

NGHIÊN CỨU PHÁT HIỆN VI-RÚT ĐỐM TRẮNG (WSSV) TRÊN TÔM TẠI TỈNH CÀ MAU BẰNG NESTED PCR

STUDY TO DETECT WHITE SPOT SYNDROME VIRUS ON SHRIMP IN CA MAU PROVINCE BY NESTED PCR

Huỳnh Đăng Sang*, Thiên Thị Kim Kỳ, Hồ Thị Bích Trâm,
Phạm Thị Thu Hương, Huỳnh Thanh Trúc, Lê Đình Đôn

Viện Nghiên Cứu Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường - Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh
Email: dangsang0407@gmail.com

ABSTRACT

White spot syndrome virus (WSSV) is a serious viral pathogen responsible for severe economic loss to shrimp farmers. Mortality rate can be up to 100% within 7 - 10 days after infection. Therefore, there should be a procedure for early diagnosing of WSSV on shrimp seed and mature shrimp. The shrimp samples suspected of being infected with WSSV were collected in Cai Nuoc and Dam Doi districts of Ca Mau province. The protocol for WSSV detection on collected shrimp samples was carried out by nested PCR. The sequencing results showed that nested PCR procedure surveyed in this study was able to detect accurately WSSV in shrimp samples suspected of being infected with WSSV collected. This procedure had the sensitivity of 10^3 copies and the high specificity with WSSV. This protocol will be used to detect WSSV on shrimp.

Keywords: Camau province, detection, nested PCR, white spot syndrome virus.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự phát triển nhanh của nghề nuôi tôm đã đem lại lợi ích đáng kể về mặt kinh tế; với sản lượng năm 2011 là 482,2 nghìn tấn, chiếm 11,6% tổng sản lượng thủy sản toàn quốc (Theo thông tin từ Tổng Cục Thống kê năm 2011). Tuy nhiên khi nghề nuôi tôm được thâm canh hóa thì dịch bệnh xảy ra ngày càng nhiều nhất là bệnh do vi-rút gây ra. Theo cơ quan Quốc tế về Dịch bệnh Động vật (năm 1995), WSSV là vi-rút gây bệnh cực kỳ nghiêm trọng cho nghề nuôi tôm, vì tác nhân này có khả năng lây rất nhanh, có hệ ký chủ rộng (Bonilla *et al*, 2008), tỉ lệ tôm chết khi bị nhiễm bệnh có thể lên đến 80 – 100% sau 7 – 10 ngày nhiễm (Lightner, 1996). Theo thống kê của Chi cục Thú y tỉnh Cà Mau năm 2011, diện tích nuôi tôm đạt hơn 296.592 ha (tôm công nghiệp trên 3.398 ha, tôm quảng canh cải tiến 10.015 ha), chiếm 1/4 sản lượng tôm nuôi của cả nước. Diện tích tôm nuôi công nghiệp bị bệnh 538,85 ha (đốm trắng 86,33 ha, hoại tử gan tụy 452,53 ha). Hiện tại chưa có thuốc đặc hiệu để trị bệnh nên công tác phòng ngừa tổng hợp bao gồm tẩy trùng ao nuôi, ngăn cản sự xâm nhập của các sinh vật mang mầm bệnh vào ao nuôi và sử dụng tôm giống sạch bệnh được khuyến cáo như một biện pháp an toàn sinh học (Bonilla *et al*, 2008). Do đó cần có phương pháp phát hiện sớm sự hiện diện vi-rút gây bệnh trên đàn tôm giống trước khi thả nuôi và trên ao nuôi tôm công nghiệp nhằm hạn chế nguy cơ bùng phát dịch bệnh. Các phương pháp chẩn đoán truyền thống như quan sát dấu hiệu bệnh hay phương pháp mô bệnh học không cho phép phát hiện sớm và chính xác tác nhân gây bệnh. Nhiều phương pháp phân tử như lai *in situ*, western blot, PCR, nested PCR được phát triển nhằm khắc phục những nhược điểm trên (Trần Việt Tiên *et al*, 2008). Phương pháp PCR hiện đang được sử dụng rất rộng rãi và hiệu quả trong việc xét nghiệm tôm giống và nested PCR là một trong những cải tiến mới, có tính đặc hiệu và độ nhạy cao. Đề tài: “Nghiên cứu phát hiện vi-rút đốm trắng (WSSV) trên tôm tại tỉnh Cà Mau bằng nested PCR” được thực hiện nhằm phát triển quy trình PCR có độ chính xác cao, thời gian thực hiện ngắn để chẩn đoán WSSV.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Mẫu tôm nghi ngờ nhiễm WSSV được thu thập tại ao nuôi tôm công nghiệp tại huyện Cái Nước và huyện Đầm Dơi thuộc tỉnh Cà Mau.

Hóa chất

Hóa chất ly trích DNA: NaOH, SDS, TE 10X, Ethanol 70 %. Hóa chất PCR gồm *Taq* DNA polymerase, PCR buffer 10X, MgCl₂ 25 mM (hãng abm, Mỹ), dNTP 25 mM (hãng Geneon, Hàn Quốc), môi (hãng IDT), nước cất. Hóa chất điện di: Agarose (hãng abm, Mỹ), Ethiumbromide 10 mg/ml (hãng Sigma, Mỹ), loading dye, thang DNA 1000 bp (hãng abm, Mỹ), dung dịch đệm TBE 10X. Bộ kit tinh sạch DNA của hãng Promega (Wizard SV Gel and PCR Clean - Up System).

Thu mẫu và bảo quản mẫu

Mẫu tôm được thu thập tại các ao nuôi công nghiệp có triệu chứng bệnh đốm trắng tại huyện Đầm Dơi và Cái Nước tỉnh Cà Mau. Tôm thu được trữ trong cồn 95%.

Tách chiết DNA và thực hiện nested PCR

DNA tổng số được ly trích theo Kiatpathomchai *et al* (2001). Quá trình khuếch đại được thực hiện qua 2 bước với các cặp môi được thiết kế bởi Lo *et al* (1996). Thành phần phản ứng trong 25μl gồm: đệm PCR 2X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, môi 0,8 μM, *Taq* DNA polymerase 1,5U, DNA mẫu 1 μl. Chương trình nhiệt: 1 chu kỳ ở 94°C 4 phút, 55°C 1 phút, 72°C 2 phút; 39 chu kỳ 94°C 1 phút, 55°C 1 phút, 72°C 2 phút; bước kéo dài cuối cùng trong 5 phút ở 72°C. Sản phẩm khuếch đại được kiểm tra điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5%, trong thời gian 35 phút.

Trình tự đoạn môi sử dụng trong nghiên cứu (Lo *et al*, 1996)

Tên môi	Trình tự	Kích thước sản phẩm
Môi 146F1	5'-ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCTAG-3'	1447 bp
Môi 146R1	5'-TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A-3'	
Môi 146F2	5'-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A-3'	941 bp
Môi 146F2	5'-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3'	

Xác định độ tương đồng của WSSV thu thập tại tỉnh Cà Mau

Sản phẩm PCR dương tính khi thực hiện với cặp môi 146R1/146F1 được giải trình tự. Sử dụng công cụ BLAST của NCBI để khẳng định kết quả khuếch đại là trình tự WSSV và xác định mức tương đồng trình tự WSSV tại Cà Mau so với các trình tự khác đã công bố tại NCBI.

Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của quy trình nested PCR

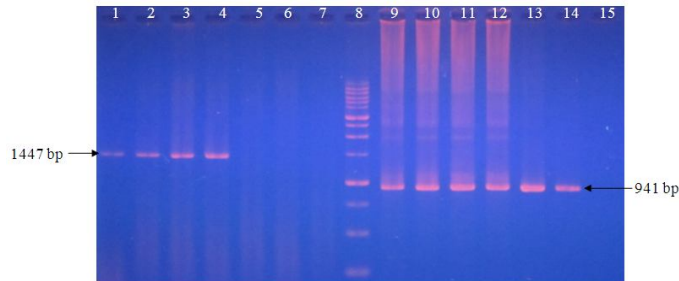
Chuẩn gốc WSSV-DNA để đánh giá độ nhạy được xây dựng dựa trên nghiên cứu của Sritunyalucksana *et al* (2006). Độ nhạy được xác định ở số bản sao cho băng DNA có độ sáng thấp nhất. Mẫu tôm đã xác định nhiễm WSSV và IHHNV được sử dụng để đánh giá độ đặc hiệu của quy trình.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

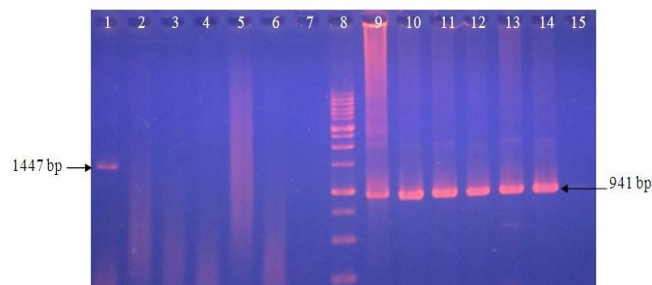
Thiết lập quy trình nested PCR có khả năng phát hiện WSSV

Trong nghiên cứu này, 10 mẫu tôm nghi ngờ nhiễm WSSV đã được thu thập tại 2 huyện Đầm Dơi và Cái Nước, tỉnh Cà Mau. Kết quả kiểm tra các mẫu thu thập bằng nested-PCR dựa trên 2 cặp môi 146 F1/146R1 và 146F2/146R2 cho thấy có sự hiện diện của WSSV trên 10 mẫu thu thập. Trong 5 mẫu thu thập từ huyện Đầm Dơi chỉ có 3 mẫu cho băng sáng rõ khi thực hiện với cặp môi 146F1/146R1 nhưng khi thực hiện với cặp môi 146F2/146R2 tất cả đều có băng sáng cùng kích thước với đối chứng dương (hình 1). Đối với 5 mẫu thu thập tại huyện Cái Nước, khi thực hiện với cặp môi 146F1/146R1 thì không có mẫu nào có băng nhưng tất cả đều có băng sáng khi thực hiện với cặp môi bên trong 146F2/146R2 (hình 2). Dựa trên kết quả thực hiện PCR bước 2, 10 mẫu tôm được thu thập trong nghiên cứu này đều nhiễm

WSSV. Điều đó cho thấy, nghiên cứu đã sử dụng các đoạn môi phù hợp và chính xác để khuếch đại trình tự WSSV. Khi thực hiện PCR bước 1 với cặp mồi 146F1/146R1 có những mẫu không có băng nhưng lại xuất hiện băng khi thực hiện với cặp mồi 146F2/146R2. Nguyên nhân là do lượng vi-rút hiện diện trong mẫu tôm ban đầu ít. Qua đó, cho thấy điều cần thiết phải thực hiện PCR bước 2 trong chẩn đoán để gia tăng độ nhạy và khả năng phát hiện chính xác sự hiện diện của tác nhân gây bệnh trong giai đoạn đầu của quá trình xâm nhiễm. Năm 2009, Trần Việt Tiên và Đặng Thị Hoàng Oanh đã phát triển quy trình multiplex PCR phát hiện đồng thời WSSV, IHNV. Để đánh giá sự hiện diện của WSSV, tác giả chỉ sử dụng cặp mồi 146F1/146R1 mà không sử dụng cặp mồi 146F2/146R2. Đây là hạn chế trong quy trình của tác giả vì có thể dẫn đến âm tính giả trong trường hợp sự hiện diện của WSSV trên tôm thấp.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại khi thực hiện nested PCR với mẫu tôm nghi ngờ nhiễm WSSV thu thập tại huyện Đầm Dơi. Giếng 1 và 9: đối chứng dương; giếng 7 và 15: đối chứng âm; giếng 2, 3, 4, 5, 6 sản phẩm mẫu khuếch đại với cặp mồi 146F1/146R1; giếng 10, 11, 12, 13, 14, sản phẩm mẫu khuếch đại với cặp mồi 146F2/146 R2; giếng 8: thang DNA 1000 bp.

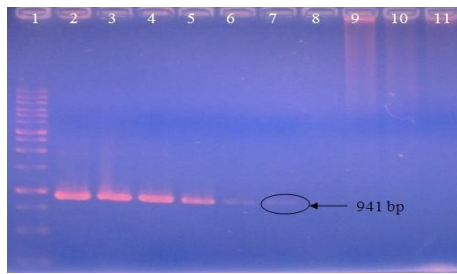


Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại khi thực hiện nested PCR với mẫu tôm nghi ngờ nhiễm WSSV thu thập tại huyện Cái Nước. Giếng 1 và 9: đối chứng dương; giếng 7 và 15: đối chứng âm; giếng 2, 3, 4, 5, 6 sản phẩm mẫu khuếch đại với cặp mồi 146 F1 và 146 R1; giếng 10, 11, 12, 13, 14, sản phẩm mẫu khuếch đại với cặp mồi 146 F2 và 146 R2; giếng 8: thang DNA 1000 bp.

Để khẳng định tính chính xác, sản phẩm PCR dương tính khi thực hiện với cặp mồi 146F1/146R1 được giải trình tự tại công ty Nam Khoa. Kết quả BLAST tại cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy trình tự được khuếch đại là WSSV. Đồng thời, WSSV thu thập tại huyện Đầm Dơi có độ tương đồng rất cao (99%) so với các công bố của WSSV tại ngân hàng gen như AF332093.1, AF369029.2, AF361753.1, AF440570.1, U50923.1. Kết quả được đăng ký trên ngân hàng gen với số hiệu JX564899.

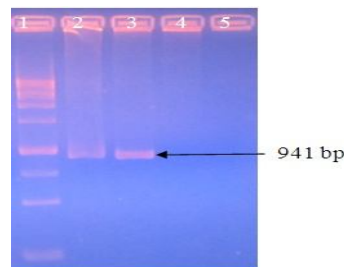
Độ nhạy và độ đặc hiệu của quy trình nested PCR

Kết quả xác định độ nhạy cho thấy độ nhạy của quy trình nested PCR đạt 10^3 bản sao (hình 3). Năm 2006, Sritunyalucksana *et al* đã xác định độ nhạy của quy trình nested PCR là 10^2 bản sao khi tiến hành trên chuẩn WSSV – DNA. Nguyên nhân của sự khác biệt có thể là do các nghiên cứu sử dụng *Taq* polymerase có hoạt tính khác nhau.



Hình 3. Độ nhạy của quy trình nested PCR phát hiện WSSV với chuẩn gốc WSSV - DNA. Giếng 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 tương ứng với số bản sao/ μ l 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 1; giếng 11: đối chứng âm, giếng 1: thang DNA 1000 bp.

Kết quả đánh giá độ đặc hiệu cho thấy quy trình có độ đặc hiệu cao với WSSV vì chỉ tạo sản phẩm khuếch đại với mẫu tôm nhiễm WSSV, với mẫu IHHNV thì không có (hình 4).



Hình 4. Kết quả điện di độ đặc hiệu của quy trình. Giếng 1: thang 1000 bp; giếng 2: đối chứng dương; giếng 3: mẫu tôm nhiễm WSSV; Giếng 4: mẫu tôm nhiễm IHHNV; giếng 5: đối chứng âm.

KẾT LUẬN

Thiết lập được quy trình nested PCR có khả năng phát hiện tôm nhiễm WSSV tại các ao thu thập mẫu của tỉnh Cà Mau. Trình tự của WSSV tỉnh Cà Mau có sự tương đồng cao (99%) so với các trình tự được công bố trên thế giới. Quy trình nested PCR có độ nhạy là 10^3 bản sao và có độ đặc hiệu cao với WSSV. Quy trình này sẽ được ứng dụng để kiểm tra sự hiện diện của WSSV trên mẫu tôm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Trần Việt Tiên và Đặng Thị Hoàng Oanh. 2009. Phát triển quy trình mPCR phát hiện đồng thời white spot syndrome virus, infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus ở tôm sú (*Penaeus monodon*) sử dụng gen β -actin làm nội chuẩn. *Kỷ yếu Hội Nghị Khoa Học Thủy Sản Toàn Quốc năm 2009*, 197 - 201.

Trần Việt Tiên, Trần Thị Mỹ Duyên và Đặng Thị Hoàng Oanh. 2008. Phát triển quy trình MRT – PCR phát hiện GAV (Gill-associated virus) và beta-actin ở tôm sú. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ* :176-180.

Bonilla E.C.M, Sanz V.A., Wille M, Sorgeloos P and Pensaert M.B. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*, 31, 1 - 18.

Kiatpathomchai W, Boonsaeng V, Tassanakajon A, Wongteerasupaya C, Jitrapakdee S and Panyim Sakol. 2001. A non-stop, single-tube, semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infection in *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 47:235-239.

Lightner D.V., 1996, A handbook of Pathology and Diagnostic Procedures of diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA

Lo, C.F., Leu, J.H., Ho, C.H., Chen, C.H., Peng, S.E., Chen, Y.T., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Huang, C.J., Chou, H.Y., Wang, C.H., Kou, G.H. 1996. Detection of baculovirus associated with white spots syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*. 25: 133–141.

Sritunyalucksana K., Srisala J., McColl K., Nielsen L. and Timothy W. Flegel. 2006. Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. *Aquaculture* 255: 95–104.