

PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH CHỦNG VIRUS GÂY HỘI CHỨNG HỒ HẤP VÀ SINH SẢN Ở LỢN BẰNG PHƯƠNG PHÁP MULTIPLEX RT-PCR

Nguyễn Thị Diệu Thủy^{1*}, Nguyễn Thị Thu¹, Nguyễn Văn Cường¹, Lê Thị Thu Hà², Nguyễn Giang Sơn³, Đỗ Võ Anh Khoa⁴

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp miền Nam

³Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản (*Porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS*) là một trong những dịch bệnh gây tổn thất nặng nề về kinh tế ở lợn trên toàn thế giới, trong đó có Việt Nam. Chủng virus PRRS đang lưu hành bao gồm hai kiểu gen, kiểu Châu Âu (European type - EU) và kiểu Bắc Mỹ (North American type - NA), với sự khác nhau đến 40% về trình tự nucleotide. Nghiên cứu này sử dụng phương pháp multiplex RT-PCR để phát hiện và định chủng (EU/NA) virus PRRS đang lưu hành tại Việt Nam. Các mối đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự gen ORF7 mã hóa cho protein nhân của virus PRRS, trong đó mỗi chuỗi đặc hiệu với cả 2 chủng EU và NA, trong khi đó mỗi ngược đặc hiệu hoặc với chủng EU, hoặc với chủng NA. Kích thước sản phẩm PCR nhận lên bằng bộ mỗi đặc hiệu lần lượt là 161 và 245 bp tương ứng với chủng virus PRRS dòng EU và NA. Độ đặc hiệu của phương pháp được kiểm tra qua phản ứng chéo với các virus thường đồng nhiễm với PRRS như virus gây hội chứng còi cọc sau cai sữa (PCV2), virus gây sốt cổ điển ở lợn (CSFV). Độ nhạy của phương pháp cho phép phát hiện ở giới hạn nồng độ virus là $1,87 \times 10^4$ ng/μl. Trong 158 mẫu có biểu hiện mắc bệnh PRRS phân lập ở Việt Nam, tỷ lệ dương tính với PRRSV là 125 mẫu (79,11%), trong đó 123 mẫu thuộc chủng NA (77,85%) và 2 mẫu thuộc chủng EU (1,27%). Kết quả này cho thấy tiềm năng sử dụng kỹ thuật multiplex RT-PCR trong chẩn đoán phân tử và định type PRRSV đang lưu hành.

Từ khóa: Định chủng và phát hiện virus, multiplex RT-PCR, virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản lợn (PRRSV).

MỞ ĐẦU

PRRSV là một loại virus gây truyền nhiễm nguy hiểm, lây lan nhanh và làm chết hàng loạt lợn nhiễm bệnh (Meng *et al.*, 2000). Virus PRRS được phân lập và định loại vào năm 1991 thuộc loại RNA virus, có kích thước vào khoảng 45 + 80 nm, chịu được nhiệt độ thấp. Vật chất di truyền của virus PRRS là RNA mạch đơn có kích thước phần tử khoảng 15 kb, bao gồm các vùng gen mã hoá cho các protein không cấu trúc và 9 khung đọc mở (ORF- open reading frame) mã hóa cho các protein chức năng (Mengeling *et al.*, 1997; Meulenber *et al.*, 1998). Virus PRRS được phân thành 2 kiểu gen với 2 dòng đại diện là VR2332 - dòng Bắc Mỹ (North American type - NA) và Lelystad - dòng Châu Âu (European type - EU) với khác biệt di truyền đáng kể lên tới 40% (Neisen *et al.*, 1999). Trong số các gen mã hoá protein cấu trúc, ORF7 mã hóa cho protein vỏ nhân (nucleocapsid protein) là protein không glycosyl hóa, không có peptide tín hiệu (signal peptide) trong cấu trúc phân tử, được cấu thành từ 123 hay 128 aa tương ứng với kiểu gen NA và EU. Các nghiên cứu về nucleocapsid protein trước đây cho thấy protein N chứa vùng chức năng gắn RNA được xem là giữ vai trò quan trọng trong việc sao chép virus (Rowland *et al.*, 2003). Qua phân tích sự thay đổi trình tự nucleotide của các dòng virus PRRS người ta đã xác định rằng khung đọc mở ORF7 của chúng không có nhiều thay đổi trong suốt quá trình tiến hoá, vì thế ORF7 được dùng làm trình tự đích trong chẩn đoán virus PRRSV. Tuy nhiên sự khác biệt giữa dòng virus PRRS kiểu gen NA và EU ở khung đọc mở này là rất rõ, cụ thể, sự tương đồng về trình tự nucleotide là 57-59 % và tương đồng về trình tự axit amin khoảng 62 % (Andreyev *et al.*, 1997).

PRRSV đã xuất hiện lần đầu tiên ở Việt Nam vào năm 1997 trong đàn lợn giống nhập từ Mỹ (Long, 2007). Trong những năm 2007-2012, đại dịch hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (PRRS) liên tục xảy ra ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành chăn nuôi lợn ở nước ta nói riêng và các nước trong khu vực nói chung. Thực tế cho thấy, các tác nhân gây bệnh là virus/vi khuẩn ngày càng có sự biến đổi di truyền cao do đó hình thành nên các biến chủng/dòng khác nhau gây khó khăn cho công tác chẩn đoán bệnh một cách chính xác. Phương pháp multiplex RT-PCR (Edwards, Gibbs, 1994), đã được sử dụng để đồng thời nhận diện, phân biệt nhiều loại virus hoặc các chủng/dòng khác nhau trong cùng một loại tác nhân gây bệnh trong cùng một mẫu dựa vào kích thước đoạn gen được khuếch đại (Huang *et al.*, 2004; Yue *et al.*, 2009). Trong nghiên cứu này chúng tôi đã thiết kế bộ mỗi đặc hiệu thuộc vùng gen ORF7 có thể vừa chẩn đoán xác định chủng PRRSV nhiễm, đồng thời độ nhạy, độ đặc hiệu của phương pháp cũng được đánh giá.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Bệnh phẩm là các mẫu máu, huyết thanh được thu thập từ lợn có biểu hiện hoặc nguy cơ cao nhiễm PRRS (n=158) ở một số tỉnh như Điện Biên (n=9); Lâm Đồng (n=67); Cần Thơ, Đồng Tháp, Hậu Giang (n=12); Đồng Nai, TP Hồ Chí Minh (n=58); Bình Dương (n=12).

Phương pháp

RNA hệ gen của virus được tách chiết bằng Trizol theo ba bước: Đồng nhất mẫu bằng Trizol; Phân tách mẫu sử dụng Chloroform, Tủa RNA bằng Isopropanol sau đó rửa tủa bằng ethanol 70°C. DNA tổng số được tách chiết bằng phenol.

Thiết kế mỗi: Bộ mỗi được thiết kế trên vùng gen ORF7 của virus PRRS để nhận biết và nhận đặc hiệu 2 chủng NA (với kích thước 245 bp) và chủng EU (với kích thước 161 bp). Thiết kế cặp mỗi nhận đặc hiệu đoạn gen PCV2 (kích thước 387 bp), CSFV (kích thước 342 bp) sử dụng xác định độ đặc hiệu của phương pháp nghiên cứu. Các bộ mỗi được thiết kế bằng phần mềm Primer 3, trình tự mỗi trong Bảng 1.

Bảng 1: Trình tự mỗi dòng để khuếch đại gen

Virus	Ký hiệu mỗi	Trình tự mỗi (5' - 3')	Ta (°C)	Kích thước sản phẩm (bp)
PRRSV ¹	PRRSV-F	CAG CCA GTC AAT CAG CTG TG	55	161
	EU7R	GAA CGT TCG GTC TGG GTG AG		
PRRSV ²	NA7R	ATC CTC CCT GAA TCT GAC AGG	55	245
	ORF7-F	TGG GTG GCA GAA AAG CTG TT		
PCV2	ORF7-R	GTG TCA ATC AGT GCC ATT GAC C	53	490
	PCV2-A2	TCC CGT ATT TTC TTG CGC TC		
CSFV	PCV2-A3	GAT GCC ATT TTT CCT TCT CC	54	387
	CSFV-F	AAC ATG GAT GGT GTA ACT GG		
	CSFV-R	TCT CTA TAG TGT TGG TCA TTC C		342

PRRSV¹ dùng cho phản ứng multiplex RT-PCR, PRRSV² dùng cho tách dòng và đọc trình tự toàn bộ gen ORF7

Tổng hợp cDNA từ RNA bằng bộ kit First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phản ứng multiplex RT-PCR (mRT-PCR): Sử dụng bộ kit TOPsimple™ DryMIX-nTaq để khuếch đại gen theo quy trình của nhà sản xuất. Thành phần phản ứng (20 µl) gồm: 5 pM mỗi (mỗi chung, xuôi và ngược), 2 µl cDNA. Chu trình nhiệt phản ứng như sau: 94°C/3 phút, 35 chu kỳ [94°C/30 giây, 55°C/30 giây, 72°C/1 phút], 72°C/5 phút và giữ mẫu ở 4°C.

Xác định độ đặc hiệu của phương pháp mRT-PCR thông qua phản ứng chéo với hai virus PCV2/CSFV. Các mẫu chuẩn là DNA chủng virus PCV2 và vaccine Hog cholera của CSFV.

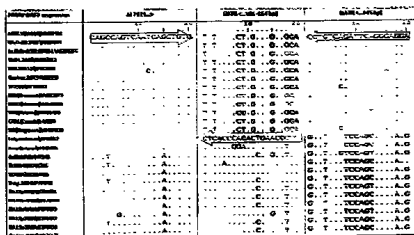
Sản phẩm RT-PCR của gen ORF7 được kiểm tra trên gel agarose 1%, tinh sạch bằng bộ kit QIAquick Purification kit (QIAGEN) và dòng hóa vào vector TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen), sau đó tách dòng và thu nhận DNA của plasmide tái tổ hợp. Đánh giá tương đối độ nhạy của phương pháp mRT-PCR dựa vào độ pha loãng 10 lần của nồng độ DNA plasmide tái tổ hợp mang gen ORF7 sau nhân dòng.

Sản phẩm RT-PCR của gen ORF7 được gửi giải trình tự trực tiếp tại Macrogen (Hàn Quốc). Trình tự nucleotide thu nhận được xử lý bằng phần mềm ClustalX 2.0.11, BioEdit 7.0.9.0. So sánh trình tự nucleotide của một số chủng đại diện với các chủng virus phân lập đã có trên GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

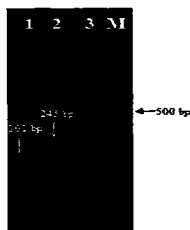
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xây dựng bộ mỗi và xác định độ đặc hiệu, độ nhạy

Hình 1 trình bày mô hình thiết kế bộ mỗi đặc hiệu dùng cho phản ứng mRT-PCR chẩn đoán và định chủng virus PRRSV. Mỗi xuôi được thiết kế đặc hiệu với cả 2 chủng EU và NA, trong khi đó 2 mỗi ngược được thiết kế đặc hiệu với từng chủng. Cụ thể, với chủng EU, sản phẩm khuếch đại là đoạn gen tương ứng với kích thước phân tử 161 bp, trong khi đó, với chủng NA, sử dụng mỗi xuôi chung và mỗi ngược đặc hiệu NA, đoạn gen với kích thước phân tử 245 bp được nhận lên đặc hiệu.



Hình 1. Thiết kế mỗi của gen ORF7 có kích thước 245 bp (chủng NA), 161 bp (chủng EU)



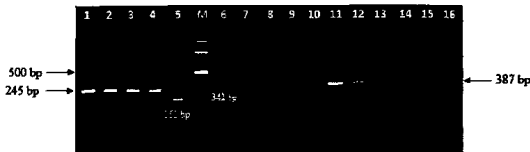
Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm multiplex RT-PCR gen ORF7

M: marker 100 bp (Enzymonic); 1: Chủng EU; 2: Chủng NA; 3: Chủng NA+EU.

Hình 2 trình bày kết quả mRT-PCR với 2 chủng đại diện NA và EU. Ở giếng thứ nhất chỉ sử dụng khuôn là cDNA chủng EU xuất hiện 1 băng DNA với kích thước tương ứng 161 bp. Ở giếng thứ 2 sử dụng chủng NA làm khuôn xuất hiện 1 băng DNA với kích thước tương ứng 245 bp. Ở giếng thứ 3 sử dụng đồng thời hai khuôn cDNA của 2 chủng NA + EU xuất hiện 2 băng DNA với kích thước tương ứng 245 và 161 bp. Kết quả trên hoàn toàn phù hợp với kích thước theo tính toán lý thuyết.

Đồng nhiễm với PRRSV thường là virus PCV2 (Porcine Circovirus type 2) và CSFV (Classical swine fever virus). Độ đặc hiệu của phương pháp mRT-PCR được xác định thông qua phản ứng chéo với virus PCV2/ CSFV đồng nhiễm với

PRRSV. Nghiên cứu được tiến hành trên chủng gốc VR2332, LV, chủng phân lập từ vaccine và một số mẫu phân lập trong nước. Kết quả ở hình 3 cho thấy khi sử dụng cặp mồi nhân đoạn đặc hiệu PRRSV ở mẫu phân lập trong nước, mẫu VR2332, LV lên vạch băng rõ nét và tương ứng với kích thước 245 và 161 bp. Sử dụng cặp mồi đặc hiệu thiết kế ở phần phương pháp để khuếch đại đoạn gen PCV2 ở các mẫu phân lập (dùng khuôn DNA), cho kích thước 387 bp (giếng 11 -> 16); và nhân gen CSFV trên chủng phân lập ở vaccine Hog cholera và mẫu phân lập cho kích thước 342 bp (giếng 6 -> 10). Đối với 2 virus PCV2/ CSFV hay đồng nhiễm này không có phản ứng chéo với PRRSV. Kết quả này cũng đồng thuận với nghiên cứu của Liu và đồng tác giả (2011), Xu và đồng tác giả (2012) khi tiến hành nghiên cứu các virus thường đồng nhiễm với virus PRRS (Liu *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2012).



Hình 3. Kết quả điện di kiểm tra độ đặc hiệu của các mẫu phân lập với PCV2/CSFV. M: Marker 100 bp (Enzymomics); 1-3: C2, DT7, DB2; 4: VR2332; 5: LV; 6-9: CSFV- Hog cholera, 2DB, 6DB, C2; 10: PRRS- Hog cholera; 11-14: PCV2-A23, DB2, DB3, DB9, 15-16: PRRS- DB1, DB2.

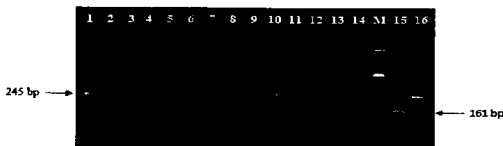
Hình 4 thể hiện độ nhạy của phương pháp mRT-PCR với các nồng độ pha loãng khác nhau sử dụng phương pháp multiplex PCR (mPCR) với cặp mồi đặc hiệu nhân gen ORF7 ở một chủng đại diện ký hiệu mẫu 1155 nhiễm bệnh PRRS. Mẫu này sau khi nhân đặc hiệu đoạn gen ORF7 có kích thước 372 bp được chuyển vào plasmide thông qua vector TOPO TA, sau đó tiến hành tách chiết DNA của Plasmide và đo nồng độ. Kết quả đo nồng độ gốc ban đầu là 1,87 ng/ μ l. Ở giếng thứ 8 nồng độ pha loãng là $1,87 \times 10^{-7}$ ng/ μ l vẫn phát hiện được bệnh. Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Yue và đồng tác giả (2009), ở nồng độ thấp nhất 1×10^{-7} có thể phát hiện dấu hiệu biểu hiện bệnh của virus PRRS (Yue *et al.*, 2009) [11]. Theo Liu và đồng tác giả (2011), giới hạn phát hiện của phương pháp PCR cho virus PRRS là $2,02 \times 10^{-5}$, và nồng độ 10^{-5} có thể phát hiện dấu hiệu biểu hiện bệnh (Liu *et al.*, 2011). Để dùng cho phương pháp chẩn đoán chúng tôi sử dụng mẫu phân lập ở nồng độ pha loãng $1,87 \times 10^{-7}$ ng/ μ l (Giếng 5).



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR gen ORF7 có kích thước 245 bp mẫu 1155 ở các nồng độ pha loãng 10 lần (nồng độ ban đầu là 1,87 ng/ μ l)

Kết quả chẩn đoán dựa vào phương pháp mRT-PCR

Chúng tôi tiến hành phân tích kiểm tra 158 mẫu có triệu chứng mắc virus PRRS phân lập ở Việt Nam dựa trên phương pháp mRT-PCR đã được tối ưu ở trên.



Hình 5. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm multiplex RT-PCR gen ORF7 sử dụng cặp mồi multiplex có kích thước 245 bp (chủng NA), 161 bp (chủng EU). M: marker 100 bp (Enzymomics), 1 -> 14 Mẫu phân lập; 15: Chủng đại diện LV; 16: Chủng đại diện VR2332.

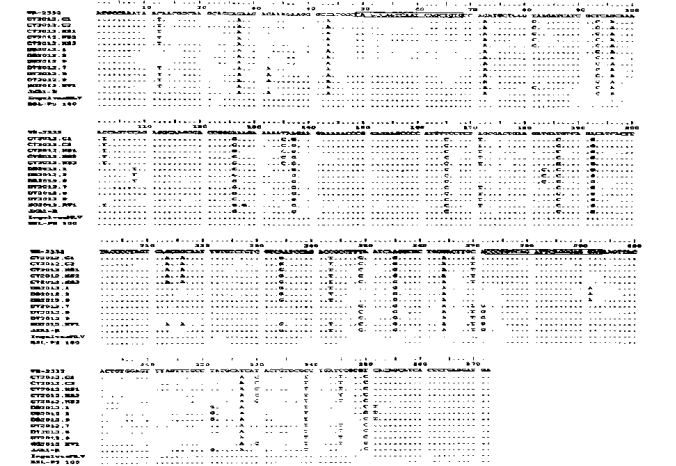
Kết quả chẩn đoán trên các mẫu thực địa thể hiện trên Hình 5. Ở giếng 1 -> 6, 9, 10, 12, 14 xuất hiện 1 băng DNA có kích thước phân tử 245 bp tương ứng với chủng NA; giếng 8 xuất hiện 1 băng DNA có kích thước phân tử 161 bp tương ứng với chủng EU; giếng 7, 11, 13 âm tính. Trong tổng số 158 mẫu có triệu chứng mắc virus PRRS phân lập ở Việt Nam, tỉ lệ nhiễm chủng NA rất cao chiếm 77,85% (n= 123), trong khi đó tỉ lệ nhiễm chủng EU thấp chỉ chiếm 1,27%

(n=2), và không thấy mẫu nào nhiễm cả 2 chủng NA +EU. Các mẫu âm tính (n=33) trong nghiên cứu này có thể do lượng virus PRRS lưu hành trong mẫu thấp mà bằng phương pháp mRT-PCR của chúng tôi không đủ độ nhạy để phát hiện. Kết quả chẩn đoán trên các mẫu thực địa (n= 158) thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2: Kết quả chẩn đoán trên 158 mẫu có triệu chứng mắc bệnh PRRSV phân lập ở Việt Nam

Vùng phân lập	Tổng số mẫu (n)	Số mẫu dương tính với PRRSV	Số mẫu âm tính với PRRSV
Điện Biên	9	6 (66,67%)	3 (33,33%)
Lâm Đồng	67	60 (89,55%)	7 (10,45%)
Cần Thơ, Đồng Tháp, Hậu Giang	12	12 (100%)	0 (0,00%)
Đồng Nai, TP Hồ Chí Minh	58	35 (60,34%)	23 (39,66%)
Bình Dương	12	12 (100%)	0 (0,00%)

Để xác nhận chính xác trình tự gen thuộc ORF7 khuếch đại bởi bộ mỗi thiết kế, chúng tôi tiến hành đọc giải trình tự đoạn gen ORF7 có kích thước 372 bp thuộc chủng NA. So sánh đoạn gen ORF7 của 12 mẫu đại diện phân lập năm 2012 với chủng VR2332, chủng vaccine JXA1-R, BSL-PS 100, IngelvacMLV. Kết quả so sánh các mẫu phân lập trong nước có sự khác biệt nhau ở 15 vị trí và so với các chủng của vaccine thì có 36 vị trí sai khác nhau (Hình 6).



Hình 6. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của gen ORF7 trên 12 mẫu đại diện phân lập trong nước năm 2012, chủng VR2332 và các chủng phân lập từ vaccine JXA1-R, BSL-PS 100, IngelvacMLV, trình tự trong khung là mỗi xuôi và mỗi ngược

Bộ mỗi thiết kế cho phản ứng multiplex RT-PCR nằm trong vùng gen ORF7, trình tự nucleotide của mỗi được đánh khung trên hình 6. Trình tự nucleotide của các mẫu phân lập đều có sự sai khác với các chủng phân lập của vaccine ở vị trí 24, 48, 78, 89, 144, 207, 216 (G ↔ A); 45, 117, 138 (T ↔ C). So sánh ở các chủng phân lập với nhau và so với các chủng phân lập từ vaccine thì các mẫu phân lập ở Điện Biên có 3 vị trí sai khác nhau đó là vị trí 60, 135 (T ↔ C), 243 (G ↔ A); Các mẫu phân lập ở Cần Thơ và Hậu Giang có 5 vị trí sai khác 33, 54, 87 (T ↔ C), 165, 168 (G ↔ A); Các mẫu phân lập ở Đồng Tháp có vị trí sai khác 223 (G ↔ A) và giống với chủng JXA1 phân lập từ vaccine của Trung Quốc. Ở Hậu Giang có 1 vị trí sai khác với tất cả các chủng virus phân lập đó là 80 (A ↔ G). Độ tương đồng nucleotide của virus PRRS ở 12 mẫu phân lập trong nước là 95,1 → 100%. So sánh với các chủng phân lập của vaccine sử dụng ở Việt Nam cho thấy, mức tương đồng về nucleotide cao với chủng vaccine của Trung Quốc JXA1-R (97,1 → 98,8%). Đối với chủng nguyên thủy VR2332, vaccine BSL-PS100 và IngelvacMLV mức tương đồng về nucleotide là 91,4 → 94,3%, sự khác nhau chiếm tỉ lệ 6,0 → 9,4%.

KẾT LUẬN

Đã thiết kế thành công bộ mỗi nhân đặc hiệu vùng gen ORF7 để phát hiện và định chủng virus phân lập được thuộc chủng Bắc Mỹ (245 bp). Châu Âu (161 bp). Độ nhạy của phương pháp cho phép phát hiện ở giới hạn nồng độ virus là $1,87 \times 10^{-4}$ ng/μl. Trong 158 mẫu có biểu hiện mắc bệnh PRRSV phân lập ở Việt Nam, sử dụng phương pháp của chúng

tỷ lệ dương tính với PRRSV là 79% (n=125), trong đó 123 mẫu thuộc chủng NA (77,85%) và 2 mẫu thuộc chủng EU (1,27%). Mẫu phân lập thuộc dòng Bắc Mỹ có độ tương đồng về nucleotide là 91,4 -> 94,3% so với chủng nguyên thủy VR2332.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu nhận được sự hỗ trợ kinh phí của Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ quốc gia (NAFOSTED) đề tài mã số 106.12-2010.05, đề tài nghiên cứu khoa học cấp tỉnh Lâm Đồng “Ứng dụng kỹ thuật RT-PCR để phát hiện sớm một số bệnh nguy hiểm trên gia súc nhằm nâng cao chất lượng đàn vật nuôi trên địa bàn tỉnh Lâm Đồng” năm 2012-2013. Nghiên cứu này sử dụng trang thiết bị thí nghiệm Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Andreyev VG, Wesley RD, Mengeling WL, Vorwald AC Lager KM (1997). Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch Virol* 142(5): 993-1001.

Edwards MC, Gibbs RA (1994). Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl* 3(4): S65-75.

Huang C, Hung JJ, Wu CY, Chien MS (2004). Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses. *Vet Microbiol* 101 (3): 209-214.

Long TT (2007). Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y* 3(14): 81-87

Lu S, Zhao Y, Hu Q, Lv C, Zhang C, Zhao R, Hu F, Lin W, Cui S (2011). A multiplex RT-PCR for rapid and simultaneous detection of porcine ischaemivir, classical swine fever virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens. *J Virol* 172(2): 88-92.

Meng XJ (2000). Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol* 74(4): 309-29

Mengeling WL, Brockmeier SL Lager KM (1994). Evaluation of a recombinant vaccinia virus containing pseudorabies (PR) virus glycoprotein genes gp50, gH, and gL as a PR vaccine for pigs. *Arch Virol* 134(3-4): 259-69.

Meulenber JJ, van Nieuwstadt AP, van Essen-Zandbergen A, Bos-de Ruijter JN, Langeveld JP Meleno RH (1998). Localization and fine mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein N of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with monoclonal antibodies. *Virology* 252(1): 106-14.

Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaborg KS (1999). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol* 73(1): 270-280.

Rowland RR, Schneider P, Fang Y, Wootton S, Yoo D Benfield DA (2003). Peptide domains involved in the localization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus. *Virology* 316(1): 135-45.

Yue F, Cui S, Zheng C, Yoon KJ (2009). A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine pseudorabies virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens. *Virus Genes* 38 (3): 392-397.

Xu X, Chen G, Huang Y, Ding L, Li ZC, Chang CD, Wang CY, Tong DW, Liu HJ (2012). Development of multiplex PCR for simultaneous detection of six swine DNA and RNA viruses. *J Virol* 183(1): 69-74.

MULTIPLEX RT-PCR FOR TYPING AND DETECTION OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS

Nguyen Thi Dieu Thuy^{1*}, Nguyen Thi Thu¹, Nguyen Van Cuong¹, Le Thi Thu Ha², Nguyen Giang Son³, Do Vo Anh Khoa⁴

¹Institute of Biotechnology

²Institute of Agricultural Science for Southern Viet Nam

³Institute of Ecology and Biological resources

⁴Colleague of Agriculture and Applied Biology, Can Tho University

SUMMARY

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is currently the most important agent causing the serious economic loss worldwide, including Viet Nam. PRRSV has been divided into two genotypes, the European (EU) and North American (NA) genotype, up to 40% of difference in their genomic sequence. In this study, multiplex RT-PCR was used for typing and detection of PRRSV circulating in Viet Nam. The specific primers were designed based on ORF7 gene sequence, coding for nuclear protein of PRRSV, in which, the forward primer was specific for both EU and NA genotypes and reverse primers were for EU, or NA genotype. The molecular sizes of the expected PCR products using specific primer pairs were 245 bp and 161 bp, respectively. The specificity of the method was tested via cross-reaction with the co-infected viruses, such as porcine circovirus 2 (PCV2) and classical swine fever virus (CSFV). The detection limit of the method was 1.87×10^{-4} ng/ul. Of 158 samples with clinical signs of PRRS infection isolated in Vietnam, positive samples were 125 samples (79.11%), in which, 123 samples were the NA genotype (77.85%) and only two samples were the EU genotype (1.27%). These results indicated the potential use of the multiplex RT-PCR for routine molecular diagnosis and genotyping of circulating PRRSV.

Keywords: Genotype, multiplex RT-PCR, detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

*Author for correspondence: ntdthuy@ibt.ac.vn