

Phát hiện nhanh Enterovirus 71 và Coxsackievirus A16 bằng phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt vòng lặp (RT-LAMP)

Trần Hồng Diễm*, Phùng Thị Thu Hương

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

*thdiem@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Bệnh tay chân miệng (TCM) thường gặp ở trẻ dưới 5 tuổi, gây ra bởi các chủng vi rút thuộc họ enterovirus, trong đó hai tác nhân chính là Enterovirus 71 (EV71) và Coxsackievirus A16 (CVA16). EV71 và CVA16 có thể gây nên các biến chứng như viêm não, viêm cơ tim, dẫn đến tử vong. Đến nay vẫn chưa có vắc xin và thuốc trị đặc hiệu cho EV71 và CVA16. Vì thế việc phát hiện chẩn đoán nhanh hai loại vi rút này là rất cấp thiết. Phương pháp phát hiện bệnh hiện nay chủ yếu dựa vào triệu chứng lâm sàng, kỹ thuật sinh học phân tử RT-PCR đang là tiêu chuẩn vàng dùng chẩn đoán TCM. Tuy nhiên, RT-PCR đòi hỏi thiết bị phức tạp, đắt tiền và chỉ có thể thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm. Trong khi đó, RT-LAMP thừa hưởng tất cả ưu điểm của RT-PCR về độ nhạy, độ đặc hiệu đồng thời kỹ thuật lại đơn giản dễ thực hiện. Trong nghiên cứu này, quy trình RT-LAMP được tối ưu có khả năng phát hiện trình tự mục tiêu của EV71 và CA16 với giới hạn phát hiện 1 fg đối với EV71 và 10 fg đối với CA16, phản ứng được thực hiện tại nhiệt độ cố định (60 °C) trong 35 phút, kết quả có thể được xác định bằng mắt thường thông qua màu sắc của phản ứng thể hiện tiềm năng ứng dụng cao của phương pháp đối với chẩn đoán bệnh tại chỗ.

Nhận 18.12.2020

Được duyệt 31.05.2021

Công bố 15.07.2021

Từ khóa

EV71, CA16,

RT-LAMP,

isothermal

© 2021 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Tổng quan

Tay chân miệng (TCM) là bệnh truyền nhiễm phổ biến ở trẻ nhỏ với các triệu chứng đặc trưng sốt, loét trong miệng và mụn nước trên bàn tay và bàn chân [1]. Bệnh chủ yếu do hai tác nhân thuộc họ enterovirus gây ra là human enterovirus 71 (EV71) và coxsackievirus A16 (CVA16) [1]. Đây là loại bệnh có khả năng lây lan nhanh tạo thành dịch bệnh và có khả năng dẫn đến tử vong với các biến chứng nặng liên quan đến viêm màng não, viêm cơ tim, viêm phổi cấp [1-3]. Vì thế việc phát hiện và phân biệt nhanh nhiễm EV71 và CVA16 để đưa ra phương pháp điều trị lâm sàng và kiểm soát bệnh kịp thời là rất cấp thiết do hiện nay chưa có vắc xin hoặc thuốc kháng vi rút đặc hiệu cho các trường hợp nhiễm nặng.

Hiện nay, chẩn đoán EV71 và CVA16 trong phòng thí nghiệm bao gồm phân lập vi rút, phát hiện kháng thể

đặc hiệu với vi rút và phát hiện trình tự gen của vi rút bằng kỹ thuật khuếch đại axit nucleic [4,5]. EV71 và CVA16 có thể được phân lập từ nhiều mẫu bệnh phẩm khác nhau, luôn cần (1 - 2) tuần để có kết quả [5]. Các xét nghiệm IgM dựa trên kỹ thuật miễn dịch enzym đã được phát triển [5-6], nhưng những xét nghiệm này đòi hỏi thiết bị chuyên dụng và cần mẫu huyết thanh, rất khó thu thập từ bệnh nhân trẻ sơ sinh. Các xét nghiệm PCR phiên mã ngược (RT-PCR) và realtime RT-PCR (RT-qPCR) được xem là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán phát hiện EV71 và CVA16. Tuy nhiên, các phương pháp này đòi hỏi thiết bị chuyên dụng, đắt tiền và kỹ thuật viên có kinh nghiệm, vì thế chỉ có thể thực hiện trong khu vực thí nghiệm chuyên biệt, hạn chế trong chẩn đoán trực tiếp.

Phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng lặp (LAMP) là một phương pháp khuếch đại



nhanh chóng và đơn giản được mô tả lần đầu tiên vào năm 2000 [7]. Phương pháp này hoạt động trên nguyên tắc của phản ứng dịch chuyển sợi với các cấu trúc vòng lặp lại, và toàn bộ phản ứng khuếch đại diễn ra liên tục trong điều kiện đẳng nhiệt [7]. Trước đây, các phương pháp LAMP để phát hiện các loại vi rút khác nhau đã được phát triển, bao gồm vi rút sốt xuất huyết type (1 - 4) [8], vi rút viêm não Nhật Bản [9], vi rút cúm gia cầm H5 và H7 [10], vi rút cúm đại dịch H1N1 năm 2009 [11], vi rút Marburg [12], vi rút Ebola [13], vi rút gây bệnh lở mồm long móng [14], và vi rút herpes simplex 1 [14]. Tất cả các xét nghiệm này đều cho thấy độ đặc hiệu, hiệu quả và độ nhạy cao tương đương hoặc cao hơn so với xét nghiệm PCR. Đồng thời lượng sản phẩm LAMP tạo ra trong phản ứng có khả năng làm thay đổi pH của phản ứng, việc kết hợp chỉ thị pH trong phản ứng có thể đọc nhanh kết quả phản ứng bằng mắt thường với sự thay đổi màu của phản ứng. Những nghiên cứu trước đây cho thấy tiềm năng của LAMP như một phương pháp chẩn đoán thường quy đối với các bệnh truyền nhiễm do vi rút trong phòng thí nghiệm bệnh viện. Trong nghiên cứu này, phương pháp RT-LAMP nhắm vào gen VP1 của EV71 và CVA16 đã được

phát triển và đánh giá sơ bộ các mẫu RNA bệnh phẩm, kết quả xét nghiệm có thể quan sát trực tiếp bằng mắt thường thông qua sự hiện diện của chất chỉ thị màu pH có trong phản ứng. Kết quả chứng minh rằng RT-LAMP có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, có thể trở thành một phương pháp thay thế hữu ích trong chẩn đoán lâm sàng.

2 Phương pháp

2.1 Thiết kế mồi

Trình tự gen VP1 có tính phân biệt cao giữa các serotypes của Enterovirus, vì thế VP1 được lựa chọn làm trình tự mục tiêu phát hiện EV71 và CVA16. Trình tự VP1 của EV71 và CVA16 được phân tích bằng NCBI BLAST xác định vùng trình tự bảo tồn. Vùng trình tự bảo tồn cho từng mục tiêu EV71 và CVA16 được phân tích bằng phần mềm thiết kế mồi LAMP – PrimerExplorer V5, bộ mồi sau khi được thiết kế, kiểm tra tính đặc hiệu cũng như khả năng hoạt động bằng eLAMP và NCBI BLAST. Trình tự của các mồi và đoạn trình tự mục tiêu khuếch đại được thể hiện trong Bảng 1, được tổng hợp bởi IDT (Singapore) và sử dụng cho toàn bộ nghiên cứu.

Bảng 1 Các trình tự sử dụng trong nghiên cứu

Tên	Trình tự 5'-3'
EV71_F3_1	TTGTCCCACAATTGCTCCA
EV71_B3_1	CCGAATGTGGGATATCCGTC
EV71_FIP_1	GTGGCGGTTTGCCATGCAAG-TATGTTTGTGCCACCTGGAG
EV71_BIP_1	ACCCCTCGGTTTTTGTCAAGCT-ATAAGCACTCGCAGGTGAC
EV71_LoopF_1	CCCTAGAATCAGGCTTAGGGG
EV71_LoopR_1	CCCTCCATCGCAGGTTTCAG
CA16_F3_1	TTTAGCCGTGCCGGTCTT
CA16_B3_1	GCAGTAATTGGGGGACTAGC
CA16_FIP_1	TCCCATCAGGTCGATGTCCCAA-TACAATGCCACCACAGGT
CA16_BIP_1	CTGCGGCGGAAATGCGAATT-CCATTGGGTTTGGCTACGA
CA16_LoopF_1	AACCATCTGTGTTCTGTGT
CA16_LoopR_1	GTTTACCTACATGCGTTTTGA
EV71_gblock	ACTTTTGTGCGTGCACACCCACCGGGGAAGTTGTCCACAATTGCT CCAATATATGTTTGTGCCACCTGGAGCCCCTAAGCCTGATTCTAGGG AATCCCTTGCATGGCAAACCGCCACTAACCCCTCGGTTTTTGTCAAG CTGTCAGACCCTCCATCGCAGGTTTCAGTGCCATTCATGTCACCTGC GAGTGCTTATCAATGGTTTTATGACGGATATCCCACATTCGGAGAAC ACAAACAGGAGAAAGATCTTGAATATGGGGCATGTCCTAATAACAT GATGGGCACGTTCTCAGTGCGGACTGTGGGGACCTCCAAGTCCAAGT

	<p>ACCCTTTAGTGGTTAGGATTTACATGAGAATGAAGCACGTCAGGGCG TGGATACCTCGCCCGATGCGTAACCAGAACTACCTATTCAAAGCCAA CCCAAATTATGCTGGCAACTCCATTAAGCCAAGTGGTGCCAGTCGCA CAGCGATCACCCTCTTGGGAAATTTGGACA</p>
CA16_gblock	<p>TAGTCACAGATTGGGTACTGGTATTGTACCAGCACTACAAGCCGCGG AGACAGGGGCGTCGTCTAATGCTAGTGACAAGAACCTCATTGAGAC TAGATGTGTGTTGAACCATCACTCCACACAGGAGACAGCCATTGGGA ATTTCTTTAGCCGTGCCGGTCTTGTTCAGTATTATTACAATGCCACCA CAGGTACACAGAACACAGATGGTTATGTAAATTGGGACATCGACCT GATGGGATATGCTCAGCTGCGGGCGAAATGCGAATTGTTTACCTACA TGCGTTTTGACGCTGAATTCACATTTGTCGTAGCCAAACCCAATGGT GAGCTAGTCCCCAATTACTGCAGTACATGTATGTCCACCAGGGGC TCCGAAACCTACCTCCAGAGACTCGTTTGCCTGGCAGACTGCTACCA ACCCATCTGTGTTTGTGAAAATGACGGACCCACCAGCTCAAGTGTC GTCCCCTTCATGTCACCAGCTAGTGCATACC</p>

2.2 Tách chiết RNA vi rút

Mẫu RNA vi rút được cung cấp bởi Viện Pasteur Tp. HCM, tách chiết bằng phương pháp Trizol và định lượng bằng Nanodrop bởi máy Genova Plus Life Science Spectrophotomete. 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 LAMP.

2.3 Phản ứng LAMP

Hỗn hợp phản ứng 15 μL gồm 5 μL mẫu, hỗn hợp môi (0,3 μM F3 và B3, 0,6 μM LoopF và LoopR, 2,4 μM FIP và BIP), 7,5 μL WarmStart[®] Colorimetric LAMP 2X Master Mix (NEB, UK) và nước sinh học phân tử. Các phản ứng LAMP ban đầu được ủ tại 65°C trong vòng 45 phút.

Sản phẩm của phản ứng LAMP trong nghiên cứu này được ghi nhận bằng quan sát màu phản ứng và nhuộm huỳnh quang. Theo đó, màu hồng sáng của phản ứng ban đầu thay đổi thành vàng với phản ứng dương và giữ nguyên màu sắc ban đầu với phản ứng âm. Đồng thời, sản phẩm LAMP cũng có thể quan sát bằng nhuộm chất phát huỳnh quang SYBR và soi dưới ánh sáng 460 nm.

2.4 Khảo sát điều kiện phản ứng

Enzyme *Bst* DNA polymerase có dải nhiệt độ hoạt động kéo dài, dải nhiệt độ thích hợp cho phản ứng LAMP là từ ($55 - 70^{\circ}\text{C}$) và cũng là nhiệt độ tối ưu cho quá trình bắt cặp kéo dài tạo sản phẩm LAMP. Trong nghiên cứu này, nhiệt độ tối ưu cho phản ứng được khảo sát trong khoảng ($55 - 70^{\circ}\text{C}$), mỗi mốc nhiệt độ cách nhau 1°C . Kết quả được xác định bằng màu sắc phản ứng và soi SYBR.

Thời gian các phản ứng LAMP được tiến hành khảo sát trong khoảng (5 - 70) phút phản ứng, mỗi khoảng cách nhau 5 phút. Các điều kiện khác không thay đổi, kết quả được kiểm tra bằng màu sắc và nhuộm SYBR.

2.5 Phương pháp khảo sát giới hạn phát hiện của phản ứng LAMP

Nồng độ RNA ban đầu của EV71 và CA16 được xác định bằng máy nanodrop (Genova Plus, Jenway, UK), sau đó các mẫu RNA này được pha loãng theo bậc 10 về các nồng độ cuối cùng ($10^7 - 10^{-1}$) fg 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.

2.6 Khảo sát tính đặc hiệu của mỗi phản ứng LAMP

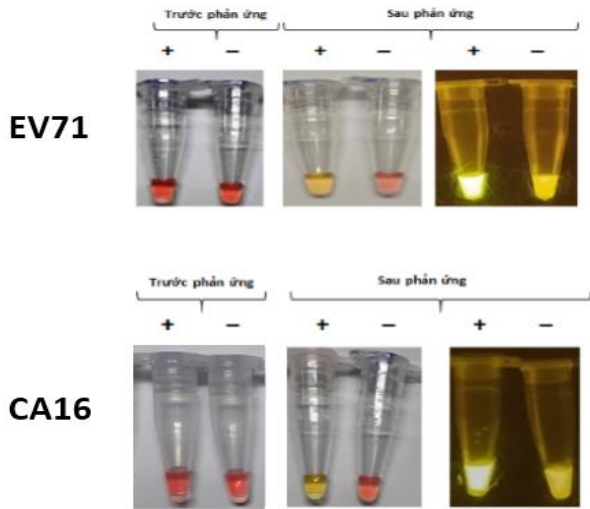
Trong khảo sát này, RNA của các Enterovirus khác có bộ gen gần gũi đồng thời cùng là tác nhân gây bệnh TCM với các triệu chứng gây bệnh gần như tương đồng với EV71 và CA16 được dùng làm mục tiêu cho phản ứng LAMP để kiểm tra tính đặc hiệu của từng bộ mỗi đặc trưng cho EV71 và CVA16.

3 Kết quả

3.1 Kết quả kiểm tra môi và các thành phần phản ứng LAMP

Trình tự của gen VP1 được tổng hợp của EV71 và CVA16 được lựa chọn làm gen mục tiêu để thực hiện phản ứng LAMP, phản ứng này được thực hiện bởi 2X warmstart colorimetric LAMP mastermix dưới sự xuất hiện của chất chỉ thị pH. Kết quả kiểm tra cho thấy sau phản ứng 45 phút ở 65°C có sự thay đổi từ màu hồng sang vàng đối với mẫu dương chứa gen mục tiêu dạng tổng hợp, giữ nguyên màu hồng đối với mẫu âm

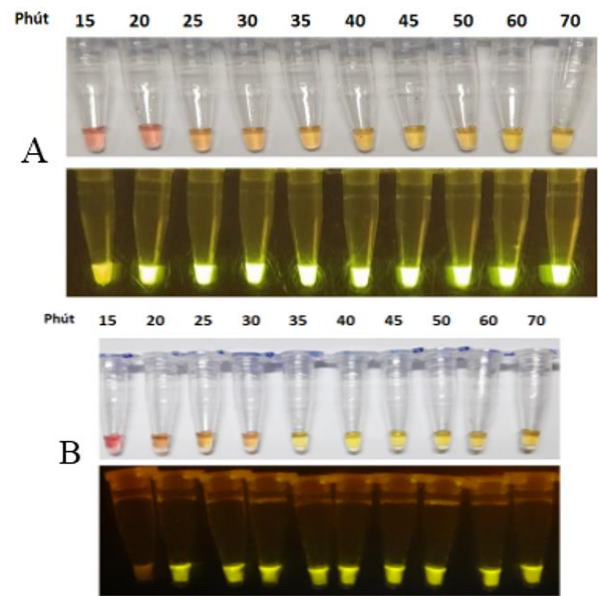
(Hình 1). Sự thay đổi màu sắc cho thấy sản phẩm khuếch đại đã được tạo ra và có thể quan sát bằng mắt thường, chứng minh rằng bộ môi được lựa chọn cho phản ứng LAMP phát hiện thành công trình tự mục tiêu của EV71 và CVA16. Mặt khác, kết quả của phản ứng cũng có thể quan sát bằng phương pháp nhuộm SYBR. Quan sát Hình 1 cho thấy, kết quả của phản ứng LAMP phát quang khi nhuộm SYBR và quan sát dưới đèn LED bước sóng 460 nm, chứng âm không thể hiện tín hiệu phát 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 Kết quả kiểm tra môi quan sát bằng màu sắc và SYBR đối với EV71 và CA16

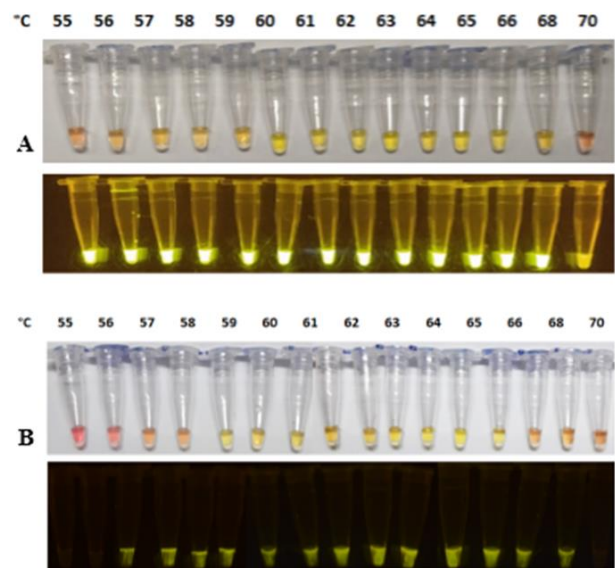
3.2 Kết quả khảo sát nhiệt độ, thời gian tối ưu cho phản ứng LAMP

Theo Hình 2 quan sát kết quả so SYBR, sản phẩm khuếch đại của phản ứng có thể được nhìn thấy ở thời gian 20 phút đối với cả hai mục tiêu EV71 và CA16, 20 phút là thời gian ỏ tối thiểu để tạo ra sự thay đổi về màu sắc; ngoài ra, trong khoảng (35 - 45) phút có sự thay đổi màu của phản ứng rõ nhất khi quan sát bằng mắt thường. Vì vậy thời gian 35 phút là thời gian tối ưu nhất được lựa chọn áp dụng cho các khảo sát tiếp theo cho cả EV71 và CVA16.



Hình 2 Kết quả khảo sát thời gian phản ứng quan sát bằng màu sắc sau phản ứng và soi SYBR. Trong đó: A. EV71; B. CA16

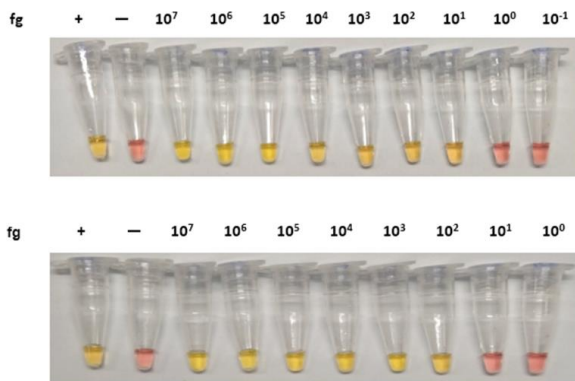
Nhiệt độ phản ứng từ (55 - 70) °C với thời gian phản ứng tối ưu là 35 phút. Theo kết quả khảo sát, sản phẩm LAMP có thể quan sát bằng SYBR đối với EV71 tại nhiệt độ 55 °C và tại nhiệt độ 57 °C đối với CA16, tuy nhiên phải từ nhiệt độ 59 °C - 60 °C, sự thay đổi màu sắc phản ứng thể hiện rõ ràng khi quan sát bằng mắt thường (Hình 3). Nhiệt độ 60 °C là nhiệt độ tối ưu cho phản ứng LAMP trong nghiên cứu này, đồng thời nhiệt độ này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3 Kết quả khảo sát nhiệt độ phản ứng quan sát bằng màu sắc sau phản ứng và soi SYBR. Trong đó: A. EV71; B. CA16

3.3 Giới hạn phát hiện của phương pháp LAMP

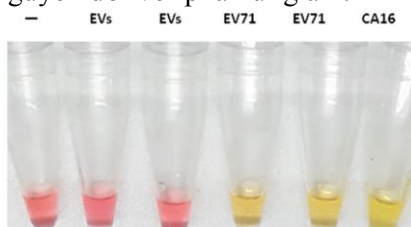
Giới hạn phát hiện của phản ứng được khảo sát với các mẫu RNA ban đầu có nồng độ 10^7 fg, các mẫu RNA này được pha loãng thành 10 cấp nồng độ (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , và 10^{-1}) fg, thực hiện phản ứng LAMP với các điều kiện phản ứng được tối ưu trước đó để khảo sát giới hạn phát hiện của phản ứng. Kết quả khảo sát Hình 4 cho thấy, phản ứng LAMP có thể phát hiện 10 fg có trong phản ứng đối với EV71, 100 fg tổng hợp đối với CA16, sản phẩm thể hiện màu sắc âm tính đối với các phản ứng có nồng độ RNA mục tiêu bé hơn.



Hình 4 Kết quả khảo sát giới hạn phát hiện của phương pháp LAMP đối với mục tiêu dạng tổng hợp EV71 và CA16

3.4 Hoạt động của LAMP đối với RNA tách chiết từ mẫu bệnh phẩm

RNA bộ gen của EV71 và CA16 cung cấp bởi Viện Pasteur Tp. HCM được tách chiết trực tiếp từ mẫu bệnh phẩm, kiểm tra xác nhận bằng phương pháp RT-qPCR. RNA được dùng để làm mạch khuôn cho phương pháp LAMP. Kết quả cho thấy, phương pháp LAMP đã được tối ưu trong nghiên cứu có khả năng phát hiện RNA bộ gen của EV71 và CA16 (Hình 5), đồng thời có thể phân biệt với các loại EVs gần gũi gây bệnh TCM. 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.



Hình 5 Kết quả LAMP với RNA bộ gen tách chiết từ EV71 và CA16

4 Thảo luận

TCM do Enterovirus gây ra là bệnh truyền nhiễm có khả năng lây từ người sang người, có khả năng bùng phát thành dịch bệnh. Trong đó EV71 và CVA16 có thể gây bệnh thần kinh nặng với đường lây phức tạp, diễn tiến nhanh và tử vong cao. Đến nay vẫn không có vắc xin hoặc thuốc chống vi rút đặc hiệu cho EV71 và CVA16. Các phương pháp phát hiện trong phòng thí nghiệm bao gồm phân lập vi rút từ nuôi cấy tế bào, xét nghiệm kháng thể trong huyết thanh, phát hiện axit nucleic bằng RT-PCR. Việc phân tích nuôi cấy tế bào và dựa trên huyết thanh thường tốn nhiều thời gian và phức tạp, do đó cả hai phương pháp đều không phù hợp để chẩn đoán khẩn cấp ở giai đoạn sớm của bệnh TCM. Mặc dù RT-PCR là một trong những hệ thống sẵn có và nhanh nhất hiện nay, nhưng cần (6 - 7) giờ để có kết quả, khó đáp ứng nhu cầu chẩn đoán cấp cứu. Do đó, việc phát hiện sớm và chẩn đoán nhanh có ý nghĩa hết sức quan trọng đối với việc phòng ngừa, điều trị bệnh, đặc biệt là ở các nước đang phát triển.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát triển một RT-LAMP, trong đó, ba cặp mồi có thể xác định và bổ sung cho tám vùng riêng biệt của trình tự đích. Hơn nữa, với hoạt động kết hợp của enzyme sao chép ngược và Bst DNA polymerase, trình tự RNA mục tiêu sau đó có thể được khuếch đại đẳng nhiệt trong 1 giờ. Việc phát hiện EV71 và CVA16 từ các mẫu lâm sàng với RT-LAMP cho thấy phương pháp này có độ đặc hiệu cao, nhạy và hiệu quả, đồng thời giảm thiểu sự lây nhiễm chéo do hoạt động một bước của nó.

Quy trình LAMP được tối ưu có khả năng phát hiện trình tự mục tiêu của EV71 và CA16 với giới hạn phát hiện 1 fg đối với EV71 và 10 fg đối với CA16, phản ứng được thực hiện tại một nhiệt độ cố định 60°C trong thời gian 35 phút. Do đó, phương pháp RT-LAMP dường như là một phương pháp đầy hứa hẹn có thể được áp dụng rộng rãi trong phát hiện thường quy trên lâm sàng.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, đề tài mã số 2020.01.010 /HĐ-NCKH.

Tài liệu tham khảo

1. Zhang, Y. *et al.* An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China. *J Clin Virol* 44, 262-267 (2009).
2. Ang, L. W. *et al.* Epidemiology and control of hand, foot and mouth disease in Singapore, 2001-2007. *Ann Acad Med Singap* 38, 106-112 (2009).
3. Li, L. *et al.* Genetic characteristics of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China. *J Clin Microbiol* 43, 3835-3839 (2005).
4. Nie, K. *et al.* Evaluation of a Direct Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method without RNA Extraction for the Detection of Human Enterovirus 71 Subgenotype C4 in Nasopharyngeal Swab Specimens. *PLOS ONE* 7, e52486 (2012).
5. Development of an IgM-capture ELISA for Coxsackievirus A16 infection. - Abstract - Europe PMC. <https://europepmc.org/article/med/20970457>.
6. Xu, F. *et al.* Performance of Detecting IgM Antibodies against Enterovirus 71 for Early Diagnosis. *PLOS ONE* 5, e11388 (2010).
7. Notomi, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28, e63-e63 (2000).
8. Parida, M. *et al.* Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol* 43, 2895-2903 (2005).
9. Liu, Y., Chuang, C.-K. & Chen, W.-J. In situ reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (in situ RT-LAMP) for detection of Japanese encephalitis viral RNA in host cells. *J Clin Virol* 46, 49-54 (2009).
10. Postel, A. *et al.* Evaluation of two commercial loop-mediated isothermal amplification assays for detection of avian influenza H5 and H7 hemagglutinin genes. *J Vet Diagn Invest* 22, 61-66 (2010).
11. Ma, X.-J. *et al.* Visual detection of pandemic influenza A H1N1 Virus 2009 by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *J Virol Methods* 167, 214-217 (2010).
12. Kurosaki, Y., Grolla, A., Fukuma, A., Feldmann, H. & Yasuda, J. Development and evaluation of a simple assay for Marburg virus detection using a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Microbiol* 48, 2330-2336 (2010).
13. Kurosaki, Y. *et al.* Rapid and simple detection of Ebola virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods* 141, 78-83 (2007).
14. Reddy, A. K., Balne, P. K., Reddy, R. K., Mathai, A. & Kaur, I. Loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of retinitis caused by herpes simplex virus-1. *Clin Microbiol Infect* 17, 210-213 (2011).

Rapid detection of Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 by reverse transcriptase loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP)

Diem Hong Tran^{*}, Huong Thi Thu Phung

Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

*thdiem@ntt.edu.vn

Abstract Hand, foot and mouth disease (HFMD) is caused by many types of human enterovirus, human enterovirus 71 (EV71) and coxsackievirus A16 (CVA16) are the two main etiological agents. HFMD is common in children under 5 years old and EV71 and CVA16 can cause complications such as encephalitis, myositis leading to death. An effective drug or vaccine against EV71 and CVA16 infection is currently not available. For early treatment it is desirable to accurately and quickly determine the pathogen type of HFMD. Current detection methods are mainly based on clinical symptoms, and realtime RT-PCR is the gold standard for diagnosing. Realtime RT-PCR requires complicated, expensive equipment and specialized lab environments. Meanwhile, an isothermal nucleic acid amplification method called RT-LAMP has all the benefits of RT-PCR in terms of sensitivity, specificity but technical ease and low cost. In this study, the optimized RT-LAMP method has been able to detect EV71 and CA16 specific sequences with detection limit of 1 fg for EV71 and 10 fg for CA16. The reaction is performed at a single temperature 60 °C for 35 minutes; with the visible results can be determined by means of the reaction's colour, indicating that the method is highly suitable for point-of-care detection.

Keywords EV71, CA16, RT-LAMP, isothermal