu phát quang.

Thời gian kéo dài của phản ứng PSR quyết định tới số lượng sản phẩm được hình thành trong phản ứng. Trong khảo sát này, phản ứng PSR được thực hiện trong khoảng thời gian (5 – 50) phút phản ứng. Tại Hình 2, kết quả soi SYBR cho thấy, 25 phút là thời gian tối thiểu để phản ứng xảy ra có thể quan sát bằng huỳnh quang. Bên cạnh đó, với thời gian phản ứng (40 – 50) phút, phản ứng thể hiện sự thay đổi về màu sắc rõ nhất có thể quan sát bằng mắt thường. Qua kết quả khảo sát, 40 phút là thời gian tối thiểu để phản ứng PSR cho kết quả màu và kết quả SYBR rõ nhất. Vì vậy thời gian 40 phút là thời gian tối ưu nhất được lựa chọn áp dụng cho các khảo sát tiếp theo.



Hình 3 Kết quả khảo sát nhiệt độ phản ứng

Phản ứng ủ trong thời gian 40 phút với các nhiệt độ khác nhau trong khoảng (56 – 67) °C. Kết quả được ghi nhận bằng màu sắc và nhuộm SYBR.

Nhiệt độ phản ứng được khảo sát trong khoảng (56 – 67) °C. Kết quả tại Hình 3 cho thấy, sản phẩm PSR có thể quan sát bằng SYBR tại nhiệt độ 61 °C, tuy nhiên phải từ nhiệt độ (64 – 67) °C, sự thay đổi màu sắc phản ứng thể hiện sự thay đổi rõ nét. Cùng với chỉ dẫn của nhà sản xuất và các nghiên cứu trước đó (nhiệt độ

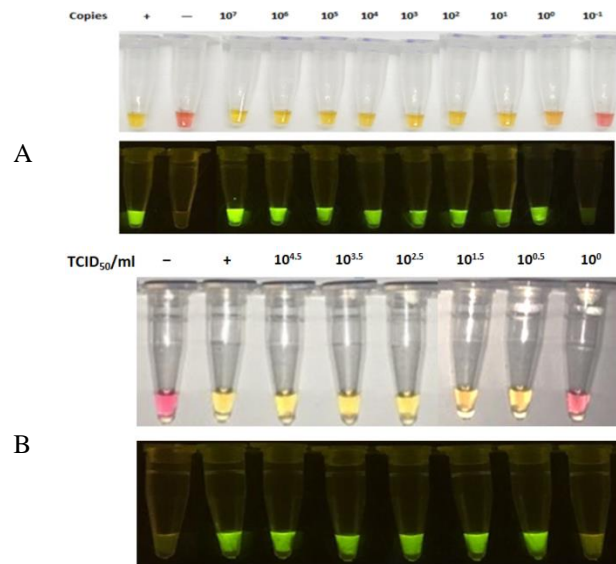
tối ưu phản ứng PSR vào khoảng (60 – 65) °C), nhiệt độ 65 °C là nhiệt độ tối ưu cho phản ứng trong nghiên cứu này, đồng thời nhiệt độ này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Giới hạn phát hiện của phương pháp PSR

DNA tổng hợp ban đầu có nồng độ 10^9 bản sao được pha loãng theo về các nồng độ trong khoảng ($10^7 - 10^1$) bản sao và thực hiện phản ứng PSR với các điều kiện đã được tối ưu trước đó.

Kết quả Hình 4A cho thấy, phản ứng PSR có thể phát hiện 1 bản sao DNA tổng hợp có trong phản ứng, kết quả thể hiện âm tính đối với các phản ứng có số lượng bản sao DNA mục tiêu bé hơn.

Đồng thời, mẫu RNA bộ gen được tách chiết từ mẫu vi rút được nuôi cấy, $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL cũng được pha loãng về các nồng độ cuối cùng $10^{4.5} - 10^0$ TCID₅₀/mL và tiến hành thực hiện phản ứng PSR. Kết quả Hình 4B cho thấy, phản ứng PSR đã được tối ưu có khả năng phát hiện $10^{0.5}$ TCID₅₀/mL, 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. Điều này thể hiện khả năng phát hiện tối ưu của PSR đối với các mẫu có nồng độ vi rút thấp và đang trong thời gian ủ bệnh.



Hình 4 Giới hạn phát hiện của phản ứng PSR

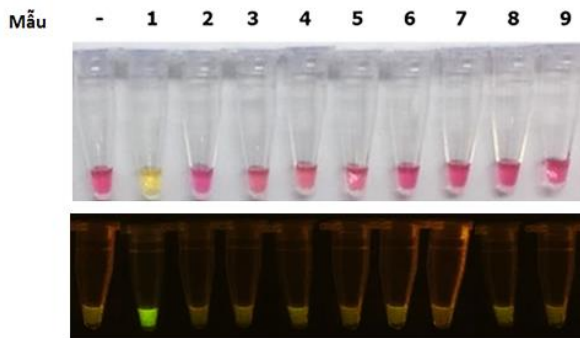
Phản ứng tại nhiệt độ 65 °C trong thời gian 40 phút.

A. Kết quả với trình tự mục tiêu dạng tổng hợp, B. Kết quả với trình tự mục tiêu là RNA tách chiết từ vi rút nuôi cấy.

Tính đặc hiệu của bộ môi thiết kế đối với PRRSV

Tính đặc hiệu của bộ môi cho PRRSV được đánh giá bằng việc thực hiện phản ứng PSR với các chủng vi

rút gây bệnh trên lợn với các triệu chứng tương đồng với PRRS bao gồm CSFV, ASFV, PEDV và một số vi khuẩn phổ biến trong chuồng trại bao gồm vi khuẩn *S. enterica*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* và *V. parahaemolyticus*. Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp PSR đã được tối ưu trong nghiên cứu này có thể phân biệt trình tự gen mục tiêu của PRRSV so với các vi khuẩn gần gũi, PSR chỉ khuếch đại khi RNA mục tiêu PRRSV có trong phản ứng (Hình 5). Kết quả cho thấy, bộ mồi lựa chọn thực hiện phương pháp PSR đã được tối ưu có tính chuyên biệt cao cho PRRSV.

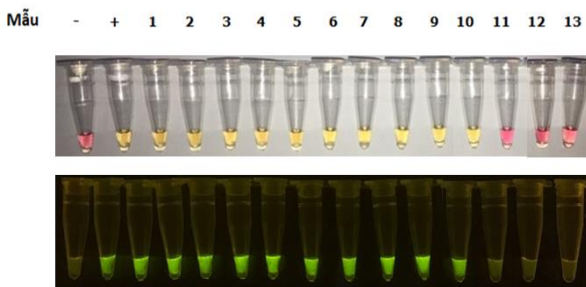


Hình 5 Kết quả khảo sát tính đặc hiệu của PSR

Phản ứng thực hiện tại nhiệt độ 65 °C trong 40 phút, được quan sát bằng màu sắc và soi SYBR. Trong đó (-) là chứng âm không chứa DNA/RNA, các mẫu từ 1 - 9 tương ứng:

1. PRRSV, 2. CSFV, 3. ASFV, 4. PEDV, 5. *S. enterica*,
6. *S. aureus*, 7. *P. aeruginosa*, 8. *L. monocytogenes*,
9. *V. Parahaemolyticus*

Hoạt động của PSR với RNA bộ gen được tách chiết



Hình 6 Khả năng phát hiện của PSR đối với các mẫu RNA được tách chiết từ các mẫu bệnh phẩm khác nhau. Trong đó: (-) mẫu âm không chứa trình tự mục tiêu, (+) mẫu dương chứa trình tự mục tiêu dạng tổng hợp, (1-10) mẫu RNA PRRSV tách chiết từ mẫu huyết thanh bệnh phẩm khác nhau, (11-13) mẫu tách chiết từ mẫu huyết thanh thương mại không chứa RNA PRRSV

RNA bộ gen của PRRSV cung cấp bởi Học viện Nông nghiệp Việt Nam được tách chiết trực tiếp từ mẫu

huyết thanh bệnh phẩm, kiểm tra xác nhận bằng phương pháp RT-qPCR. RNA được dùng để làm mạch khuôn cho phương pháp PSR. Kết quả cho thấy, phương pháp PSR đã được tối ưu trong nghiên cứu có khả năng phát hiện RNA bộ gen của PRRS (Hình 6) trên 10 mẫu RNA tách chiết có nồng độ khác nhau, trong khi đó 3 mẫu RNA tách chiết từ huyết thanh thương mại, không chứa vi rút cho kết quả âm tính (Hình 6, 11-13). Quan sát màu phản ứng cho thấy sự thay đổi màu sắc từ hồng sang vàng đối với phản ứng chứa RNA mục tiêu, màu phản ứng giữ nguyên đối với phản ứng âm. Kết quả đồng nhất khi soi bằng chất nhuộm SYBR.

4 Kết luận

Từ trước đến nay, thịt lợn luôn là một trong những sản phẩm thịt quan trọng hàng đầu đối với ngành chăn nuôi tại Việt Nam, vì thế mà sự nhiễm PRRSV đã trở thành mối quan tâm lớn do khả năng lây nhiễm gây nên tỷ lệ tử vong cao ở lợn. Hiện tại, việc kiểm soát lây nhiễm PRRSV phụ thuộc vào việc xác định sớm để ngăn chặn sự lây lan thêm của vi rút. Do đó, việc phát triển một phương pháp chẩn đoán đơn giản và nhanh chóng cho PRRSV là vô cùng quan trọng. Bên cạnh đó, các phương pháp phát hiện chính xác bệnh hiện nay đều đòi hỏi trang thiết bị đắt tiền và môi trường chuyên biệt, chúng không thích hợp để phát hiện PRRSV tại chỗ và trong các phòng thí nghiệm được trang bị kém hơn. Trong nghiên cứu này, phương pháp PSR với cặp mồi đặc hiệu của gen *M* đã được thực hiện và tối ưu thành công phát hiện chính xác PRRSV trong thời gian 40 phút tại nhiệt độ cố định (65 °C). Với sự kết hợp của enzyme phiên mã ngược có trong phản ứng cùng hoạt động thay thế mạch của enzyme *Bst* DNA polymerase, RNA mục tiêu được khuếch đại đặc hiệu và chính xác trong thời gian ngắn, đồng thời bộ mồi được lựa chọn có tính chuyên biệt cao so với các chủng vi rút gây bệnh trên lợn, vốn dễ nhầm lẫn với PRRSV khi xét về các dấu hiệu lâm sàng ban đầu. Với quy trình được tối ưu trong nghiên cứu, PSR có khả năng phát hiện trình tự mục tiêu PRRSV tại nồng độ 1 bản sao đối với trình tự dạng tổng hợp và 10^{0.5} TCID₅₀/mL đối với RNA bộ gen đã được tinh sạch. Đây là nghiên cứu đầu tiên phát triển phương pháp phát hiện PRRSV bằng phương pháp PSR có thể quan sát kết quả trực tiếp bằng mắt thường thông qua chất chỉ thị màu

phenolred. Việc phát hiện chính xác RNA mục tiêu được tách chiết từ các mẫu bệnh phẩm PRRSV cho thấy khả năng ứng dụng cao của phương pháp cho chẩn đoán lâm sàng và là một phương pháp tiềm năng cho việc phát triển các kit chẩn đoán nhanh tại chỗ.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2021.01.38/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Done, S.H., Paton, D.J., and White, M.E. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): a review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects. *Br. Vet. J.* 152, 153–174.
2. Gao, M., Cui, J., Ren, Y., Suo, S., Li, G., Sun, X., Su, D., Opriessnig, T., and Ren, X. (2012). Development and evaluation of a novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detection of type II porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol. Methods* 185, 18–23.
3. Li, J., Ma, B., Fang, J., Zhi, A., Chen, E., Xu, Y., Yu, X., Sun, C., and Zhang, M. (2019). Recombinase Polymerase Amplification (RPA) Combined with Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of Salmonella in Food. *Foods* 9.
4. Liu, W., Dong, D., Yang, Z., Zou, D., Chen, Z., Yuan, J., and Huang, L. (2015). Polymerase Spiral Reaction (PSR): A novel isothermal nucleic acid amplification method. *Sci. Rep.* 5, 1–8.
5. Nodelijk, G. (2002). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis. A review. *Vet. Q.* 24, 95–100.
6. Qin, C., Jian, L., Xue-En, F., and Wei, X. (2009). Rapid detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Intervirology* 52, 86–91.
7. Tomar, P.S., Kumar, J.S., Patel, S., and Sharma, S. (2020). Polymerase Spiral Reaction Assay for Rapid and Real Time Detection of West Nile Virus From Clinical Samples. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 0.
8. Wellenberg, G.J. (2006). [Review: diagnostic methods for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infections]. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 131, 566–572.
9. Zhao, X., Lin, C.-W., Wang, J., and Oh, D.H. (2014). Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 297–312.

Evaluation of rapid detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) using Polymerase spiral reaction

Tran Hong Diem^{*}, Tran Thi Hau, Pham Nguyen Minh Trang, Phung Thi Thu Huong
NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

Abstract Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) caused by PRRS viruses (PRRSV) is one of the most complicated and dangerous diseases in pigs with a high mortality rate. In many provinces in Vietnam, annual PRRS outbreaks continue to threaten farmers' livelihoods and consumers' health. RT-PCR is currently the gold standard for diagnosing PRRS, with other molecular biology tools constantly being developed. The isothermal spiral amplification (Polymerase Spiral Reaction - PSR) method was developed and optimized in this study for rapid and specific detection of PRRSV. The method is simple and does not require expensive thermal cycling equipment. The optimized PSR could detect PRRSV target sequence with a detection limit of $10^{0.5}$ TCID₅₀/mL and the reaction was carried out at a constant temperature (65 °C) for 40 minutes. Simultaneously, the diagnostic results could be immediately confirmed by the color of the reaction.

Keywords RT-PSR, PRRSV, isothermal