

# PHÁT HIỆN NHANH VIRUS DENGUE DỰA TRÊN KỸ THUẬT REVERSE TRANSCRIPTION-LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (RT-LAMP)

Trương Quốc Phong<sup>1, \*</sup>, Lâm Tú Quỳnh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, Số 1, Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội

<sup>2</sup>Viện Pasteur Nha Trang, Số 8-10, Trần Phú, Nha Trang, Khánh Hòa

\*Email: [phong.truongquoc@hust.edu.vn](mailto:phong.truongquoc@hust.edu.vn)

Đến Toàn soạn: 28/11/2012; Chấp nhận đăng: 3/6/2013

## TÓM TẮT

Phương pháp RT-LAMP đã được thiết lập để phát hiện virus Dengue. Phương pháp này rất đơn giản và nhanh, sản phẩm của phản ứng RT-LAMP có thể được xác định sau 60 phút phản ứng ở một điều kiện nhiệt độ là 61 °C. Một số điều kiện tối ưu cho phản ứng RT-LAMP dùng để khuếch đại RNA virus Dengue đã được xác định như nhiệt độ (61 °C), thời gian phản ứng (60 phút), nồng độ dNTPs (0,4 mM), ion Mg<sup>2+</sup> (6 mM), betaine (0 M). Sản phẩm phản ứng RT-LAMP có thể được xác định nhanh và đơn giản bằng cách bổ sung MgSO<sub>4</sub> và ethidium bromide sau đó soi dưới đèn UV. Phản ứng RT-LAMP thiết lập trong nghiên cứu đã được thử nghiệm để phát hiện virus Dengue trực tiếp từ huyết thanh bệnh nhân. Phản ứng chéo với virus sởi và rubella của phương pháp RT-LAMP cũng đã được kiểm tra. Những kết quả này cho thấy rằng phương pháp RT-LAMP có thể được ứng dụng để phát hiện virus Dengue và phù hợp với những cơ sở có trang thiết bị còn hạn chế.

*Từ khóa:* sốt xuất huyết Dengue, virus Dengue, phát hiện nhanh, RT-LAMP.

## 1. MỞ ĐẦU

Sốt Dengue (SD) và các dạng nguy hiểm hơn của nó như sốt xuất huyết Dengue (SXHD) và hội chứng sốc Dengue (HCSD) là bệnh truyền nhiễm cấp tính, do virus Dengue gây nên. Bệnh lan truyền chủ yếu do muỗi *Aedes aegypti* và tập trung nhiều ở các nước Nam Á, Đông Nam Á, Châu Phi, Trung và Nam Mỹ [1]. Theo Tổ chức Y tế thế giới, bệnh sốt xuất huyết Dengue hiện đang lan truyền ở nhiều nước trên thế giới với khoảng 50 - 100 triệu người bị nhiễm virus Dengue và khoảng 500.000 trường hợp bị sốt xuất huyết Dengue phải nhập viện mỗi năm, trong đó chủ yếu là trẻ em. Tỷ lệ tử vong 5 - 10 %, thậm chí cao hơn nếu không được chẩn đoán và điều trị thích hợp [2]. Virus Dengue là một RNA virus thuộc họ *Flaviviridae*. Hệ gen virus Dengue có chứa khoảng 11000 nucleotide, mã hóa cho 3 loại phân tử protein khác nhau (C, prM và E) và các kiểu protein khác như NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5 [3].

Virus Dengue được chia thành 4 typ gồm Dengue typ 1, typ 2, typ 3, typ 4 có khả năng gây bệnh như nhau [4].

Hiện nay có ba phương pháp chủ yếu đang được sử dụng để chẩn đoán virus Dengue đó là phân lập virus Dengue; xác định kháng nguyên, kháng thể đặc hiệu virus Dengue; phân tích nhận diện dựa vào RNA hệ gen [2, 5]. Virus Dengue có thể được phân lập từ huyết thanh, tế bào máu ngoại vi trong vòng 2-7 ngày có biểu hiện sốt. Đây được coi là “chuẩn vàng” trong chẩn đoán virus Dengue, tuy nhiên, đối với phương pháp phân lập phải mất 7 - 15 ngày mới có thể xác định được kết quả. Phương pháp này thường được sử dụng khi mẫu bệnh phẩm được phân tích âm tính với IgM theo Mac-ELISA. Kháng nguyên NS1 của virus Dengue cũng có thể được xác định dựa vào ELISA. Tuy nhiên, khi sử dụng phương pháp ELISA sẽ xuất hiện phản ứng chéo giữa các flavivirus có quan hệ gần gũi [6]. Các kỹ thuật phân tử (RT-PCR, real-time RT-PCR) cũng được sử dụng để chẩn đoán virus Dengue từ các mẫu huyết thanh. Tuy nhiên, phương pháp RT-PCR có độ nhạy thấp và mất nhiều thời gian. Các phương pháp chẩn đoán phân tử này đòi hỏi các thiết bị chuyên dụng, đắt tiền và phức tạp nên rất khó triển khai ở các cơ sở có trang thiết bị và năng lực cán bộ xét nghiệm còn hạn chế.

Phương pháp LAMP lần đầu tiên được mô tả bởi Notomi [7] và gần đây được phát triển bởi công ty Eiken (Eiken Chemical Co. Ltd). Đây là một phương pháp khuếch đại nucleic acid mới diễn ra ở duy nhất một điều kiện nhiệt độ trong một thời gian ngắn. Sản phẩm của phản ứng có thể quan sát bằng mắt thường. Phương pháp này cũng được đánh giá là có độ nhạy và đặc hiệu rất cao do sử dụng bốn môi bắt cặp ở sáu vị trí trên DNA đích. Phương pháp LAMP đơn giản, tiết kiệm thời gian, sử dụng thiết bị đơn giản nên đã được ứng dụng để xác định nhiều loại virus, vi khuẩn và có thể trở thành một công cụ có giá trị cho việc chẩn đoán nhanh các bệnh truyền nhiễm [8-13]. RT-LAMP là phương pháp hoàn toàn dựa trên nguyên lý của LAMP nhưng sử dụng khuôn là RNA với sự tham gia của enzyme phiên mã ngược

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát triển và đánh giá phương pháp RT-LAMP cho việc nhận diện virus Dengue, hướng tới phát triển thành bộ kit dùng cho chẩn đoán nhanh virus Dengue từ các mẫu bệnh phẩm.

## **2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu**

Mẫu vật được cung cấp bởi Phòng khám Đa khoa Tín Đức, Nha Trang, Khánh Hòa. Mẫu RNA virus Sởi, Rubella được cung cấp bởi TS. Nguyễn Hạnh Phúc, Công ty VNBiolabs.

Hóa chất dùng cho phản ứng RT-LAMP và điện di của các hãng như: Sigma, Merck, New England Biolabs (NEB), Fermentas,... Enzyme AMV reverse transcriptase, Bst DNA polymerase được mua của hãng New England Biolabs, Mỹ. Kit tách chiết RNA virus của Quiagen, Mỹ.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

#### *2.2.1. Phương pháp tách chiết RNA virus*

RNA hệ gen virus được tách chiết từ huyết thanh sử dụng bộ kit QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, Mỹ). Quy trình tách chiết được thực hiện theo mô tả của nhà sản xuất [14]. Mẫu RNA được giữ ở - 80 °C.

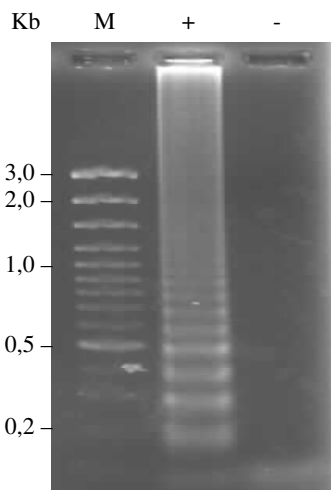
### 2.2.2. Phản ứng RT-LAMP

Hỗn hợp phản ứng chứa 40 pmol mỗi loại mỗi trong FIP, BIP; 5 pmol mỗi loại mỗi ngoài F3 và B3; 20 pmol mỗi loại mỗi vòng FL và BL; 1,0 mM dNTPs; 1,0 M betaine; 1X đệm ThermoPol Reaction Buffer (New England Biolabs, Mỹ); 8,0 U Bst DNA polymerase (NEB); 1,0 U AMV reverse transcriptase (NEB); 8,0 mM MgSO<sub>4</sub> và lượng RNA tổng số phù hợp. Hỗn hợp 25 µl phản ứng RT-LAMP được ủ ở 61 °C trong 60 phút. Phản ứng RT-LAMP sẽ được tối ưu hóa đơn yếu tố theo thứ tự nhiệt độ (59 – 65 °C), thời gian (15 - 60 phút), dNTPs (0,2 - 1,0 M), MgSO<sub>4</sub> (2 - 10 M), betaine (0 - 1 M); các thành phần khác được giữ cố định.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Thiết lập phản ứng RT-LAMP

Thành phần của phản ứng RT-LAMP được thiết lập dựa theo công bố của Notomi [7]. Nồng độ của các yếu tố được thể hiện trong phương pháp nghiên cứu. Phản ứng LAMP là phản ứng khuếch đại DNA tại một điều kiện nhiệt độ và nhiệt độ này phụ thuộc vào enzyme và môi. Enzyme Bst DNA polymerase là một enzyme hoạt động tốt trong khoảng nhiệt độ 60 – 65 °C và bị bất hoạt ở nhiệt độ 80 °C. Tuy nhiên, theo tính toán lí thuyết nhiệt độ gần mỗi tối ưu của cặp mỗi là 59,3 – 65,3 °C. Do đó, nhiệt độ ban đầu được lựa chọn cho phản ứng RT-LAMP là 63°C. Phản ứng được thực hiện trong 60 phút. Sản phẩm phản ứng LAMP (5 µl) được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5%. Kết quả cho thấy xuất hiện một dải băng DNA có kích thước phân bố từ khoảng 200 bp đến vị trí tra mẫu (hình 1, giếng +). Đây chính là phổ điện di sản phẩm LAMP đặc trưng [7]. Đối với mẫu không bổ sung RNA khuôn thì không thấy xuất hiện dải băng này trên hình ảnh điện di (hình 1, giếng -). Kết quả thu được chứng tỏ rằng phản ứng RT-LAMP đã được thực hiện thành công.



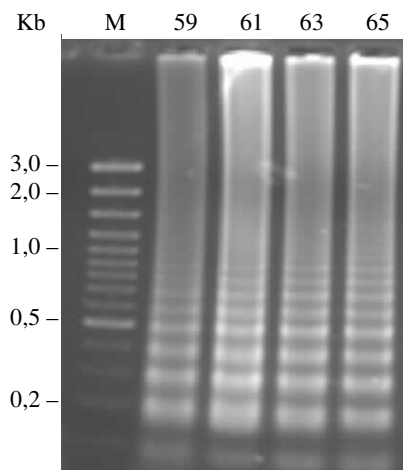
Hình 1. Phổ điện di sản phẩm RT-LAMP (giếng +), đối chứng (giếng -), thang DNA chuẩn 100 bp Fermentas (giếng M).

### 3.2. Tối ưu hóa phản ứng RT-LAMP

Phản ứng RT-LAMP là một phản ứng được thực hiện với sự tham gia của nhiều thành phần khác nhau như khuôn RNA, 6 môi, hai enzyme bao gồm AMV reverse transcriptase và Bst DNA polymerase, betaine,... Mỗi thành phần đều có vai trò quan trọng cho sự thành công của phản ứng. Đối với mỗi đối tượng nghiên cứu, mỗi loại gen đích thì điều kiện phản ứng tối ưu là khác nhau. Ngoài ra, mục đích của nghiên cứu là xác định điều kiện tối ưu và có thể dễ dàng thực hiện trong điều kiện thực tiễn tại các cơ sở có trang thiết bị đơn giản. Các yếu tố có ảnh hưởng lớn đến phản ứng RT-LAMP bao gồm nhiệt độ, thời gian phản ứng, nồng độ dNTPs, nồng độ  $Mg^{2+}$ , nồng độ betaine.

### 3.2.1. Tối ưu hóa nhiệt độ

Không giống như phản ứng PCR, phản ứng RT-LAMP là phản ứng được thực hiện ở một điều kiện nhiệt độ và nhiệt độ này phải đảm bảo phù hợp với nhiệt độ hoạt động của enzyme và nhiệt độ gắn môi. Hơn nữa, trong phản ứng RT-LAMP có sự tham gia đồng thời của hai enzyme là AMV reverse transcriptase và Bst DNA polymerase, do đó nhiệt độ là yếu tố quan trọng đầu tiên được lựa chọn để tối ưu. Enzyme Bst DNA polymerase hoạt động trong dải nhiệt độ 60 – 65 °C. Theo lý thuyết khi phân tích 6 môi LAMP bằng phần mềm FastPCR, cho thấy nhiệt độ gắn môi tối ưu đối với môi trong F3/B3 là 54,6 – 60,6 °C, môi ngoài FIP/BIP là 59,3 – 65,3 °C; môi loop FL/BL là 52,3 – 58,3 °C. Do đó, phản ứng RT-LAMP đã được thực hiện ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau là 59, 61, 63, 65 °C. Kết quả cho thấy sản phẩm RT-LAMP thu được khá tốt ở các nhiệt độ được khảo sát, tuy nhiên ở nhiệt độ 61°C cho thấy xuất hiện các băng DNA đậm nhất. Do đó, 61°C được xác định là nhiệt độ tối ưu cho phản ứng RT-LAMP.

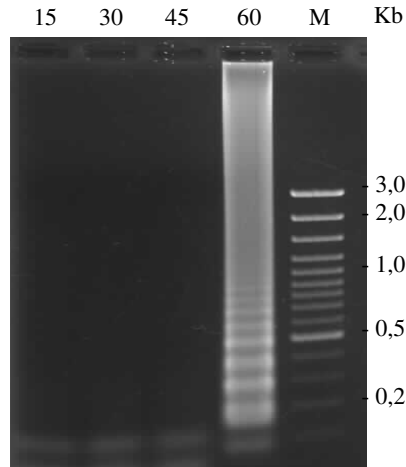


Hình 2. Phổ điện di sản phẩm RT-LAMP ở các nhiệt độ khác nhau 59, 61, 63, và 65 °C; thang DNA chuẩn 100 bp Fermentas (M).

### 3.2.2. Tối ưu hóa thời gian

Đối với một xét nghiệm thì thời gian để đưa ra được kết quả là vấn đề rất quan trọng. Thông thường các phương pháp khuếch đại DNA dùng trong chẩn đoán thường kéo dài 3 - 4 giờ [5]. Với phương pháp LAMP, thời gian phản ứng thường là 1 giờ [7]. Tuy nhiên với mong đợi giảm thiểu thời gian phản ứng nhưng vẫn thu được kết quả rõ ràng nên phản ứng RT-LAMP đã được khảo sát ở những khoảng thời gian 15, 30, 45 và 60 phút. Kết quả cho thấy sản phẩm RT-LAMP không xuất hiện khi phản ứng thực hiện trong 15, 30 và 45 phút, và xuất hiện khá rõ ràng

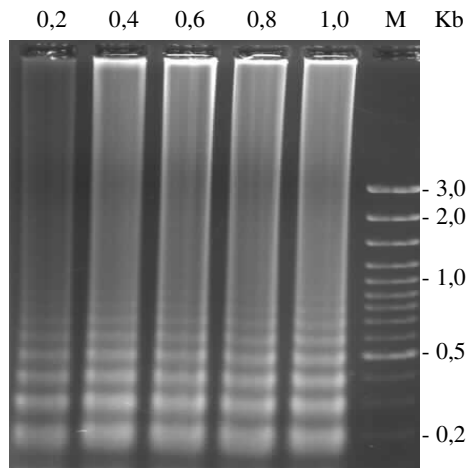
với thời gian phản ứng 60 phút (hình 3). Do mong muốn giảm thiểu thời gian phản ứng nên phản ứng không được nghiên cứu ở các khoảng thời gian dài hơn 60 phút. Phản ứng RT-LAMP sẽ được thực hiện trong 60 phút đối với các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3. Phổ điện di sản phẩm RT-LAMP ở các khoảng thời gian khác nhau 15, 30, 45, và 60 phút ở nhiệt độ tối ưu là 61 °C; thang DNA chuẩn 100 bp Fermentas (M).

### 3.2.3. Tối ưu hóa nồng độ dNTPs

Khác với phản ứng PCR thông thường (nồng độ dNTPs tối ưu 0,2 mM và có thể tăng lên nếu kích thước gen đích lớn), phản ứng LAMP đòi hỏi nồng độ dNTPs cao hơn do lượng sản phẩm LAMP sinh ra là rất lớn. Theo nhiều công bố về LAMP, nồng độ dNTPs thay đổi từ 0,4 – 1,4 mM [7 - 13, 16]. Phản ứng RT-LAMP trong nghiên cứu này được thực hiện ở các nồng độ dNTPs khác nhau 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 mM.



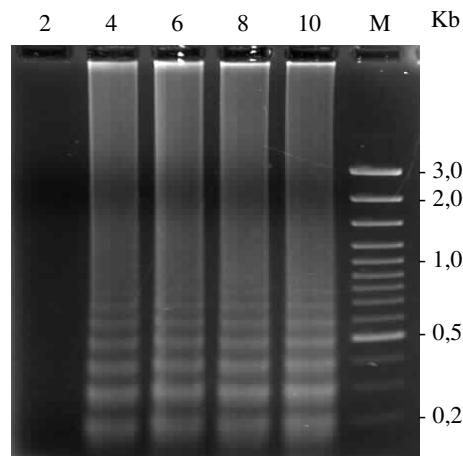
Hình 4. Phổ điện di sản phẩm RT-LAMP ở các nồng độ dNTPs khác nhau 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mM; thang DNA chuẩn 100 bp Fermentas (M).

Kết quả cho thấy với nồng độ thấp nhất (0,2 mM) thì phản ứng RT-LAMP vẫn được thực hiện nhưng sản phẩm sinh ra là ít nhất so với các nồng độ khác (hình 4). Với nồng độ 0,4 mM

sản phẩm phản ứng RT-LAMP xuất hiện rất rõ ràng và tương tự như những phản ứng có nồng độ cao hơn nên nồng độ dNTPs được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo là 0,4 mM.

#### 3.2.4. Tối ưu hóa nồng độ $Mg^{2+}$

Ion  $Mg^{2+}$  là một đồng yếu tố cho DNA polymerase bền nhiệt. Trong phản ứng PCR, ion  $Mg^{2+}$  còn có vai trò làm ổn định DNA sợi đôi và làm tăng giá trị  $T_m$ . Do đó, nồng độ ion  $Mg^{2+}$  đóng vai trò quan trọng về tính đặc hiệu và hiệu suất phản ứng. Thông thường trong phản ứng PCR, nồng độ ion  $Mg^{2+}$  tối ưu là 2,0 mM. Tuy nhiên, ion  $Mg^{2+}$  lại bị bắt giữ bởi dNTPs nên khi thay đổi nồng độ dNTPs đòi hỏi cần phải thay đổi nồng độ  $Mg^{2+}$  cho phù hợp. Trong phản ứng LAMP nhu cầu về dNTPs là lớn hơn so với phản ứng PCR thông thường. Trong nghiên cứu này, nồng độ dNTPs được sử dụng là 0,4 mM, khác so với công bố của Parida [6]. Phản ứng RT-LAMP đã được thực hiện với các nồng độ  $Mg^{2+}$  khác nhau 2, 4, 6, 8, 10 mM. Ở nồng độ 2 mM không thấy xuất hiện sản phẩm phản ứng RT-LAMP (hình 5) và sản phẩm phản ứng RT-LAMP xuất hiện khi tăng nồng độ lên 4 mM và cao hơn. Ở nồng độ 4 mM  $Mg^{2+}$  bắt đầu có xuất hiện sản phẩm tuy nhiên cường độ bằng sản phẩm thấp hơn so với các nồng độ khác. Với nồng độ tăng lên đến 10 mM nhưng hiệu suất phản ứng cũng không tăng lên đáng kể so với 6 mM. Vì vậy, nồng độ  $Mg^{2+}$  là 6 mM đã được lựa chọn.

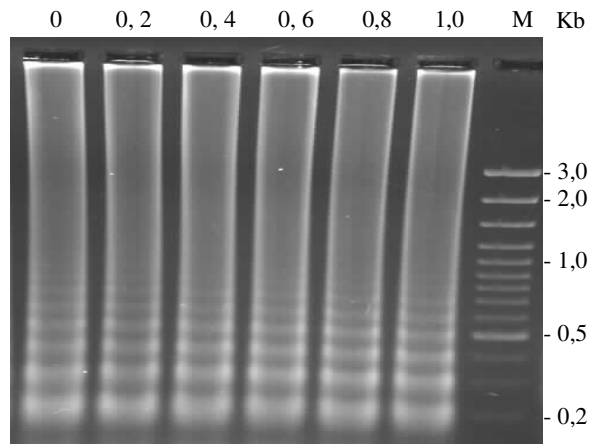


Hình 5. Phổ điện di sản phẩm RT-LAMP ở các nồng độ  $Mg^{2+}$  khác nhau 2, 4, 6, 8, 10 mM; thang DNA chuẩn 100 bp Fermentas (M).

#### 3.2.5. Tối ưu hóa nồng độ betaine

Betaine là một yếu tố có khả năng làm giảm cấu trúc bậc 2 của DNA và tăng cường khả năng tách mạch của các sợi DNA giàu thành phần GC. Do đó, betaine cũng có thể được bổ sung vào phản ứng PCR trong những trường hợp này để tăng hiệu suất và tính đặc hiệu của phản ứng. Trong phản ứng LAMP, betaine thường được bổ sung với nồng độ 0,5 – 1,6 mM. Tuy nhiên, betaine khi sử dụng với nồng độ cao có thể làm giảm hoạt tính của các enzyme DNA polymerase, dẫn đến làm giảm hiệu suất phản ứng. Do đó việc có nên sử dụng betaine hay không là tùy thuộc vào từng gen đích cần khuếch đại nhất định. Để đánh giá xem betaine có thực sự cần thiết trong nghiên cứu của chúng tôi hay không, betaine với nồng độ từ 0 – 1,0 M đã được bổ sung vào phản ứng RT-LAMP. Kết quả cho thấy không có sự khác nhau khi thay đổi nồng độ betaine từ 0 – 1 M (hình 6). Điều đáng chú ý là khi không bổ sung betaine vào phản ứng

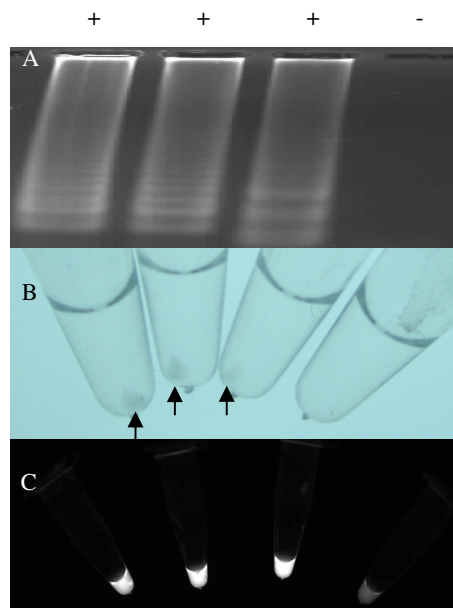
thì phản ứng RT-LAMP vẫn thực hiện bình thường. Kết quả này chỉ ra rằng betaine không cần thiết trong phản ứng RT-LAMP trong nghiên cứu này.



Hình 6. Phổ điện di sản phẩm RT-LAMP ở các nồng độ betaine khác nhau 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 M; thang DNA chuẩn 100 bp plus Fermentas (M).

### 3.3. Phát triển phương pháp xác định sản phẩm phản ứng RT-LAMP

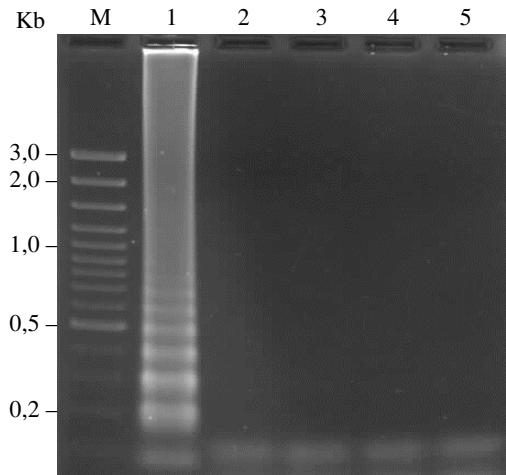
Hiện nay sản phẩm của phản ứng LAMP thông thường được xác định theo các phương pháp như điện di trên gel agarose, quan sát độ đục, quan sát màu bằng mắt thường sau khi bổ sung SYBR Green I hoặc Calcein, quan sát dưới đèn UV sau khi bổ sung ethidium bromide hoặc bán định lượng thông qua hệ thống đo độ đục [13].



Hình 7. Phát hiện sản phẩm RT-LAMP bằng điện di trên gel agarose 1,5 % (A), quan sát kết tủa bằng mắt thường (B), bổ sung  $MgSO_4$  và ethidium bromide (C) dưới đèn UV.

### 3.4. Xác định độ đặc hiệu của phản ứng RT-LAMP

Trong thực tế xét nghiệm, các biểu hiện lâm sàng của sốt do 3 loại virus Dengue, virus sởi hay rubella gây ra ở giai đoạn đầu là tương đối giống nhau, do đó cần phải phân biệt được người có biểu hiện sốt là do tác nhân nào. Trên cơ sở đó phản ứng RT-LAMP đã được kiểm tra phản ứng chéo đối với hai loại virus đó là sởi và rubella. Kết quả chỉ ra rằng phản ứng RT-LAMP hoàn toàn âm tính với hai mẫu virus sởi và hai mẫu virus rubella (hình 8). Điều đó chứng tỏ phản ứng RT-LAMP được thiết lập trong nghiên cứu này hoàn toàn không có phản ứng chéo với virus sởi và rubella.



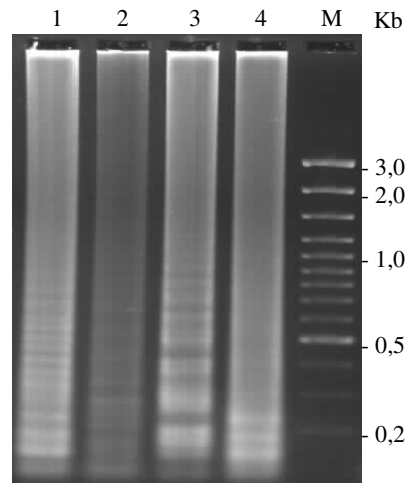
Hình 8. Phổ điện di sản phẩm RT-LAMP sử dụng khuôn RNA virus Dengue (giếng 1), virus sởi (giếng 2, 3) và virus rubella (giếng 4, 5); thang DNA 100 bp Fermentas (giếng M).

### 3.5. Khả năng phát hiện virus Dengue bởi phương pháp RT-LAMP

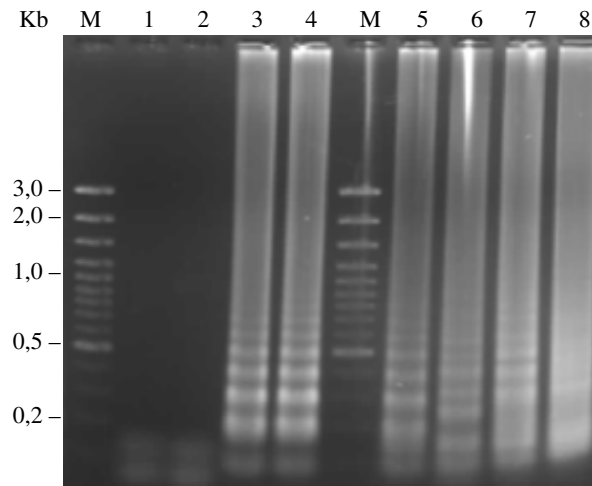
Việc phát triển phương pháp RT-LAMP với mong muốn có thể ứng dụng để phát hiện virus Dengue đối với các bệnh nhân có biểu hiện lâm sàng sốt. Do đó phản ứng RT-LAMP đã được thử nghiệm đối với RNA tổng số được tách chiết từ các mẫu huyết thanh bệnh nhân dương tính với virus Dengue (dương tính với NS1) của 4 typ khác nhau. Kết quả cho thấy RT-LAMP được xây dựng hoàn toàn xác định được virus Dengue từ các dịch huyết thanh thử nghiệm (hình 9).

Tại các cơ sở, việc xác định nồng độ RNA tổng số của dịch chiết từ huyết thanh là tương đối khó khăn vì hạn chế về thiết bị. Do đó, phương pháp RT-LAMP cũng đã được thử với lượng khuôn đưa vào là khác nhau để đưa ra điều kiện ổn định cho xác định sự có mặt của virus Dengue trong mẫu bệnh phẩm. Kết quả cho thấy khi giảm lượng khuôn (0,1  $\mu$ l) thì chỉ xác định được mẫu 3 và 4 (hình 10, giếng 3, 4). Khi tăng lượng mẫu cho vào phản ứng có thể đảm bảo đủ hoặc dư lượng khuôn nhưng cũng có thể làm tăng lượng các chất gây ảnh hưởng đến phản ứng. Khi tăng lượng mẫu lên 3  $\mu$ l, kết quả phản ứng RT-LAMP vẫn thực hiện tốt. Từ các kết quả này cho thấy với quy trình tách chiết RNA từ mẫu huyết thanh theo kit QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, Mỹ) ta có thể sử dụng 3  $\mu$ l mẫu cho phản ứng. Hiện nay phương pháp này mới thực hiện được trên 4 mẫu huyết thanh. Để có thể khẳng định khả năng ứng dụng của phương pháp ngoài thực tế cần khảo sát với số lượng mẫu lớn hơn.





Hình 9. Phổ điện di sản phẩm RT-LAMP với RNA typ 1 (giếng 1), typ 2 (giếng 2), typ 3 (giếng 3) và typ 4 (giếng 4) tách từ huyết thanh.



Hình 10. Phổ điện di sản phẩm RT-LAMP với các thể tích mẫu khác nhau. 0,1  $\mu$ l mẫu (giếng 1-4) và 3  $\mu$ l mẫu (giếng 5-7) của 4 bệnh nhân với 4 typ (1-4) tương ứng.

#### 4. KẾT LUẬN

Với cặp mồi được xác định ở trên, các điều kiện tối ưu cho phản ứng RT-LAMP được xác định: nhiệt độ 61 °C, thời gian phản ứng 60 phút, nồng độ dNTPs 0,4 mM, nồng độ  $Mg^{2+}$  6 M, không cần bổ sung betaine với sự tham gia của 8 U Bst DNA polymerase và 1 U AMV reverse transcriptase.

Phản ứng RT-LAMP được thiết lập là đặc hiệu cho virus Dengue và có thể xác định được cả 4 typ. Phương pháp hoàn toàn có thể sử dụng để phát hiện virus Dengue từ mẫu huyết thanh.

Việc nhận biết sản phẩm RT-LAMP có thể được thực hiện dễ dàng sau khi bổ sung  $MgSO_4$  và ethidium bromide dưới đèn tử ngoại. Với phương pháp nhận biết này cho phép phương pháp RT-LAMP dễ dàng được triển khai ngoài thực tế tại các cơ sở.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. World Health Organization - Report of the meeting of the WHO/VMI Workshop on Dengue modeling, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011, pp. 14.
2. Shu P. Y. and Huang J. H. - Current advances in Dengue diagnosis, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **11** (4) (2004) 642-650.
3. Rodenhuis-Zybert I. A., Wilschut J., and Smit J. M. - Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity, *Cellular and Molecular Life Science* **67** (16) (2010) 2773-2786.
4. Li S., Fang M., Zhou B., Ni H., Shen Q., Zhang H., Han Y., Yin J., Chang W., Xu G., and Cao G. - Simultaneous detection and differentiation of Dengue virus serotypes 1-4, Japanese encephalitis virus, and West Nile virus by a combined reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay, *Virology Journal* **8** (2011) 360.
5. World Health Organization - Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control, New edition, World Health Organization, Geneva, Switzerland (2009) p. 147.
6. Parida M., Horioke K., Ishida H., Dash P. K., Saxena P., Jana A. M., Islam M. A., Inoue S., Hosaka N. and Morita K. - Rapid detection and differentiation of Dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay, *Journal of Clinical Microbiology* **43** (6) (2005) 2895-2903.
7. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., and Hase T. - Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Research* **28** (12) (2000) e63 i-vii.
8. Fujino M., Yoshida N., Yamaguchi S., Hosaka O., Notomi T., and Nakayama T. - A simple method for the detection of measles virus genome by loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *Journal of Medical Virology* **76** (2005) 406-413.
9. Ihira M., Yoshikawa T., Enomoto Y., Akimoto S., Ohashi M., Suga S., Nishimura N., Ozaki T., Nishiyama Y., Notomi T., Ohta Y., Asano Y. - Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification, *Journal of Clinical Microbiology* **42** (2004) 140-145.
10. Iwamoto T., Sonobe T., Hayashi K. - Loopmediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples, *Journal of Clinical Microbiology* **41** (2003) 2616-2622.
11. Kuboki N., Inoue N., Sakurai T., Cello F. D., Grab D. J., Suzuki H., Sugimoto C., and Igarashi I. - Loopmediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes, *Journal of Clinical Microbiology* **41** (2003) 5517-5524.
12. Maruyama F., Kenzaka T., Yamaguchi N., Tani K., Nasu M., - Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loopmediated isothermal amplification, *Applied Environmental Microbiology* **69** (2003) 5023-5028.
13. Osawa R., Yoshida A., Masakiyo Y., Nagashima S., Ansai T., Watari T., Notomi T., Takehara T. - Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using a loop-mediated isothermal amplification method, *Oral Microbiology Immunology* **22** (2007) 252-259.

14. Quiagen - QIAamp Viral RNA Mini Handbook, Forest Stewardship Council, USA, 2010, p. 43.
15. Mori Y., Nagamine K., Tomita N., and Notomi T. - Detection of Loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **289** (2001) 150-154.
16. Tomita N., Mori Y., Kand H. and Notomi T. - Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products, *Nature protocols* **3** (5) (2008) 877-882.

### ABSTRACT

#### RAPID DETECTION OF DENGUE VIRUS BY REVERSE TRANSCRIPTION LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (RT-LAMP)

Truong Quoc Phong<sup>1, \*</sup>, Lam Tu Quynh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*School of Biotechnology and Food Technology, Hanoi University of Science and Technology, No.1, Dai Co Viet, Ha Ba Trung, Hanoi*

<sup>2</sup>*Institute Pasteur in Nha Trang, No. 8-10, Tran Phu, Nha Trang, Khanh Hoa*

\*Email: [phong.truongquoc@hust.edu.vn](mailto:phong.truongquoc@hust.edu.vn)

Reverse transcription Loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for detection of Dengue virus was established. This assay is very simple and rapid. RT-LAMP products could be detected after 60 min incubation under isothermal condition at 61 °C. Some optimal conditions for amplification of Dengue virus RNA by the RT-LAMP assay were determined including temperature (61 °C), reaction time (60 min), dNTPs (0.4 mM), Mg<sup>2+</sup> (6 mM), betaine (0 M). RT-LAMP product can be visualized under UV light after adding MgSO<sub>4</sub> and ethidium bromide dye. The established RT-LAMP assay was tested for detection of Dengue virus in patient serum samples. The crossing-reaction with measles and rubella viruses was investigated. These findings indicate that the RT-LAMP assay has the potential application for rapid detection of Dengue virus from patient serum and suitable for laboratories with simple equipments.

*Keywords:* dengue hemoharrgic fever, Dengue virus, rapid detection, RT-LAMP.