

Phát hiện nhanh vi rút gây bệnh dịch tả lợn cổ điển bằng phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt trung gian vòng lặp

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

Dịch tả lợn cổ điển là một trong những bệnh truyền nhiễm quan trọng nhất gây ra bởi vi rút ở lợn, với những đặc trưng: lây lan mạnh, sốt cao, tỉ lệ lợn ốm và chết trong vùng dịch cao. Vì vậy, việc phát hiện nhanh và chính xác bệnh là nhiệm vụ quan trọng, có vai trò quyết định trong việc kiểm soát dịch bệnh. Trong nghiên cứu này, phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt trung gian vòng được sử dụng để phát hiện trình tự đặc trưng tại gen *RdRp* của CSFV. Quy trình khuếch đại đẳng nhiệt trung gian vòng lặp được tối ưu trong nghiên cứu có khả năng phát hiện trình tự mục tiêu dịch tả lợn cổ điển với giới hạn phát hiện $10^{-0.5}$ TCID₅₀/mL, phản ứng được thực hiện tại một nhiệt độ cố định (63 °C) trong thời gian 35 phút. Đồng thời, phương pháp có thể phát hiện đối với trình tự mục tiêu tách chiết từ các mẫu huyết thanh và có thể đọc kết quả nhanh bằng mắt thường thông qua màu sắc của phản ứng, điều này cho thấy khả năng ứng dụng cao của phương pháp đối với phát hiện nhanh bệnh tại chỗ.

Nhận 07/05/2023
Được duyệt 06/06/2023
Công bố 31/07/2023

Từ khóa
Từ khóa
RT-LAMP,
tả lợn cổ điển, CSFV,
màu sắc, *RdRp*

© 2023 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Dịch tả lợn cổ điển (classical swine fever – CSF), còn được gọi là dịch tả lợn, là bệnh truyền nhiễm với tỉ lệ tử vong cao ở đàn lợn [1], bệnh gây ra bởi vi rút sốt lợn cổ điển là một loại vi rút RNA sợi dương có vỏ bọc, bộ gen 12,3 kb, thuộc chi Pestivirus, trong họ Flaviviridae [1]. Trong một số trường hợp, tỉ lệ tử vong ở lợn con có thể lên tới 100 % và tử vong thường xảy ra từ ngày thứ năm 5 đến ngày thứ 25 sau khi bị nhiễm. Tại Việt Nam, trường hợp mắc bệnh CSF đầu tiên được báo cáo vào năm 1923-1924 bởi Houdenner [2]. Từ năm 2012-2016, dịch xảy ra trên cả nước lên đến (25.000-30.000) ca mắc và tỉ lệ tử vong trong đàn lên đến 90 % [3-4]. Trong thời gian gần đây, các đợt bùng phát CSFV đã được báo cáo vào năm 2018 và chủ yếu ở miền Bắc Việt Nam. Mặc dù các đợt bùng phát CSF không ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe con người nhưng có thể gây thiệt hại kinh tế nặng nề [5]. Hiện nay, chẩn đoán bệnh CSF chủ yếu bằng phương pháp PCR phiên mã ngược thời gian thực (realtime RT-

PCR) với độ nhạy cao so với các kỹ thuật khác như ELISA, xét nghiệm kháng thể huỳnh quang [6]. Tuy nhiên, yêu cầu về kỹ thuật viên phải được đào tạo bài bản và cần dụng cụ chuyên dụng vốn chỉ có ở những nơi có cơ sở vật chất tốt là những hạn chế của phương pháp phát hiện này. Để khắc phục nhược điểm này, một số nhà nghiên cứu đã đưa ra nhiều kỹ thuật khuếch đại khác dựa trên nguyên lý PCR nhưng chỉ yêu cầu một nhiệt độ phản ứng duy nhất. Kể từ khi được giới thiệu, khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng lặp (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification – LAMP) đã trở nên phổ biến rộng rãi vì nó không cần sử dụng máy điều nhiệt cũng như khả năng phát hiện nhanh và độ nhạy cao [7]. Ngoài ra, việc sử dụng bốn đến sáu đoạn mồi, được thiết kế bằng một công cụ chuyên dụng và bổ sung cho sáu vùng khác nhau bên cạnh gen quan tâm, có thể nâng cao tính đặc hiệu của LAMP so với RT-qPCR [7]. Nhiều xét nghiệm LAMP đã được các nhà nghiên cứu thiết lập với nỗ lực phát triển phương pháp phát hiện CSFV nhanh hơn và dễ



tiếp cận hơn tại hiện trường, trong đó có các nghiên cứu đã thành công phát hiện CSFV bằng RT-LAMP trong thời gian 50 phút với độ nhạy 94,7 % [8] cũng như nghiên cứu phát hiện CSFV kết hợp giữa RT-LAMP và que thử đọc kết quả trực tiếp bằng mắt thường [9].

Nguyên lí của LAMP bao gồm hai giai đoạn: giai đoạn tạo mạch vòng và giai đoạn khuếch đại. Trong giai đoạn tạo mạch vòng, các đoạn mồi bên trong được thiết kế để bổ sung cho một chuỗi của vùng khuếch đại ở đầu 3' và giống với vùng bên trong của cùng chuỗi ở đầu 5' [7]. Sau đó, các đoạn mồi phía trước bên ngoài liên kết với trình tự để kéo dài và do đó thay thế đoạn mồi bên trong. Các quá trình lặp đi lặp lại này dẫn đến kết quả là cấu trúc vòng ở 2 đầu của chuỗi mới được tổng hợp gọi là cấu trúc vòng lặp [7]. Ở giai đoạn này, quá trình khuếch đại xảy ra và cả hai mồi nói trên có thể được sử dụng để tạo ra nhiều sản phẩm hơn, đồng thời, mỗi vòng có thể được sử dụng để tăng cường khuếch đại sản phẩm [7]. Ưu điểm đầu tiên của LAMP là chỉ cần một loại enzyme duy nhất và thứ hai là quá trình khuếch đại có thể được thực hiện ở nhiệt độ không đổi [10]. Những khác biệt này làm giảm thời gian cần thiết cho phản ứng và đơn giản hóa quy trình so với các phương pháp khác [10]. Bên cạnh đó, kết quả của LAMP có khả năng quan sát bằng mắt thường thông qua màu sắc sản

phẩm dưới nhiều loại chất nhuộm khác nhau [10]. Với tất cả những ưu điểm đã nêu, mục đích của nghiên cứu này là áp dụng phương pháp RT-LAMP để phát hiện CSFV, với sự hiện diện của chất chỉ thị pH, kết quả phản ứng có thể được quan sát bằng mắt thường.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Thiết kế mồi RT-LAMP đặc trưng cho CSFV

Ba mươi trình tự bộ gen CSFV được thu nhận từ GenBank và tiến hành xếp giống cột, phân tích trình tự gen đặc trưng và bảo tồn cho CSFV bằng phần mềm Geneious Prime. Theo kết quả phân tích và các nghiên cứu trước đó, vùng trình tự gen *RdRp* được lựa chọn làm trình tự mục tiêu trong nghiên cứu này do tính ổn định và tính đặc hiệu của gen này. Bộ mồi LAMP được thiết kế bằng chương trình PrimerExplorerV5 dựa trên trình tự CSFV VN91 đã được công bố tại Việt Nam (GenBank No. LC374604.1). Bộ 6 mồi của phản ứng bao gồm F3, B3, FIP, BIP, LoopF và LoopR được kiểm tra các thông số bằng PCR insilico từ phần mềm FastPCR. Trình tự mồi được thiết kế đặc hiệu và trình tự mục tiêu dạng tổng hợp (Bảng 1) được tổng hợp bởi Công ty Phù Sa Genomics và được sử dụng cho toàn bộ nghiên cứu này.

Bảng 1 Trình tự mồi được sử dụng trong nghiên cứu

Tên	Trình tự 5'-3'
CSF_F3_2	CGAAGAGATTATTGACAATCTGAA
CSF_B3_2	CCGGGTATAACTACTGGCT
CSF_FIP_2	TCATTGACGTCCCTCTTCTCA-GCAGAAACATCAAATACTATGAAAC
CSF_BIP_2	CTGGTGACTTCGTGGATGAGAAG-CATCACCTTGGTGATGGC
CSF_LF_2	TTCTTTGGGATCGCG
CSF_LB_2	CCAGAGTCATACAATACCCTGAA

2.2 Mẫu vi khuẩn và vi rút

Nghiên cứu này sử dụng các chủng vi sinh vật trong Bảng 2 được cung cấp từ Học viện Nông nghiệp Việt Nam và phân lập từ Phòng Thí nghiệm Vi sinh, Viện Kỹ thuật Công nghệ cao Nguyễn Tất Thành. Trong đó, các mẫu vi rút được nuôi cấy, tách chiết bằng kit tách

chiết RNA-QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, USA) và được định lượng bằng phương pháp RT-qPCR. Với mẫu vi khuẩn, vi khuẩn được nuôi cấy và tách chiết bằng phương pháp CTAB. Mẫu DNA/RNA được lưu trữ tại nhiệt độ -80 °C để sử dụng cho nghiên cứu.

Bảng 2 Chủng vi khuẩn và vi rút dùng trong nghiên cứu

STT	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
CSFV	RNA	Học viện Nông nghiệp Việt Nam	10
Vi rut tả lợn châu Phi (ASFV)	RNA	Học viện Nông nghiệp Việt Nam	1
Vi rut tả lợn cổ điển (CSFV)	RNA	Học viện Nông nghiệp Việt Nam	1
Vi rut tiêu chảy cấp ở lợn (PEDV)	RNA	Học viện Nông nghiệp Việt Nam	1
Vi rut viêm dạ dày truyền nhiễm trên lợn (TGEV)	RNA	Học viện Nông nghiệp Việt Nam	1

2.3 Thiết lập phản ứng RT-LAMP

Phản ứng RT-LAMP có thể tích 15 μ L bao gồm 0,3 μ M mỗi mỗi F3, B3; 2,4 μ M mỗi mỗi FIP, BIP; 0,6 μ M mỗi mỗi LoopF, LoopR, 5 μ L mẫu; 7,5 μ L WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (NEB, UK). Phản ứng được thực hiện trong máy ổn nhiệt khô Biosan Bio TDB-100. Kết quả phản ứng được quan sát bằng sự thay đổi màu sắc phản ứng và thuốc nhuộm huỳnh quang SYBR I (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.4 Tối ưu điều kiện cho phản ứng RT-LAMP

Việc xác định thời gian phản ứng được thực hiện với các phản ứng các RT-LAMP có thể tích 15 μ L bao gồm 10⁴ TCID₅₀/mL mạch khuôn PRRSV, 7,5 μ L LAMP mastermix, mỗi và nước sinh học phân tử được ủ từ (5-55) phút với khoảng cách 5 phút giữa mỗi lần ủ cho mỗi phản ứng trong 60 phút. Thời gian tối ưu phản ứng sẽ dùng cho bước khảo sát nhiệt độ phản ứng. Theo đó, các phản ứng được đặt tại nhiệt độ (56-67) °C, cách nhau 1 °C, trong thời gian 60 phút. Kết quả khảo sát được ghi nhận bằng màu sắc phản ứng và nhuộm huỳnh quang.

2.5 Khảo sát giới hạn phát hiện và tính đặc hiệu của phản ứng RT-LAMP

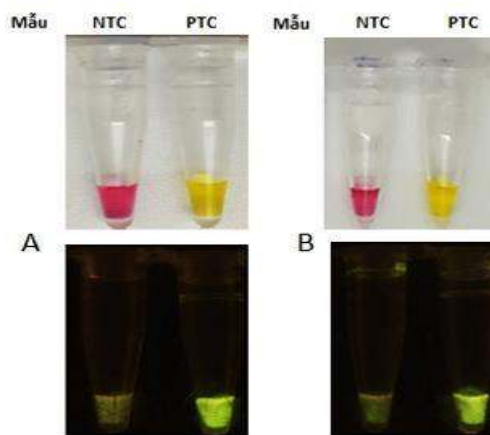
Mẫu RNA được tách chiết có nồng độ 10^{5.5} TCID₅₀/mL được pha loãng theo bậc 10 về các nồng độ cuối cùng (10^{4.5}-10⁰) TCID₅₀/mL và tiến hành thực hiện phản ứng với các điều kiện tối ưu. Tính đặc hiệu của bộ mỗi được khảo sát bằng phản ứng RT-LAMP đã được tối ưu với các chủng vi rut gây bệnh trên lợn gần gũi với CSFV, cùng với các loại vi khuẩn thường xuất hiện trong môi trường chuồng trại (Bảng 2). Sản phẩm được phân tích bằng màu sắc sau phản ứng và nhuộm SYBR I.

3 Kết quả

3.1 Kết quả kiểm tra mỗi và các thành phần phản ứng RT-LAMP

Bộ mỗi RT-LAMP được thiết kế đặc hiệu cho CSFV và các thành phần phản ứng được kiểm tra bằng phản ứng RT-LAMP với mạch khuôn dạng tổng hợp và RNA bộ gen CSFV đã được tinh sạch. Theo đó, phản ứng

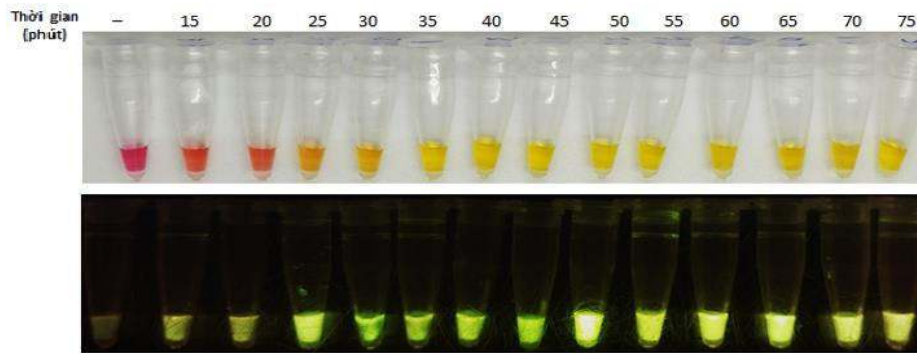
được ủ tại nhiệt độ 65 °C trong 45 phút, phản ứng được thực hiện với mạch khuôn DNA dạng tổng hợp (Hình 1A), mạch khuôn RNA (Hình 1B) và kết quả được quan sát bằng màu sắc và thuốc nhuộm SYBR I. Kết quả tại Hình 1 cho thấy, các phản ứng chứng dương chứa trình tự *RdRp* dạng tổng hợp hoặc RNA CSFV tinh sạch đều cho kết quả dương tính với sự thay đổi màu sắc từ hồng sang vàng, đồng thời các phản ứng âm giữ nguyên màu hồng ban đầu. Phương pháp quan sát bằng huỳnh quang cho kết quả tương tự với phản ứng chứng dương phát sáng dưới ánh sáng 460 nm trong khi đó phản ứng chứng âm chỉ thể hiện tính hiệu nền. Điều này chứng minh rằng, bộ mỗi RT-LAMP được thiết kế có khả năng khuếch đại trình tự mục tiêu, các thành phần phản ứng phù hợp và được sử dụng cho các phản ứng tiếp theo.



Hình 1 Kết quả kiểm tra mỗi RT-LAMP thiết kế đặc trưng cho CSFV.

3.2 Kết quả tối ưu nhiệt độ và thời gian phản ứng

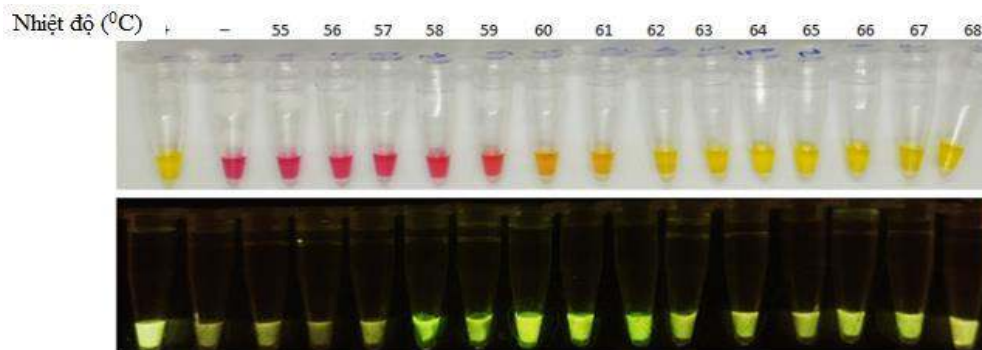
Sự tối ưu thời gian cho RT-LAMP được thực hiện với khoảng thời gian (15-75) phút phản ứng với các mốc thời gian cách nhau 5 phút. Kết quả khảo sát được thể hiện tại Hình 2 cho thấy, phản ứng có kết quả rõ nét về sự thay đổi màu sắc phản ứng và sự phát tín hiệu huỳnh quang của SYBR I sau thời gian (35-75) phút phản ứng. Vì thế, thời gian 35 phút được lựa chọn làm thời gian phản ứng tối ưu cho phản ứng RT-LAMP phát hiện CSFV trong nghiên cứu này.



Hình 2 Kết quả khảo sát thời gian phản ứng RT-LAMP.

Sự tối ưu nhiệt độ phản ứng được khảo sát trong khoảng nhiệt độ (55-68) °C, với các mốc nhiệt độ tăng dần 1 °C, tất cả các phản ứng được ủ trong thời gian 35 phút đã tối ưu trước đó. Kết quả tại Hình 3 cho thấy, sau 35 phút phản ứng, phản ứng cho tín hiệu huỳnh quang từ nhiệt độ 58 °C. Tuy nhiên, từ mốc nhiệt độ (60-68) °C,

kết quả phản ứng có thể quan sát trực tiếp bằng màu sắc phản ứng, trong khi đó tại nhiệt độ 63 °C, phản ứng cho kết quả rõ nét nhất về màu sắc, vì thế 63 °C được lựa chọn là nhiệt độ tối ưu và sử dụng cho các phản ứng khảo sát tiếp theo.

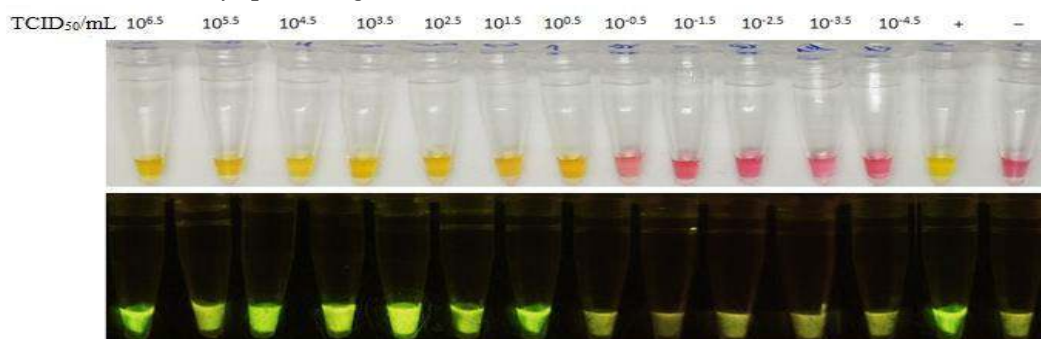


Hình 3 Kết quả khảo sát nhiệt độ tối ưu cho phản ứng RT-LAMP.

3.3 Giới hạn phát hiện của phản ứng RT-LAMP với RNA của CSFV đã được tinh sạch

Giới hạn phát hiện của phương pháp RT-LAMP được khảo sát từ khoảng nồng độ RNA ($10^{4.5}$ - 10^0) TCID₅₀/mL được tách chiết từ mẫu vi rút CSFV. Phản ứng được thực hiện trong nhiệt độ và thời gian được tối ưu trước đó. Kết quả tại Hình 4 cho thấy, phản ứng RT-LAMP

tối ưu có thể phát hiện mẫu RNA có nồng độ thấp nhất là $10^{0.5}$ TCID₅₀/mL, kết quả tương đồng khi quan sát bằng cả màu sắc và thuốc nhuộm SYBR I. Điều này thể hiện ưu thế của phản ứng trong việc phát hiện các mẫu RNA bệnh phẩm có nồng độ thấp với các cá thể nhiễm đang trong thời gian ủ bệnh.

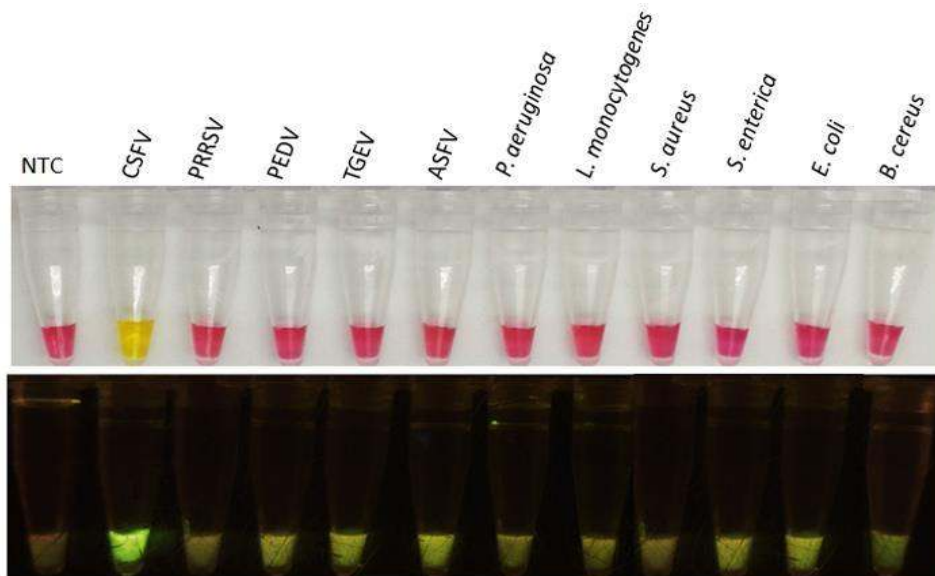


Hình 4 Kết quả khảo sát giới hạn phát hiện của phương pháp RT-LAMP đối với RNA bộ gen của CSFV.

3.4 Tính đặc hiệu của bộ mồi RT-LAMP

Trong nghiên cứu này, 10 chủng vi khuẩn và vi rút khác nhau được sử dụng cho phản ứng khảo sát tính đặc hiệu của bộ mồi RT-LAMP đã được thiết kế đặc trưng cho gen *RdRp* và sử dụng cho toàn bộ nghiên cứu. Trong đó có 4 mẫu RNA/DNA từ vi rút cùng gây bệnh trên lợn với các triệu chứng tương tự như bệnh tả lợn cổ

điển gây ra bởi CSFV và 6 mẫu DNA vi khuẩn rất phổ biến trong môi trường chuồng trại. Kết quả cho thấy, phản ứng RT-LAMP với bộ mồi thiết kế chỉ khuếch đại khi RNA mục tiêu CSFV có trong phản ứng (Hình 5). Vì vậy, bộ mồi lựa chọn thực hiện phương pháp RT-LAMP đã được tối ưu trong nghiên cứu này có tính chuyên biệt cao cho CSFV.

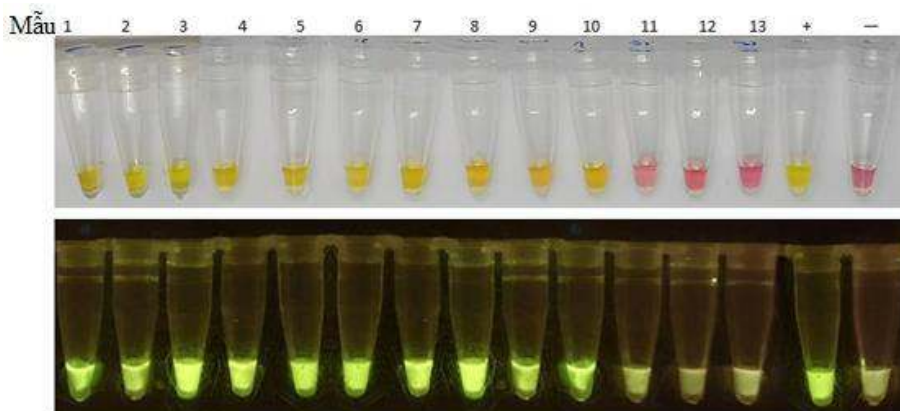


Hình 5 Kết quả khảo sát tính đặc hiệu của bộ mồi được thiết kế.

3.6 RT-LAMP với mẫu RNA tách chiết từ mẫu bệnh phẩm

Để khảo sát khả năng hoạt động của quy trình RT-LAMP đã tối ưu, trong nghiên cứu này 13 mẫu RNA tách chiết từ 13 mẫu bệnh phẩm khác nhau đã được dùng để khảo sát. Theo đó các mẫu bệnh phẩm được thu nhận, tách chiết RNA và tiến hành phân tích kiểm chứng bằng RT-qPCR, kết quả cho thấy có 10 mẫu dương tính với các nồng độ CSFV khác nhau (Hình 6, mẫu 1 đến mẫu 10) và 3 mẫu âm tính với CSFV (Hình 6, mẫu 11 đến mẫu 13). Sau đó, 13 mẫu RNA này được

dùng làm mạch khuôn cho RT-LAMP. Kết quả của phản ứng RT-LAMP đã được tối ưu trong nghiên cứu cho thấy khả năng phát hiện RNA bộ gen của CSFV trên 10 mẫu RNA có nồng độ khác nhau, trong khi đó 3 mẫu huyết thanh còn lại không chứa vi rút cho kết quả âm tính. Kết quả đồng nhất giữa màu sắc và soi thuốc nhuộm huỳnh quang. Điều này cho thấy tính ứng dụng cao của phương pháp RT-LAMP đã được tối ưu trong nghiên cứu này và có khả năng ứng dụng cao đối với mẫu bệnh phẩm, vốn có nhiều cách biệt về nồng độ.



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

4 Kết luận

Bệnh tả lợn cổ điển vẫn luôn là một trong những bệnh phổ biến trên lợn, bệnh có thể xuất hiện, lây lan nhanh chóng, gây chết hàng loạt cá thể lợn và làm tổn thất đáng kể cho ngành chăn nuôi [11]. Các phương pháp phát hiện bệnh này phụ thuộc vào các dấu hiệu lâm sàng và phương pháp sinh học phân tử như RT-qPCR [6]. Trong khi các triệu chứng lâm sàng của bệnh tả lợn cổ điển thường dễ bị nhầm lẫn với các bệnh khác cùng xuất hiện trên lợn thì RT-qPCR lại đòi hỏi thiết bị chuyên dụng và đắt tiền [6]. Vì thế, quy trình RT-LAMP đã được thực hiện và tối ưu cho việc phát hiện CSFV. Theo đó, bộ 6 môi RT-LAMP đặc hiệu cho CSFV được thiết kế và khảo sát, RT-LAMP có thể phát hiện thành công RNA của CSFV trong thời gian 35 phút tại nhiệt độ 63 °C. Kết quả của phản ứng có thể

quan sát trực tiếp bằng mắt thường qua màu sắc phản ứng với giới hạn phát hiện thấp nhất tại $10^{0.5}$ TCID₅₀/mL, có giá trị ngang bằng với các kit RT-PCR phát hiện CSFV trên thị trường. Đồng thời, bộ môi RT-LAMP đã sử dụng có tính chuyên biệt cao với các loại vi rút gần gũi với CSFV và các vi khuẩn phổ biến hiện diện trong môi trường.

Tóm lại, RT-LAMP là một phương pháp đơn giản, nhạy và chính xác cho việc phát hiện CSFV, phương pháp này không yêu cầu thiết bị đắt tiền và có khả năng ứng dụng cho cho việc phát triển các quy trình phát hiện bệnh tại chỗ, ngay khu vực chuồng trại.

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 2022.01.132/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

- Blome S., Staubach C., Henke J., et al. (2017). Classical Swine Fever - An Updated Review. *Viruses*, 9(4), 86.
- Đào Trọng Đạt, Nguyễn Tiến Dũng. (1985). Về tình hình dịch tễ của bệnh dịch tả lợn cổ điển ở Việt Nam và vấn đề phòng chống bệnh. *Tuyển tập các công trình nghiên cứu khoa học và kỹ thuật nông nghiệp – Phần Chăn nuôi - Thú y*.
- Nghiên cứu dịch tễ học bệnh dịch tả lợn cổ điển (classical swine fever) ở lợn tại miền Bắc Việt Nam. (2019). <<https://123docz.net/document/5721364-nghien-cuu-dich-te-hoc-benh-dich-ta-lon-co-dien-classical-swine-fever-o-lon-tai-mien-bac-viet-nam-giai-doan-2014-2017-tt.htm>>, accessed: 04/19/2023.
- Luận án Tiến sĩ của Nguyễn Phục Hưng. (2014). Nghiên cứu dịch tễ học bệnh dịch tả lợn cổ điển (Classical Swine Fever) ở lợn tại miền Bắc Việt Nam. Thư viện luận văn, <<http://luanvan123.info/threads/nghien-cuu-dich-te-hoc-benh-dich-ta-lon-co-dien-classical-swine-fever-o-lon-tai-mien-bac-viet-nam.123429/>>, accessed: 04/19/2023.
- Classical swine fever. WOAHP - World Organisation for Animal Health. (2023). <<https://www.woah.org/en/disease/classical-swine-fever/>>, accessed: 03/09/2023.
- Greiser-Wilke I., Blome S., and Moennig V. (2007). Diagnostic methods for detection of Classical swine fever virus-Status quo and new developments. *Vaccine*, 25(30), 5524-5530.
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., et al. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28(12), E63.
- Yin S., Shang Y., Zhou G., et al. (2010). Development and evaluation of rapid detection of classical swine fever virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Biotechnology*, 146(4), 147-150.
- JunLing Z., ZuoDong Y., JieRu D., et al. (2016). Rapid detection of classical swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick method. *Journal of South China Agricultural University*, 37(1), 1-7.
- Becherer L., Borst N., Bakheit M., et al. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – Review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal Methods*, 12(6), 717-746.
- Edwards S., Fukusho A., Lefèvre P.-C., et al. (2000). Classical swine fever: the global situation. *Veterinary Microbiology*, 73(2), 103-119.

Rapid detection of classical swine fever virus (CSFV) by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification method (RT-LAMP)

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 Classic swine fever (CSF) is one of the most serious infectious diseases in pigs, caused by CSFV virus, and has the following characteristics: widespread spread, high fever, and a high swine sickness and death rate in the area. As a result, rapid and accurate disease detection is a crucial challenge in disease control. The RT-LAMP – an isothermal amplification method was used in this study to detect the specific sequence at the CSFV *RdRp* gene. The optimized RT-LAMP procedure in this study could detect the CSFV target sequence with a detection limit of $10^{-0.5}$ TCID₅₀/mL; the reaction was performed at a constant temperature (63 °C) for 35 minutes. The naked eye could quickly read the results through the color of the reaction, which indicates that this method has a high applicability for the rapid detection of diseases at the point-of-care setting.

Keywords RT-LAMP, CSF, CSFV, colorimetric, *RdRp*