

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO QUE THỬ PHÁT HIỆN NHANH VIRUS GÂY BỆNH ĐÓM TRẮNG (WSSV) Ở TÔM NUÔI

Hoàng Thế Yên¹, Nguyễn Thị Nga¹, Phạm Thu Hương¹, Nguyễn Thị Hằng¹, Trần Minh Trí¹, Nguyễn Thành Đạt¹, Đỗ Thị Thảo², Hà Thị Thu², Nguyễn Giang An², Đinh Duy Kháng², Đinh Thương Văn², Lê Trọng Văn¹

¹Viện Kỹ thuật Hòa - Sinh và Tài liệu nghiệp vụ, Tổng cục Hậu cần Kỹ thuật, Bộ Công an

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Vinh

TÓM TẮT

Bệnh đốm trắng ở tôm do virus có tên là White Spot Syndrome Virus (WSSV) gây ra. Đây là bệnh rất nguy hiểm và phổ biến trong chăn nuôi thủy sản. Một số báo cáo đã chỉ ra rằng protein VP28 là một trong những protein có tính chất quan trọng trong việc lây nhiễm vào tôm. Khi virus nhiễm vào tôm protein này sẽ được biểu hiện và gây chết tôm. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày quá trình nghiên cứu chế tạo bộ kit phát hiện nhanh bệnh đốm trắng ở tôm dạng que thử (Lateral flow test). Que thử này được chế tạo dựa trên các kháng thể kháng VP28 được chế tạo tại Viện công nghệ sinh học. Protein VP28 của virus được giải phóng trong đệm nghiền mẫu sẽ kết hợp với kháng thể đơn dòng kháng VP28 gắn vàng để tạo lên một phức hợp. Phức hợp này di chuyển trên màng đến vùng test line và bị bắt giữ bởi một kháng thể kháng VP28 khác (theo dạng sandwich) để tạo ra vạch T (test line). Phức hợp tiếp tục di chuyển tiếp đến vùng C (control line) và bị bắt tại đây bằng một kháng thể đa dòng khác để tạo vạch C (control line). Kết quả là nếu mẫu tôm có chứa virus, trên màng sẽ tạo ra hai vạch màu tại C và T. Nếu trong mẫu không có virus (không có VP28), phức hợp dạng sandwich sẽ không hình thành tại vùng T kết quả trên màng chỉ xuất hiện một vạch tại C. Sau nhiều nghiên cứu, lựa chọn các nguyên liệu phù hợp, xác định các hệ đệm xử lý các màng, đệm blocking và tối ưu hóa nồng độ các sinh phẩm sử dụng trong que thử, hệ đệm tách mẫu, chúng tôi đã chế tạo được que bộ KIT có khả năng phát hiện nhanh virus gây bệnh đốm trắng ở tôm có giới hạn phát hiện 5 ng/ml, bao gồm hai thành phần chính: que thử (WSSV TEST) và ống tách mẫu chứa sẵn đệm xử lý mẫu. Bộ KIT có kết cấu đơn giản, cho kết quả trong vòng 15 phút, bảo quản nhiệt độ phòng.

Từ khóa: Chết bất giữ, virus bệnh đốm trắng, kit thử nhanh, WSSV, VP28

MỞ ĐẦU

Việt Nam là một trong số 10 nước xuất khẩu thủy sản hàng đầu thế giới. Năm 2008 xuất khẩu thủy sản đã đem lại cho đất nước 4,562 tỷ USD. Kim ngạch xuất khẩu thủy sản của Việt Nam cả năm 2009 đạt khoảng 4,3 tỷ USD. Dự đoán năm 2010 xuất khẩu thủy sản đạt 4,8 tỷ USD. Sản lượng thủy sản năm 2009 ước tính đạt 4847,6 nghìn tấn. Tuy nhiên diện tích nuôi tôm sú năm 2009 ước tính đạt 549,1 nghìn ha, giảm 10,7% so với năm trước, ngành công nghiệp này đang bị tổn thất nghiêm trọng bởi dịch bệnh, đặc biệt là dịch bệnh do virus gây ra. Trong số các nhóm virus gây bệnh cho tôm, tác nhân quan trọng được quan tâm đặc biệt, là virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV). Virus gây bệnh đốm trắng ở tôm có dạng hình trứng, có màng bao, các virion có đuôi. Với 2 loại protein màng bao là VP28 và VP29, 3 loại nucleocapsid protein là VP15, VP24 và VP26 (Tsay et al., 2004; 2006).

Hiện nay có nhiều phương pháp sử dụng trong chẩn đoán bệnh đốm trắng tôm: phương pháp mô học truyền thống, huyết học, ELISA, các kỹ thuật ứng dụng của PCR (Polymerase Chain Reaction), Realtime PCR... Trong đó các kỹ thuật ứng dụng của PCR được xem là có hiệu quả nhất, do có độ nhạy và độ chính xác cao, có thể định lượng virus, lượng mẫu cần phân tích rất ít so với các phương pháp khác trong phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, kỹ thuật này khó triển khai rộng và tiến hành trực tiếp tại cơ sở sản xuất vì đòi hỏi trang bị kỹ thuật và kỹ thuật viên lành nghề.

Trong những năm gần đây, một số nước (Nhật Bản, Thái Lan, Indonesia) đặc biệt, các nhà khoa học Thái Lan đã nghiên cứu sản xuất thành công kháng thể đơn dòng kháng VP28 của WSSV và sử dụng để chế tạo que thử phát hiện nhanh bệnh đốm trắng trên tôm nuôi (Makesh et al., 2006, Sithigorngul et al. 2006). Ở Việt Nam, các que thử này hiện nay đang

phải nhập ngoại với giá thành rất cao (10 - 15 USD/test) do vậy khá nặng áp dụng thực tế rất khó khăn.

Để giải quyết vấn đề này, chúng tôi đã đặt vấn đề nghiên cứu chế tạo que thử trên cơ sở nghiên cứu tự chủ động tạo ra các sinh phẩm (kháng thể) với mục đích là chế tạo được bộ KIT tương tự của nước ngoài.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu và hóa chất

Protein VP28 tái tổ hợp của Viện Công nghệ sinh học. Tôm sú bị bệnh đốm trắng lấy từ một số đầm nuôi tôm: Hải Phòng, Nghệ An, Hà Tĩnh, Bà Rịa - Vũng Tàu. Kháng thể đơn dòng kháng protein VP28 clone 1 và kháng thể đơn dòng kháng VP28 clone 2 : Viện Công nghệ sinh học. Kháng thể đa dòng goat anti-mouse của hãng Arista (Mỹ). Màng nitrocellulose của hãng MDI. Hóa chất sử dụng cho các đệm mua của Sigma, Merck. Các loại nguyên liệu: màng PE phức hợp, chất bảo quản, và một số nguyên liệu trong nước.

Phương pháp nghiên cứu

Các phương pháp nghiên cứu sử dụng trong chế tạo KIT WSSV theo bản quyền công nghệ của hãng Arista (Mỹ). Cụ thể cần phải tiến hành lần lượt các nghiên cứu sau:

Phương pháp thử nghiệm lựa chọn nguyên liệu phù hợp

Các nguyên liệu sử dụng trong chế tạo có nhiều loại, nhiều nguồn gốc và tính năng kỹ thuật khác nhau. Mỗi loại que thử xác định cần phải tiến hành thử nghiệm để chọn được các loại nguyên liệu phù hợp. Bên cạnh đó với mỗi loại màng cần phải xử lý bằng đệm trước khi đưa kháng thể lên. Hệ đệm và quy trình xử lý riêng cho mỗi loại màng cũng cần phải xác lập (Jemo, 1996).

Phương pháp tối ưu các sinh phẩm trải trên màng

Tối ưu hóa nồng độ chất bắt giữ tại vạch T và vạch C: Chất bắt giữ tại vạch C được pha trong đệm phosphate buffer saline (PBS) 10 mM có pH 7,4 (Jemo, Byungwoo 1996) với nồng độ khác nhau 2,5; 2; 1,5; 1; 0,5; 0,1 mg/ml. Chất bắt giữ tại vạch T cũng được pha trong hệ đệm PBS có nồng độ 0.1M pH 7,4 thành các nồng độ khác nhau; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,5; 0,1 mg/ml. Màng sau khi trải sinh phẩm lên trên sẽ được khóa các liên kết không đặc hiệu bằng dung

dịch block phosphate buffer saline bổ sung bovine serum albumine (Fishers, 1998). Kết quả được xác định bằng cường độ vạch màu trên màng nitrocellulose tại vạch T và vạch C.

Tối ưu hóa lượng kháng thể cộng hợp vàng: Lượng kháng thể trên màng mang chất cộng hợp vàng được xác định bằng cách pha loãng ở các tỷ lệ khác nhau, thử nghiệm phản ứng miễn dịch kháng nguyên với kháng thể đặc hiệu trên màng nitrocellulose và chọn tỷ lệ phù hợp nhất bằng cách so sánh cường độ biểu hiện màu trên hai vạch T và vạch C.

Phương pháp xây dựng qui trình chế tạo que thử

Trên cơ sở các số liệu nghiên cứu, tối ưu và các nguyên liệu phù hợp đã lựa chọn để xây dựng qui trình chế tạo que thử WSSV với hệ thống thiết bị ở qui mô phòng thí nghiệm.

Phương pháp xác định thông số kỹ thuật của que thử

Giới hạn phát hiện: Protein VP28 có nồng độ xác định được định lượng bằng phương pháp Bradford được pha loãng các nồng độ. Xác định ngưỡng của que thử là nồng độ VP28 thấp nhất mà que cho kết quả dương tính (xuất hiện hai vạch T và C).

Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu: Phép thử được lặp đi lặp lại số lượng mẫu thực tế nhất định, cả tôm nhiễm bệnh và tôm không nhiễm bệnh (các mẫu này đã được kiểm chứng bằng phương pháp PCR) để xác định khả năng cho âm tính giả và dương tính giả. Kết quả được tính ra tỷ lệ phần trăm

Xác định khả năng phản ứng chéo: Que thử được kiểm tra với một số loại bệnh tôm khác như: MBV, HPV, YHV để xác định khả năng phản ứng chéo.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tối ưu hóa nồng độ chất bắt giữ tại vạch T và vạch C

Kháng thể goat anti-mouse nồng độ 5,5 mg/ml pha trong đệm PBS thành các nồng độ 2,5; 2; 1,5; 1; 0,5; 0,1 mg/ml sử dụng máy chuyên dụng trải lên vạch C của màng nitrocellulose. Kháng thể monoclonal anti-VP28 antibody có nồng độ 30 ng/ml cũng được pha loãng ở nồng độ tương tự

trong đệm PBS 7.4 được đưa lên màng tại vị trí vạch T. Sau khi đưa hai sinh phẩm lên màng nitrocellulose, màng sẽ được ủ qua đệm tại nhiệt độ 37°C, độ ẩm 10%.

Các màng được lắp ráp theo trình tự để tạo test và thử nghiệm với dung dịch protein VP28 ở nồng

độ 1 mg/ml

Kết quả trên (Hình 1) cho thấy nồng độ chất bắt giữ tại vạch T và vạch C trong khoảng 2; 2,5 mg/ml cho kết quả hiện hai vạch T và vạch C là tốt nhất, thể hiện rõ nét. Ở các nồng độ cao hơn là không cần thiết vì lượng nhiều hơn sẽ gây lãng phí kháng thể không cần thiết. Chúng tôi chọn nồng độ 2,5 mg/ml.



Hình 1. Nồng độ chất bắt giữ vạch tại T và C. A 2,5 mg/ml; B 2 mg/ml; C 1,5 mg/ml; D 1 mg/ml; E 0,5 mg/ml; F 0,1 mg/ml.

Tối ưu hóa nồng độ kháng thể đơn dòng cộng hợp vàng

Kháng thể cộng hợp vàng được pha trong đệm PBS có pH 7,4 có tỷ lệ pha loãng khác nhau: (1 : 5); (1 : 10); (1 : 15); (1 : 20); (1 : 25); (1 : 30). Dùng máy trải mỗi tỷ lệ lên một đoạn màng chứa chất công hợp. Sấy và bảo quản tránh ẩm và ánh sáng. Màng hút mẫu được xử lý bằng đệm PBS 0.01M có pH 8,5 bổ sung SDS 0.001%. Sấy khô. Hoàn thiện que thử

sau đó thử với mẫu. Các màng được lắp ráp theo trình tự để tạo test và thử nghiệm với dung dịch protein VP28 ở nồng độ 1 mg/ml.

Trong các tỷ lệ pha loãng (Hình 2) chúng tôi chọn tỷ lệ (1:10) cho chất cộng hợp. Các tỷ lệ thấp hơn đều không đảm bảo lượng vàng trên hai vạch T và vạch C. Các tỷ lệ cao hơn cho thấy không cần thiết hai vạch T và C không rõ nét hơn và hóa chất sử dụng nhiều hơn.



Hình 2. Tỷ lệ kháng thể cộng hợp vàng tối ưu cho que thử WSSV. A (1:5); B (1 : 10); C (1:20); D (1 : 25); E (1 : 30).

Xác định giới hạn phát hiện của test

Trong đó mẫu M1 là mẫu nước cất 2 lần, M1 đến M9 có nồng độ protein VP28 tương ứng

Kết quả ở bảng 1 cho thấy tại nồng độ 2,5 ng/ml có 1 phép thử cho kết quả xuất hiện vạch T nhưng không rõ nét nên tạm gọi là dương tính, các que thử còn lại không xuất hiện vạch T

Tại nồng độ protein 5 ng/ml kết quả cho thấy 100% xuất hiện vạch T trên que thử. Như vậy, giới

hạn phát hiện của que thử tính theo nồng độ kháng nguyên tương ứng là 5 ng/ml.

Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu

Một số mẫu tôm được xác định là nhiễm bệnh đốm trắng được lấy từ các đầm nuôi tôm và xác định bằng PCR đã nhiễm virus WSSV.

Như vậy bước đầu thử nghiệm trên 17 mẫu kết quả đều chính xác không cho dương tính giả và âm tính giả. Có thể xác định khả năng dương tính thấp.

Xác định khả năng phản ứng chéo của que thử với một số loại virus bệnh tôm khác MBV, IIPV, YHV. Các mẫu bệnh tôm được thu thập từ thực tế.

Kết quả cho thấy trong số các mẫu bệnh tôm mang virus khác đều cho kết quả âm tính. Như vậy que thử chế tạo có tính đặc hiệu với WSSV.

Bảng 1. Kết quả xác định giới hạn phát hiện của test

Mẫu	Hàm lượng Protein VP28 (ng/ml)	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6
M 1	0	-	-	-	-	-	-
M 2	60						
M 3	40						
M 4	20						
M 5	10						
M 6	8						
M 7	5						
M 8	2.5						
M 9	1	-	-	-	-	-	-

Bảng 2. Kết quả xác định mức độ dương tính giả và âm tính giả

Mẫu	Số lượng	Kết quả	
		Dương tính	Âm tính
Mẫu nhiễm virus được xác định bằng PCR	4	4	0
Mẫu không mang virus được xác định bằng PCR	13	0	13
Tổng	17	4	13

Bảng 3. Phản ứng chéo của que thử đối với một số virus khác

Tên virus gây bệnh	Kết quả ở các lần lặp lại						
	1	2	3	4	5	6	7
WSSV							
MBV							
HPV							
YHV	-	-	-	-	-	-	-

KẾT LUẬN

Lần đầu tiên ở Việt Nam đã chế tạo thành công que thử phát hiện virus đốm trắng. Cách sử dụng đơn giản, chỉ cần 15 phút có kết quả xác định tôm có bị nhiễm virus đốm trắng hay không với nồng độ các kháng thể tối ưu tại vạch T và vạch C là 2,5 mg/ml,

tỷ lệ pha loãng kháng thể cộng hợp vàng là (1:10).

Xác định được các nguyên liệu, các hệ đệm và qui trình xử lý tương ứng cho mỗi loại màng để đi đến chế tạo que thử nhanh WSSV với chi tiêu kỹ thuật như sau: Giới hạn phát hiện 5 ng/ml; không có phản ứng chéo với các bệnh về tôm khác như MBV, HPV, YHV.

Lời cảm ơn: Nhóm đề tài xin chân thành cảm ơn Chương trình đề tài cấp nhà nước KC06.16 đã giúp đỡ kinh phí để chúng tôi hoàn thành nội dung nghiên cứu của đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Fishers (1998) Immunochromatographic, Lateral Flow or Strip Tests Development Ideas. Provided by Bangs Laboratories Inc. 9025 Technology Drive, IN 46038-7034 3-5.

Han-Ching Wang, Hao-Ching Wang, Guang-Hsiung Kou, Chu-Fang Lo, Wei-Pang Huang (2007) Identification of icp11, the most highly expressed gene of shrimp white spot syndrome virus (WSSV) *Dis Aquat Org* 74: 179-189.

Jemo K, Byungwoo Y, Young H (1996) Immunoassay devices and materials. United States Patent. *Patent No US 5,559,041*.

Judith F. Tenafly N (1995) Method and device for detecting the presence of analyte in a sample. United States Patent. *Patent No US 5,451,504*.

Julian G, Shanfun C, Patricia A.B (2003) Process for immunochromatography with colloidal particles. *US*

Patent No. 46171.

Qing-yu Cheng, Xiao-lin Meng, Jin-ping Xu, Wei Lu, Jian Wang (2007) Development of lateral flow immunoassay for wssv with polyclonal antibodies raised against recombinant VP (19+28) Fusion protein. *Viro. Sin* 22: 61-67.

KD Jones (1999) Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes Part 1: Principles, *IVD Technology* 5, no. 2 (1999): 32-41.

Krishnamoorthy S, Makhijani V, Lei M, Giridharan M, Tisone T (2000) Computational Studies of Membrane-Based Test Formats. MSM 2000. *CFD Research Corporation, U.S.A ISBN: 0-9666135-7-0*.

Nazareth (2001) Diagnostic detection device and method. *United States Patent. Patent No US 6,319,676 B1*.

Tsai JM, Wang HC, Leu JH, Hsiao HH, Wang AH, Kou GH, Lo CF (2004) Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus. *J Virol* 78: 11360-11370

Tsai JM, Wang HC, Leu JH, Wang AH, Zhuang Y, Walker PJ, Kou GH, Lo CF (2006) Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *J Virol* 80: 3021-3029.

DETECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS IN SHRIMP BY USING A RAPID TEST

Hoang The Yen¹, Nguyen Thi Nga¹, Nguyen Thi Hang¹, Pham Thu Huong¹, Tran Minh Tri¹, Nguyen Thanh Dat¹, Do Thi Thao², Ha Thi Thu², Nguyen Giang An³, Dinh Duy Khang², Dinh Thuong Van^{1,*}, Le Trong Van¹

¹Institute of Chemistry-Biology and Professional Document Technique

²Institute of Biotechnology

³Vinh University

SUMMARY

White spot syndrome virus is very popular in shrimp. It is a dangerous disease. Some studies reported that protein VP28 is one of proteins acting as a key factor to infect the shrimp. When the virus infect into shrimps these proteins will be expression and shrimps will be die. This article reported an immunochromatography device based on the principle of sandwich assay (lateral flow test). This test were developed by using monoclonal anti - VP28 antibodies which produced by Institute of Biotechnology. The protein VP28 in the shrimp was captured by a monoclonal anti-VP28 antibody gold conjugated in the conjugate pad. This complex will be captured by other monoclonal anti - VP28 coated on the nitrocellulose membrane, so T line appear. When an amount of the extracted sample was applied to the sample pad, the solution migrates by capillary action through the test strip. If it was negative (without VP28 protein in sample), the T line disappeared. If it was positive (with VP28 protein), the T line developed in the T region. This method had high sensitivity and specificity. Result was read rapidly in 15 minutes. We chose several appropriate conditions as: concentration of

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37563386; Fax: 84-4-37914815; E-mail: thuongvan57@yahoo.co.uk

capture reagents on test line and control line, concentration of colloidal conjugated gold on the conjugate pad, treated sample pad, sample extract buffer to make a rapid test. We successfully created a rapid test to detect wssv in shrimp. The limit of detection of VP28 is 5 ng/ml. Reading results are set at 15 minutes. We also make a sample extractor which is simple and activities in the field. Store the test below room temperature.

Keywords: *capture reagents, lateral flow test, immunochromatography, rapid test, VP28, WSSV*