

# TỐI ƯU HÓA PHẢN ỨNG RT-LAMP PHÁT HIỆN NHANH NOROVIRUS TRONG THỰC PHẨM

*Phan Thị Thanh Hà<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hiền<sup>2</sup>, Lê Quang Hòa<sup>3</sup>*

Norovirus là vi rút thuộc họ Caliciviridae, gây bệnh viêm dạ dày ruột ở người, đối tượng thực phẩm có nguy cơ nhiễm Norovirus thường là các loại nhuyễn thể hai mảnh vỏ và các loại rau quả ăn sống. Trong các phương pháp xác định Norovirus trong thực phẩm, phương pháp RT-LAMP là kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt cho phép phát hiện nhanh, chính xác với giá thành hợp lý. Tuy nhiên, các bộ mồi LAMP tính đến thời điểm hiện tại chưa đảm bảo độ bao phủ cao cho toàn bộ các kiểu gen của Norovirus. Do đó, nhóm nghiên cứu đã tiến hành nghiên cứu hiệu chỉnh bộ mồi và tối ưu hóa phương pháp RT-LAMP xác định Norovirus trong thực phẩm. Để thực hiện mục tiêu này, các mẫu thực phẩm thu thập trên địa bàn các chợ tại Hà Nội được xử lý, sau đó tách chiết và tinh sạch ARN virus, phản ứng RT-LAMP được khảo sát để chọn ra điều kiện tối ưu (lượng enzyme phiên mã ngược 2U/phản ứng; nhiệt độ ủ 63°C; nồng độ Betain đối với GI: 1M, đối với GII: 0,8M; thời gian ủ: 60 phút) với độ nhạy là 10 phiên bản/phản ứng và độ đặc hiệu đạt 100% trên các chủng khảo sát.

**Từ khóa:** *Norovirus, thực phẩm, RT-LAMP.*

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Norovirus là nguyên nhân phổ biến của các ca viêm dạ dày ruột cấp ở hầu hết các nhóm tuổi, trong một số trường hợp có thể gây tiêu chảy liên tục, dẫn đến mất nước và có thể tử vong nếu không được điều trị kịp thời. Theo các số liệu thống kê dịch tễ gần đây, Norovirus được coi là một trong những nguyên nhân chính gây bệnh lan truyền do thực phẩm trên toàn thế giới. Ở Mỹ, Norovirus là nguyên nhân của 2/3 các ca viêm dạ dày ruột do thực phẩm nhiễm vi sinh vật (23 triệu ca/năm). Đối với trẻ em, Norovirus là nguyên nhân thứ hai, sau Rotavirus gây bệnh viêm dạ dày ruột cấp tính ở trẻ dưới năm tuổi. Trên thế giới, có tới 2 triệu ca viêm dạ dày ruột cấp tính ở trẻ em do Norovirus với trên 200 000 trường hợp bị tử vong. Đến nay, vaccin Rotavirus đã được phổ biến tại nhiều quốc gia, nên Norovirus có nguy cơ trở thành tác nhân gây bệnh đường ruột ở trẻ em phổ biến nhất trong

tương lai gần. Tại Việt Nam, theo nghiên cứu được thực hiện từ tháng 12/1999 đến tháng 11/2000, trong 448 mẫu phân trẻ em tiêu chảy tại Bệnh viện Nhi Đồng I và Nhi Đồng II đã có 72 mẫu dương tính với Norovirus [5]. Nghiên cứu dịch tễ học phân tử thực hiện năm 2007 (Nguyễn Văn Trang và cs) đã chỉ ra trong 501 mẫu phân trẻ em bị viêm dạ dày ruột tại viện Nhi TW có 180 mẫu dương tính với Norovirus [2]. Một nghiên cứu khác được thực hiện từ tháng 5/2009 đến tháng 12/2012 ở 3 bệnh viện tại TP.HCM (BV Nhi Đồng I, Nhi Đồng II và BV Nhiệt đới), trong 1.419 mẫu phân trẻ em dưới 5 tuổi có 293 mẫu dương tính với Norovirus, đặc biệt trẻ dưới 2 tuổi có số trường hợp nhiễm Norovirus cao nhất, chiếm 90% trường hợp nhập viện.

Đối tượng thực phẩm có nguy cơ nhiễm Norovirus thường là các loại nhuyễn thể hai mảnh vỏ và các loại rau quả ăn sống. Đặc biệt, Norovirus là nhóm

<sup>1</sup>Ths - Viện Dinh Dưỡng QG  
Email: phanthanhha87@gmail.com

<sup>2</sup>KS- Đại học Bách Khoa Hà Nội

<sup>3</sup>TS- Đại học Bách Khoa Hà Nội

Ngày gửi bài: 25/4/2016

Ngày phản biện đánh giá: 1/6/2016

Ngày đăng bài: 30/6/2016

vi rút xuất hiện phổ biến nhất trong nhuyễn thể hai mảnh vỏ do kiểu sinh sống lọc nước để lấy thức ăn. Trong 6 tháng đầu năm 2014, Cơ quan thẩm quyền Châu Âu (EU) đã cảnh báo 23 lô hàng nhuyễn thể hai mảnh vỏ của Việt Nam về chỉ tiêu Norovirus [1]. Có thể thấy, vấn đề nhiễm Norovirus trong thực phẩm không những ảnh hưởng lớn đến sức khỏe người tiêu dùng mà còn gây tác động không nhỏ đến nền kinh tế quốc dân và tính cạnh tranh lành mạnh của thực phẩm Việt Nam trên thị trường quốc tế. Vì vậy, việc phát triển một phương pháp phát hiện nhanh, chính xác mức độ nhiễm Norovirus trong thực phẩm với giá thành hợp lý là yêu cầu cấp thiết, nhằm nâng cao hiệu quả của công tác kiểm soát an toàn thực phẩm, góp phần bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng.

Trên thế giới, RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) là phương pháp tiêu chuẩn để phát hiện Norovirus; tuy nhiên, kỹ thuật RT-PCR có một hạn chế cơ bản là việc cần sử dụng một thiết bị chu trình nhiệt có giá thành cao và/hoặc một hệ thống điện di công kênh, không thích hợp với các phép phân tích tại thực địa. Hiện nay, cùng với sự ra đời của một số kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt axit nucleic (phản ứng khuếch đại chỉ xảy ra ở một nhiệt độ), việc phát hiện nhanh các vi sinh vật gây bệnh đã được đơn giản hóa thêm một bước, trong đó LAMP (Loop-mediated isothermal amplification of DNA) là kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt được sử dụng phổ biến hơn cả. Ra đời vào năm 2000, kỹ thuật LAMP sử dụng đặc tính chuyển vị mạch của enzyme Bst DNA polymerase và 4 cặp môi nhắm đến 6 vùng khác nhau trên gen mục tiêu. Nhờ việc tạo ra các cấu trúc thông lọng đơn nhánh (loop structures), quá trình khuếch đại có thể diễn ra tại một

nhiệt độ mà không cần thông qua giai đoạn biến tính như ở kỹ thuật PCR. Khi được tối ưu hóa, khả năng khuếch đại ADN của LAMP là rất cao, đến hàng chục tỉ lần trong thời gian 1 giờ. Ngoài ra, khả năng phát hiện trực tiếp sản phẩm của phản ứng LAMP không cần điện di là một trong các ưu điểm nổi trội của phương pháp này, giúp đơn giản hóa và rút ngắn thời gian phân tích.

Công trình đầu tiên sử dụng kỹ thuật RT-LAMP để phát hiện Norovirus là nghiên cứu của Fukuda và các cộng sự (2006) với độ nhạy 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> phiên bản/phản ứng tùy thuộc vào kiểu gen của chủng Norovirus. Trong một nghiên cứu tương tự, Yoda và các cộng sự (2007) đã thiết kế 3 tổ hợp môi để khuếch đại các trình tự gen mục tiêu tương ứng với nhóm GI, GII thường gặp và GIII ít gặp, độ nhạy dao động từ 7-200 phiên bản/phản ứng tùy thuộc vào kiểu gen của chủng Norovirus. Tuy nhiên, các nghiên cứu này cũng như một số nghiên cứu về Norovirus bằng phương pháp LAMP khác trên thế giới tính đến thời điểm hiện tại đều được thực hiện trên mẫu bệnh phẩm với lượng vi rút lớn và bộ môi chưa đảm bảo độ bao phủ cao cho toàn bộ các kiểu gen của Norovirus. Do đó, việc nghiên cứu cập nhật hệ thống môi LAMP có độ bao phủ cao với các biến chủng Norovirus hiện nay cùng với việc nghiên cứu thiết lập một quy trình tối ưu cho phép phát hiện nhanh Norovirus trong thực phẩm là hết sức cần thiết, góp phần nâng cao hiệu quả của công tác kiểm soát an toàn thực phẩm.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

#### 2.1.1. Chủng vi rút

- Các mẫu chuẩn ARN đại diện cho

Norovirus GI và GII với nồng độ  $10^6$  phiên bản/ $\mu$ l được cung cấp bởi TS. Elisabetta Suffredini (Istituto Superiore di Sanità)

- Chủng HAV HM175:18f ( $10^{7,25}$  TCID<sub>50</sub>/ml) được mua từ ATCC (American Type Culture Collection).

- Chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  từ bộ sưu tập chủng của Trung tâm Nghiên cứu phát triển Sinh học Viện Công nghệ sinh học & Công nghệ Thực phẩm, Đại học Bách Khoa Hà Nội.

### 2.1.2. Mẫu thực phẩm

Các mẫu thực phẩm được thu thập tại các chợ và siêu thị trên địa bàn Hà Nội với tần suất lấy mẫu là 1 mẫu/1 địa điểm/15 ngày.

### 2.1.3. Oligonucleotid

Các môi được sử dụng trong phản ứng Realtime RT-PCR và phản ứng RT-LAMP được cung cấp bởi công ty Muacrogen (Hàn Quốc).

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Thử nghiệm các bộ môi LAMP

Để lựa chọn được bộ môi LAMP có độ nhạy cao nhưng không gây ra hiện tượng dương tính giả, tiến hành thử nghiệm phản ứng RT-LAMP với các bộ môi đã được công bố bởi Fukuda và cộng sự (2006) và Yoda và cộng sự (2007). Lượng ARN của NoV GI và GII được sử dụng trong các phản ứng như sau: 103, 104, 105 đối với phản ứng phát hiện NoV GI; 102, 103, 104 đối với phản ứng phát hiện NoV GII. Hiệu quả của phản ứng RT-LAMP được đánh giá bằng cách điện di 10 $\mu$ l sản phẩm phản ứng trên gel agarose 2%.

### 2.2.2. Hiệu chỉnh các bộ môi LAMP

Bộ 4 cặp môi LAMP (môi FIP, BIP, F3, B3) được so sánh với ngân hàng dữ liệu GenBank bằng phần mềm BlastN với số lượng lớn nhất các trình tự so sánh được hiển thị (Max target sequences) là

20000. Từ kết quả blast sẽ xác định được các biến thể trình tự của Norovirus mà các môi đã thiết kế chưa bao trùm. Sau đó, từ các trình tự môi LAMP gốc và các biến thể đã xác định tiến hành thiết kế lại các môi LAMP với tiêu chí số lượng vị trí suy biến không vượt quá 3 trong các môi F2, B2, F1c và B1c, số lượng môi dùng trong phản ứng là ít nhất nhưng vẫn đủ bao trùm tất cả các khả năng xảy ra.

### 2.2.3. Phương pháp tách chiết và tinh sạch ARN vi rút

Các mẫu thực phẩm phục vụ phân tích được rửa sạch dưới vòi nước. Tiếp đến xay nhuyễn và cân  $0,5 \pm 0,05$  g phân phối vào ống eppendorf 2ml. Các mẫu sẽ được ly giải hoàn toàn bằng Trizol để giải phóng ARN tổng số, bao gồm cả ARN của Norovirus. Tiếp đó bổ sung chloroform nhằm phân tách ARN vi rút; sau khi li tâm với tốc độ cao, dung dịch trong ống sẽ được phân làm 2 pha, ARN ở pha trên cùng, ADN và protein ở lớp phân pha. Dùng pipet hút nhẹ nhàng phần dịch nổi để thu ARN đã tách chiết.

ARN thu được sau khi tách chiết bằng Trizol được tinh sạch theo phương pháp của Boom và các cộng sự [7]. Huyền phù Silica trước tiên được bổ sung vào mẫu ARN, sau đó ủ ở nhiệt độ thường. Tiếp đó tiến hành li tâm ở 12000g để thu các hạt silica đã gắn ARN, các hạt silica cùng với ARN sau đó được rửa bằng dung dịch rửa. Sau cùng bổ sung dung dịch 10 mM Tris, pH 8,5 rồi ủ ở 60°C trong 10 phút và li tâm với tốc độ cao để thu được ARN tinh sạch.

### 2.2.4. Phương pháp RT-LAMP

Phản ứng RT-LAMP được tiến hành bằng cách sử dụng 5 $\mu$ l ARN làm khuôn trong phản ứng có thể tích 25 $\mu$ l, thành phần phản ứng được trình bày ở bảng 1. Hỗn hợp phản ứng được đảo trộn bằng máy vortex trong 15 giây, sau đó bổ sung

vào ống 1 giọt dầu khoáng và li tâm góp mẫu. Phản ứng được thực hiện bằng cách ủ ở các nhiệt độ 61, 63 và 65°C, thời gian ủ được thử nghiệm là 45, 60, 75, 90 và 120 phút. Hiệu quả khuếch đại của phản ứng RT-LAMP được đánh giá bằng cách điện di sản phẩm trên gel agarose hoặc bằng cách quan sát sự xuất hiện kết tủa trắng  $Mg_2P_2O_7$  sau khi li tâm 6000 vòng/phút trong 1 phút.

### 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

#### 3.1. Lựa chọn và hiệu chỉnh môi LAMP

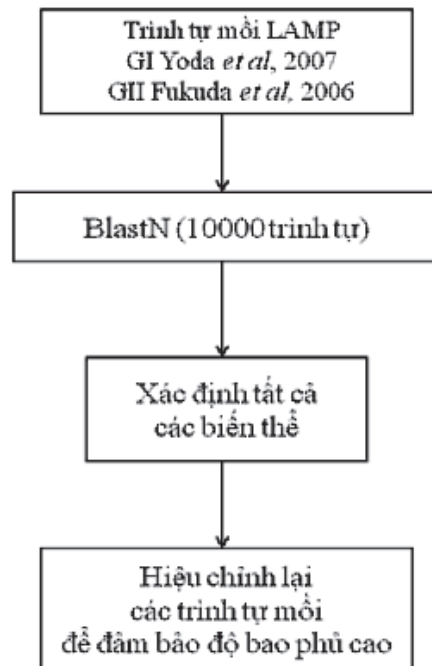
##### 3.1.1. Lựa chọn môi LAMP

Bộ môi LAMP của Yoda và Fukuda [8,9] được thử nghiệm trên ARN Norovirus nhóm GI và GII với nồng độ 103,104,105 phiên bản/ phản ứng. Kết quả nhận được từ sản phẩm điện di cho thấy, sản phẩm RT-LAMP của tổ hợp môi GI do Fukuda thiết kế có mẫu âm tính cho sản phẩm khuếch đại, kết quả này phản ánh tổ hợp môi này không đặc hiệu, dẫn đến hiện tượng các môi tự bắt cặp với nhau cho sản phẩm khuếch đại đối với mẫu âm tính [4]. Trong khi đó tổ hợp môi của Yoda có mẫu âm tính không có sản phẩm khuếch đại không đặc hiệu, đồng thời các nồng độ 103,104,105 phiên bản/phản ứng cho sản phẩm khuếch đại rõ nét. Như vậy có thể lựa chọn tổ hợp môi do Yoda và cộng sự thiết kế năm 2007 cho Norovirus nhóm GI. Với sản phẩm điện di đối với Norovirus nhóm GII, kết quả sản phẩm RT-LAMP sử dụng tổ hợp môi do Yoda thiết kế nhận được có mẫu âm tính cho khuếch đại không đặc hiệu, trong khi tổ hợp môi do Fukuda thiết kế lại có mẫu âm tính không cho kết quả khuếch đại, do đó đưa ra quyết định sử dụng tổ hợp môi do Fukuda và cộng sự thiết kế năm 2006 cho Norovirus nhóm GII. Tuy nhiên cần xem xét về độ

nhạy của tổ hợp môi này do mẫu thử với nồng độ ARN 102 phiên bản/phản ứng cho sản phẩm khuếch đại không rõ nét.

##### 3.1.2. Hiệu chỉnh bộ môi LAMP

Mục tiêu của việc hiệu chỉnh bộ môi LAMP nhằm thiết kế lại các bộ môi dựa trên các công bố của Yoda và cộng sự (2007) và Fukuda và cộng sự (2006) để đảm bảo độ bao phủ cao đối với các trình tự Norovirus GI và GII trong ngân hàng dữ liệu GenBank, đặc biệt là đối với các trình tự Norovirus có nguồn gốc từ Việt Nam. Tiến hành hiệu chỉnh môi các môi của Norovirus theo các bước thể hiện ở Hình 1.



**Hình 1. Sơ đồ hiệu chỉnh bộ môi LAMP**

Hoàn thành giai đoạn hiệu chỉnh môi, nhận được trình tự của các tổ hợp môi LAMP (Bảng 1).

**Bảng 1. Trình tự các môi LAMP phát hiện GI và GII sau khi hiệu chỉnh**

Nhóm	Tên môi	Trình tự (5' - 3')	
GI	FIP1.1(F1c+F2)	GAGATTGCGATCTCCTGYCCA,TTTT,GNTGGCARGCCATGTTCCG	
	FIP1.2(F1c+F2)	GAGATCGCGRTCYCCTGTCCA,TTTT,GNTGGCARGCCATGTTCCG	
	BIP1.1(B1c+B2)	TAAATGATGATGGCGTCTAAGGA,TTTT,RCCTCTGGWACCAGCTGAC	
	BIP1.2(B1c+B2)	TAAATGATGATGGCGTCTAAGGA,TTTT,ACCTCCGGCACCAGTTGAC	
	BIP1.3(B1c+B2)	TAAATGATGATGGCGTCTAAGGA,TTTT,RCCTCYGGTACCAGCTGGC	
	BIP2.1(B1c+B2)	TAAATGATGATGGCGTCTAAGGA,TTTT,TARCTCYGGTACCAGCTGG	
	BIP2.2(B1c+B2)	TAAATGATGATGGCGTCTAAGGA,TTTT,TAACCTCCGGCACMAGYTGA	
	BIP2.3(B1c+B2)	TAAATGATGATGGCGTCTAAGGA,TTTT,TAACCTCYGGTACCARCTGA	
	BIP2.4(B1c+B2)	TAAATGATGATGGCGTCTAAGGA,TTTT,TTGCCTCTGGTACCAGCTGA	
	B3	GTTAATWTGATTGAYCCYTGG	
	F3-1.1	GGYYTDGAAATGTATGTGCCA	
	F3-1.2	GGRYTGGARATGTATGTCCCA	
	F3-2	GGRCTKGAAATYTACATYCC	
	LF1	GAGRTCATGGAAGCGCATC	
	LF2	AAGRTCRTGGAACCGCATC	
	LF3	CARRTCATGGAATCGCATC	
	BLF1	CCAAGCGYRGATGGCG	
	BLF2	ACGCCCCAMCAAACATG	
	BLF3	ACGCCCCAMCATCSCT	
	BLF4	CCAAGCGCAGATGGCG	
	BLF5	TCAAGCGTGGATGGCG	
	BLF6	ACGCCCCAACATCCCCT	
	GII	FIP1(F1c+F2)	GGGAGCMAGATTGCGATCGC,TTTT,GAGCCAATGTTAGRTGGAT
		FIP2(F1c+F2)	GGGAGCMAGATTGCGATCGC,TTTT,GAASCCATGTTYAGGTGGAT
FIP3(F1c+F2)		GGGAGCMAGATTGCGATCGC,TTTT,GAGGCBATGTTAGATGGAT	
FIP4(F1c+F2)		GGGAGCMAGATTGCGATCGC,TTTT,GAGSCMATGTTAGRTGGAT	
BIP1(B1c+B2)		CGTGAATGAAGATGGCGTCG,TTTT,CTCATTGTTGACCTCTGGGACRAG	
BIP2(B1c+B2)		TGTGAATGAAGATGGCGTCG,TTTT,CTCATTGTTGAYCTCTGGKACGAG	
BIP3(B1c+B2)		TGTGAATGAAGATGGCGTCG,TTTT,CTCATTGWTGSCCTCTGGTACGAG	
BIP4(B1c+B2)		TGTGAATGAAGATGGCGTCG,TTTT,CTCATRCTGACCTCTGGGACRAG	
BIP5(B1c+B2)		TGTGAATGAAGATGGCGTCG,TTTT,CTCATTATTACTTTCTGGCACGAG	
F3.1		GGNMTGGANTTTTAYGTGCCMAG	
F3.2		GGHATGGATTTTTACGTGCCCAG	
B3.1		CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	
B3.2		CCACCTGCATRACCATTATACAT	
B3.3		CCACCWGCATAACCRITGTACAT	
LF1		GTGCTCARATCYGAGAATCTC	
LF2		GTGCTCAARTCWGARAACCTC	
LF3		GTGCTCAGGTCWGAGAATCTC	

### 3.1. Tối ưu hóa phản ứng RT-LAMP

Các thông số ảnh hưởng trực tiếp đến độ nhạy của phản ứng RT-LAMP gồm có: nhiệt độ ủ, nồng độ các môi, thời gian ủ, lượng dNTP, lượng ion  $Mg^{2+}$ , nồng độ betaine, nồng độ enzyme phiên mã ngược

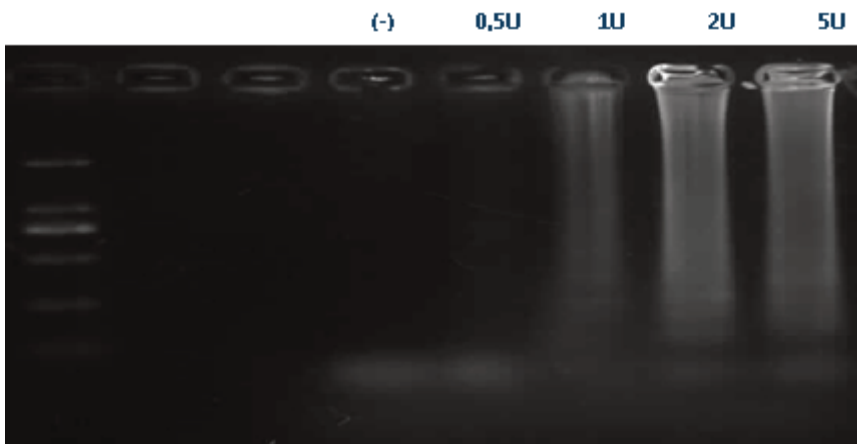
và enzyme Bst polymerase. Trên thực tế, đã có rất nhiều nghiên cứu tối ưu hóa xác lập được nồng độ môi, lượng enzyme Bst polymerase cũng như lượng dNTP và lượng ion  $Mg^{2+}$  tối ưu trong phản ứng LAMP [6]. Do đó, nhóm nghiên cứu tiến

hành nghiên cứu tối ưu hóa lượng enzyme phiên mã ngược, thời gian phản ứng, nhiệt độ phản ứng và nồng độ betain.

### 3.1.1. Tối ưu lượng enzyme AMV Reverse transcriptase

Enzym AMV reverse transcriptase có tác dụng xúc tác quá trình phiên mã ngược tạo CARN để làm khuôn cho phản ứng LAMP. Nhiệt độ tối ưu của enzym AMV reverse transcriptase là 42°C-48°C,

dải nhiệt độ hoạt động của enzyme từ 25°C-60°C trong khi nhiệt độ của phản ứng LAMP ở khoảng 60°C-65°C. Do đó cần tối ưu hóa lượng enzyme để đảm bảo hiệu quả phản ứng. Thực hiện phản ứng RT-LAMP với nồng độ enzyme AMV reverse transcriptase lần lượt là 0,5U; 1U; 2U và 5U. Hiệu quả của phản ứng khuếch đại được đánh giá bằng cách điện di sản phẩm trên gel agarose (Hình 4).



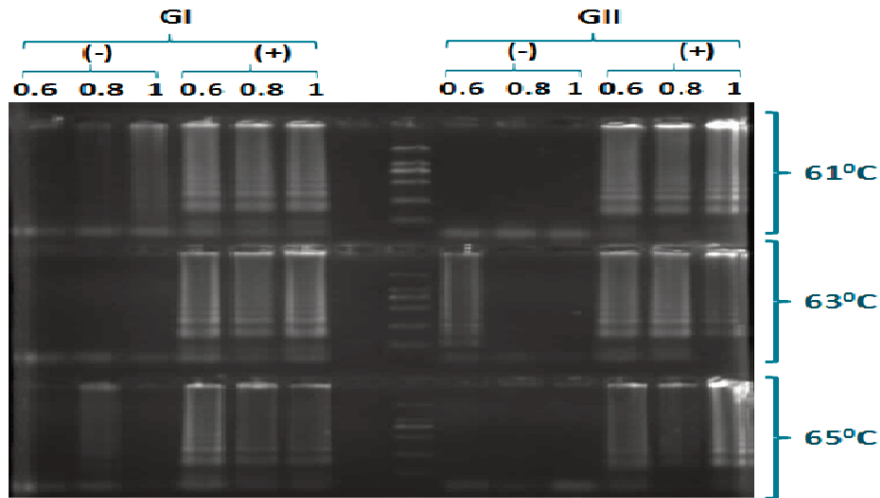
**Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng RT-LAMP với nồng độ Enzyme AMV Reverse Transcriptase là 0,5; 1; 2 và 5U/phản ứng trên gel agarose. Ký hiệu (-) chỉ mẫu kiểm chứng**

Kết quả điện di cho thấy phản ứng thực hiện với nồng độ enzyme 0,5U/phản ứng không cho sản phẩm khuếch đại, với nồng độ enzyme 1U/phản ứng cho rất ít sản phẩm, phản ứng với nồng độ enzyme 2U/phản ứng và 5U/phản ứng cho sản phẩm khuếch đại nhiều và rõ nét hơn cả, hầu như không có sự khác biệt giữa sản phẩm khuếch đại khi sử dụng lượng enzyme 2U/phản ứng và 5U/phản ứng; như vậy, có thể kết luận lượng enzyme AMV Reverse Transcriptase tối ưu cho 25µl phản ứng là 2U, kết quả này thấp hơn so với lượng AMV Reverse Transcriptase sử dụng trong nghiên cứu của Yoda năm 2009 (3,75U/phản ứng), cho phép giảm

kinh phí nghiên cứu.

### 3.1.2. Tối ưu nhiệt độ và nồng độ Betain

Betaine có khả năng hỗ trợ enzyme polymerase trong phản ứng tách sợi, đồng thời làm giảm cấu trúc thứ cấp, qua đó tăng cường hiệu quả của phản ứng LAMP. Vì vậy, betaine đóng vai trò quan trọng trong phản ứng LAMP. Tuy nhiên, nhiệt độ phản ứng cũng là một yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả của phản ứng. Do đó, tiến hành khảo sát tối ưu đồng thời nồng độ Betaine và nhiệt độ phản ứng LAMP. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng RT-LAMP trên gel agarose được thể hiện ở Hình 3.



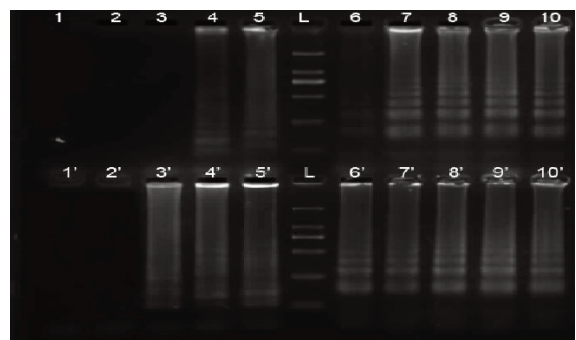
**Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng RT-LAMP khảo sát nồng độ Betaine và nhiệt độ**

Với phân nhóm GI, quan sát kết quả sản phẩm nhận thấy: phản ứng ở nhiệt độ 61°C và 65°C có mẫu âm tính cho khuếch đại không đặc hiệu đối với mẫu sử dụng nồng độ betaine tương ứng là 1M và 0,8M; chỉ kết quả của phản ứng ở nhiệt độ 63°C không có mẫu âm tính cho kết quả khuếch đại không đặc hiệu; tại nhiệt độ này, kết quả của cả 3 mẫu âm tính ở 3 nồng độ betaine khảo sát đều không có khuếch đại không đặc hiệu, các mẫu dương tính ở cả 3 nồng độ betaine đều kết quả khuếch đại rõ khi quan sát trên gel agarose; tuy nhiên sản phẩm khuếch đại với mẫu sử dụng nồng độ betaine 1M cho kết quả khuếch đại nhiều và rõ nét nhất. Do đó, có thể kết luận điều kiện phản ứng tối ưu cho Norovirus nhóm GI là nồng độ betaine 1M; nhiệt độ phản ứng 63°C. Với phân nhóm GII nhận thấy: ở nhiệt độ 63°C, chỉ có mẫu sử dụng lượng betaine 0,8M và 1M không có mẫu âm tính cho kết quả không đặc hiệu, trong đó chỉ mẫu sử dụng nồng độ betaine 0,8M cho kết quả khuếch đại rõ nét. Như vậy, có thể lựa chọn nồng độ betaine 0,8M và nhiệt độ phản ứng 63°C là điều kiện tối ưu cho phản ứng RT-LAMP đối với Norovirus

nhóm GII. Các kết quả nồng độ Betaine và nhiệt độ phản ứng nhận được phù hợp với một số nghiên cứu xác định Norovirus bằng phương pháp RT-LAMP gần đây như nghiên cứu của YangLi [10] hay nghiên cứu của Yun Yang và cộng sự năm 2014 [3].

### 3.1.3. Tối ưu thời gian phản ứng

Để tối ưu hóa thời gian phản ứng, tiến hành ủ song song 5 mẫu ở 63°C trong thời gian 45, 60, 75, 90, 120 phút. Kết thúc phản ứng RT-LAMP, bất hoạt enzyme ở 80°C trong 10 phút, sản phẩm điện di trên gel agarose được thể hiện ở Hình 4.



**Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến hiệu quả khuếch đại của phản ứng RT-LAMP**

Hình 4 cho thấy, với Norovirus nhóm GI, sản phẩm phản ứng với thời gian ủ 45, 60 và 75 phút không có sản phẩm khuếch đại không đặc hiệu cho mẫu âm tính; tuy nhiên chỉ mẫu ủ trong 60 và 75 phút có mẫu dương tính cho sản phẩm khuếch đại nhiều và rõ nét. Xem xét kết quả đối với Norovirus nhóm GII nhận thấy, chỉ mẫu ủ ở 45 và 60 phút có mẫu âm tính không cho kết quả khuếch đại không đặc hiệu đồng thời mẫu dương tính cho kết quả khuếch đại nhiều và rõ nét. Kết hợp kết quả khảo sát thời gian ủ của Norovirus nhóm GI và GII, có thể chọn ra thời gian ủ tối ưu cho phản ứng RT-LAMP xác định Norovirus cho cả hai nhóm là 60 phút.

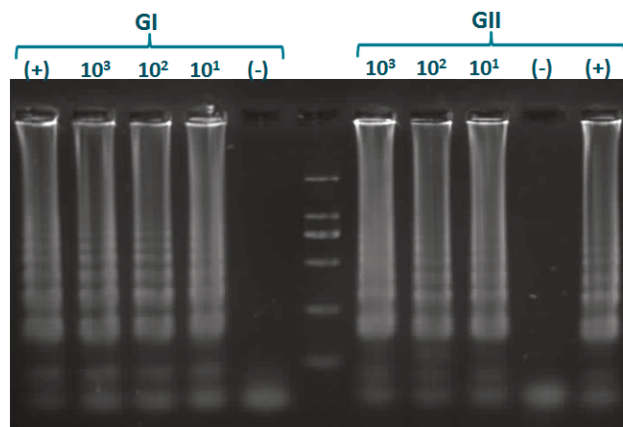
Từ các kết quả tối ưu hóa, nhóm

nghiên cứu đã chọn ra được điều kiện tối ưu cho phản ứng RT-LAMP xác định Norovirus là: lượng enzyme AMV Reverse Transcriptase 2U/phản ứng cho cả GI và GII, nồng độ betaine 1M đối với GI và 0,8M đối với GII, nhiệt độ ủ 63°C, thời gian ủ 60 phút.

### 3.2. Xác định độ nhạy, độ đặc hiệu phản ứng RT-LAMP

#### 3.2.1. Xác định độ nhạy phản ứng RT-LAMP

Tiến hành áp dụng các thông số đã nhận được từ kết quả tối ưu hóa trên các mẫu ARN của Norovirus nhóm GI và GII với nồng độ  $10^3$ ,  $10^2$  và  $10^1$  phiên bản/phản ứng để xác định độ nhạy của phương pháp. Kết quả được thể hiện ở Hình 5.



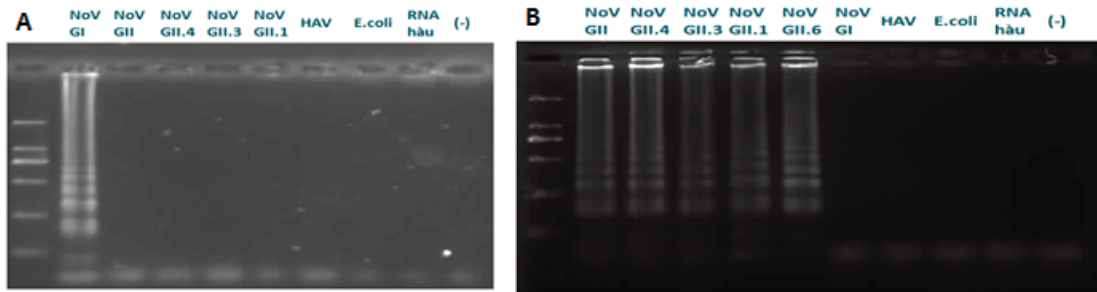
**Hình 5. Kết quả xác định độ nhạy phản ứng RT-LAMP đối với Norovirus nhóm GI và GII.**

Kết quả hình 5 cho thấy các mẫu âm tính của Norovirus nhóm GI và GII đều không có khuếch đại không đặc hiệu, các mẫu dương tính cho kết quả khuếch đại nhiều và rõ nét, các mẫu khảo sát các nồng độ ARN  $10^3$ ,  $10^2$  và  $10^1$  phiên bản/phản ứng đều cho sản phẩm khuếch đại rõ nét và khá đồng đều. Như vậy, có thể khẳng định độ nhạy của phản ứng RT-LAMP đạt 10 phiên bản/phản ứng  $25\mu\text{l}$ , độ nhạy này hoàn toàn tương đương với độ nhạy của phản ứng Real-time RT-PCR.

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

Các thông số tối ưu hóa tiếp tục được áp dụng để xác định độ đặc hiệu của phản ứng RT-LAMP. Đối với Norovirus nhóm GI, thực hiện phản ứng RT-LAMP đối với các mẫu: ARN chuẩn của Norovirus nhóm GI, Norovirus nhóm GII, Norovirus GII.4, GII.3, GII.1, vi rút HAV, vi khuẩn *E.coli*, mẫu ARN phát hiện trong mẫu hầu trên thị trường. Kết quả được thể hiện ở Hình 6.





**Hình 6. Kết quả xác định độ đặc hiệu phản ứng RT-LAMP đối với Norovirus nhóm GI và GII**

Kết quả sản phẩm khuếch đại trên gel agarose thể hiện ở hình 6A cho thấy chỉ mẫu Norovirus nhóm GI cho sản phẩm khuếch đại; tương tự hình 6B cho thấy chỉ 5 mẫu Norovirus nhóm GII cho sản phẩm khuếch đại. Do đó, có thể khẳng định phương pháp có độ đặc hiệu 100% trên tập hợp các chủng thử nghiệm.

#### IV. KẾT LUẬN

Từ những kết quả nhận được trong quá trình nghiên cứu, nhóm nghiên cứu tối ưu hóa phản ứng RT-LAMP phát hiện nhanh Norovirus trong thực phẩm với các điều kiện sau: lượng AMV 2U/phản ứng; nhiệt độ ủ 63°C; nồng độ Betain đối với GI: 1M, đối với GII: 0,8M; thời gian ủ: 60 phút. Áp dụng các điều kiện tối ưu cho các mẫu chuẩn ARN của Norovirus đã nhận được độ nhạy của phương pháp RT-LAMP phát hiện Norovirus GI và GII là 10 phiên bản/phản ứng 25µl, tương đương với phản ứng Real-time RT-PCR; độ đặc hiệu của phương pháp đạt 100% trên các chủng khảo sát. Những kết quả nhận được có thể được ứng dụng trong nghiên cứu tiếp theo hướng tới xây dựng bộ Kit RT-LAMP phát hiện nhanh Norovirus trong thực phẩm, phục vụ trong công tác kiểm tra an toàn thực phẩm.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện bằng nguồn kinh phí đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số B2013.01.51.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cục quản lý chất lượng Nông lâm sản và Thủy sản, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2014), *Công văn 1349/QLCL-CL1 về việc lấy mẫu khảo sát Norovirus*.
2. Trang, Nguyễn Vân (2013). *Tác nhân tiêu chảy do virus ở trẻ em: Sự phân bố và tính đa dạng ở Việt Nam*. Tạp chí Y học dự phòng. Tập XXIII (số 8 (144)), tr. 10-23.
3. Bo-Yun Yang, Xiao-Lu Liu, Yu-Mei Wei, Jing-Qi Wang, Xiao-Qing He, Yi Jin and Zi-Jian Wang (2014), *Rapid and sensitive detection of human astrovirus in water samples by loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye*. BMC Microbiology. 14:38.
4. De-Guo Wang, Jeffrey D. Brewster, Moushumi Paul and Peggy M. Tomasula (2015), *Two Methods for Increased Specificity and Sensitivity in Loop-Mediated Isothermal Amplification*, Molecules. 20, tr. 6048-6059.
5. Hansman GS, Doan LT, K Nguyen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, et al (2004), *Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam*. Arch Virol. 149(1673-88).
6. Hung-Yueh YehT, Craig A. Shoe-

- maker, Phillip H. Klesius (2005), *Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish *Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri**. *Journal of Microbiological Methods*. 63, tr. 36-44.
7. R.Boom.(Mar. 1990), *Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids*. *Journal of Clinical Microbiology* . 28(3), tr. 495-503.
  8. Shinji Fukuda, Shinichi Takao, Masaru Kuwayama, Yukie Shimazu, and Kazuo Miyazaki (Apr. 2006), *Rapid Detection of Norovirus from Fecal Specimens by Real-Time Reverse Transcription–Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay*. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(4), tr. 1376–1381.
  9. Tomoko Yoda, Yasuhiko Suzuki, Kenji Yamazaki, Naomi Sakon, Masashi Kanki, và Ikuko Aoyama, Teizo Tsukamoto (2007). *Evaluation and Application of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of Noroviruses*, *Journal of Medical Virology*. 79, tr. 326-334.
  10. YangLi (2011), *Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Detection of Three Enteric Viruses and Its Application in Water Samples*, <http://ysidata.com/>

## Summary

### OPTIMIZING OF RT-LAMP METHOD FOR FAST DETECTION OF NOROVIRUS IN FOOD

Norovirus, a virus of the Caliciviridae family, is the leading agent of food borne viral gastroenteritis worldwide. The most common foods contaminated by Norovirus are bivalve molluscan and raw vegetables. Among methods to detect Norovirus, RT-LAMP method is one of the most efficient low-costed isothermal amplifying techniques that provide rapid and exact specification. However the LAMP primer set does not always have sufficient specificity to detect all the various type of Norovirus. Therefore this study was conducted to optimize the LAMP primer set and RT-LAMP method. With the purpose of accomplishing this goal, the food samples which were collected from some markets in Hanoi were processed, followed by extraction and purification of viral RNA, then the RT-LAMP reaction was tested to select optimal conditions (concentration of reverse transcriptase enzyme: 2U / reaction; annealing temperature: 63°C; concentration of betaine for GI: 1M, for GII: 0.8M; incubation time: 60 minutes) with detective sensitivity 10 copies/reaction and specificity of 100% for tested strains.

**Keywords:** *Norovirus, food, RT-LAMP.*

