

THIẾT LẬP VÀ TỐI ƯU HOÁ QUY TRÌNH REALTIME PCR PHÁT HIỆN DECAPOD IRIDESCENT VIRUS 1 GÂY BỆNH TRÊN TÔM

Nguyễn Thị Huyền¹, Nguyễn Thị Kim Oanh¹, Vũ Đăng Thắng¹,
Nguyễn Đăng Hồng Ngọc¹, Nguyễn Thanh Loan¹, Âu Xuân Khoa¹,
Vũ Thị Lan Hương¹, Nguyễn Thị Thúy Mận¹, Trương Đình Hoài^{2*}

¹Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương
²Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: tdhoai@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 28.07.2023

Ngày chấp nhận đăng: 26.01.2024

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện để thiết lập, tối ưu hoá quy trình realtime PCR phục vụ chẩn đoán và kiểm soát bệnh DIV1 trên tôm. Mẫu plasmid chứa hai đoạn gen đích của DIV1 là MCP và ATPase được sử dụng để thiết lập và tối ưu hoá quy trình với lượng mỗi dò probe ở các nồng độ 0,1; 0,15 và 0,2 μ M. Độ nhạy, hiệu suất, mức độ đặc hiệu, mức độ ổn định giữa các lần xét nghiệm và kết quả đối sánh liên phòng thí nghiệm được chuẩn hoá trong và ngoài nước được sử dụng để đánh giá hiệu quả và giá trị sử dụng của quy trình. Kết quả nghiên cứu cho thấy quy trình realtime PCR ở nồng độ mỗi dò 0,2 μ M cho thấy khả năng phát hiện tối ưu nhất. Giới hạn phát hiện của phản ứng lần lượt là 13,6 và 14,3 bản sao plasmid/phản ứng, hiệu suất lần lượt là 98,9% và 92,6%. Phản ứng có độ đặc hiệu cao (không có phản ứng với các mẫu tôm dương tính với WSSV, IHNV, AHPND, EHP) và ổn định (CV < 15%). Kết quả nghiên cứu cho thấy hai quy trình realtime PCR sử dụng plasmid chứa gen MCP và ATPase đã được thiết lập và tối ưu hoá trong nghiên cứu này đảm bảo độ tin cậy và có thể ứng dụng để tầm soát và kiểm soát bệnh DIV1 cho các phòng thí nghiệm tại Việt Nam.

Từ khoá: Realtime PCR, thiết lập, tối ưu, plasmid, DIV1.

Establishment and Optimization of Realtime PCR Assays for Detecting Disease in Shrimp Caused by Decapod Iridescent Virus 1

ABSTRACT

The study was conducted to establish, optimize and validate the real-time PCR assay for the detection of Decapod iridescent virus 1 (DIV1) and control of this disease in shrimp. The plasmid samples containing two target genes MCP and ATPase of DIV1 were used to establish and optimize the procedure using different probe concentrations 0.1, 0.15 and 0.2 μ M. The sensitivity, performance, specificity, inter-assay stability, and interlaboratory matching results from nationally and internationally standardized laboratories were used to evaluate the efficacy and validity of these real-time PCR assays. The results of real-time PCR using plasmids containing target MCP and ATPase genes at a probe concentration of 0.2 μ M revealed the best detection ability. The reaction detection limits were 13.6 and 14.3 plasmid copies/reaction with the efficiency at 98.9% and 92.6%, respectively. The assays exhibited high specificity (no reaction to all shrimp-positive samples for WSSV, IHNV, AHPND, and EHP) and high stability (CV < 15%). The study results showed that two real-time PCR assays using plasmids carrying target MCP and ATPase genes of DIV1 established in this study could ensure reliability and applicability to laboratories for screening and controlling DIV1 disease in Vietnam.

Keywords: Real-time PCR, procedure establishment, optimization, MCP and ATPase genes, plasmids, DIV1.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Decapod Iridescent Virus 1 (DIV1) được

phát hiện lần đầu tiên vào đầu năm 2014 trên tôm càng đỏ (*Cherax quadricarinatus*) tại tỉnh Phúc Kiến (Fujian) của Trung Quốc (Xu & cs.,

2016). Sau đó DIV1 được xác định là nguyên nhân gây chết hàng loạt tôm chân trắng ở một số tỉnh ven biển của Trung Quốc. Kết quả giám sát trong năm 2017-2018 đã phát hiện được DIV 1 ở 11 trong số 16 tỉnh của Trung Quốc. Năm 2019, bệnh do DIV1 xảy ra nghiêm trọng ở toàn bộ lưu vực Đồng bằng Châu Giang. Tháng 2 năm 2020 bệnh xuất hiện trở lại ở tỉnh ở Quảng Đông, thủ phủ nuôi tôm ở Trung Quốc, ảnh hưởng đến 25% diện tích tôm nuôi trong vùng (NACA, 2020). Tháng 7 năm 2020, DIV1 đã phát hiện được ở còng tôm đỏ, tôm chân trắng và tôm sú nuôi tại Đài Loan (OIE, 2020b). Các loài tôm mẫn cảm với virus DIV1 bao gồm tôm nước lợ, nước mặn và tôm nước ngọt như tôm chân trắng (*Penaeus vannamei*), tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*), tôm càng đỏ (tôm càng Úc) (*Cherax quadricarinatus*), tôm hùm nước ngọt hay tôm hùm đất (*Procambarus clarkia*), tôm càng sông (*Macrobrachium nipponense*) và tôm gai (*Exopalaemon carinicauda*), tôm sú (*Penaeus monodon*), tôm thẻ Nhật (*Panulirus japonicus*) (Chen & cs., 2019; OIE, 2020a; Qiu & cs., 2023).

Một số nước nuôi tôm phát triển hoặc nhập khẩu nhiều tôm quy định phải có kiểm dịch DIV1 âm tính ở tôm nhập khẩu (Hàn Quốc, Úc, New Zealand) (Biosecurity New Zealand, 2022) và một số bang ở Mỹ yêu cầu tôm vận chuyển nội địa phải có chứng nhận DIV1 âm tính (USAD, 2022). Mạng lưới Trung tâm Nuôi trồng thủy sản châu Á Thái Bình Dương (NACA) và Tổ chức Thú y thế giới (OIE-WOAH) đã xếp bệnh do DIV1 trong danh mục bệnh truyền nhiễm phải báo cáo (NACA, 2019; WOAH, 2022.). Theo khuyến cáo của NACA, ở cấp khu vực và quốc gia cần tăng cường năng lực cho việc xây dựng quy trình chẩn đoán, xét nghiệm virus DIV1 và đây là công cụ hữu hiệu để giám sát, kiểm dịch tôm giống và phát hiện sớm dịch bệnh (NACA, 2020). Từ thông tin về tình hình dịch bệnh do virus DIV1 trên tôm từ Trung Quốc, OIE và NACA khuyến cáo các nước trong khu vực về nguy cơ xâm nhiễm của DIV1. Do vậy, Việt Nam cần phải phát triển được phương pháp xét nghiệm DIV1 sớm để

thực hiện các biện pháp tầm soát, kiểm soát bệnh, đặc biệt ở tôm giống, tôm bố mẹ và sản phẩm nhập khẩu từ các nước có nguy cơ lây lan mầm bệnh vào Việt Nam, cũng như xét nghiệm, chứng nhận các lô tôm xuất khẩu tới các nước có yêu cầu sản phẩm tôm không nhiễm DIV1. Nhìn chung, triệu chứng lâm sàng và bệnh tích đại thể của bệnh do DIV1 không điển hình và có nhiều đặc điểm giống với các bệnh phổ biến ở tôm, đặc biệt ở tôm chân trắng, vì vậy các phương pháp chẩn đoán, xét nghiệm trong phòng thí nghiệm đã được các nhà khoa học nghiên cứu, phát triển nhằm phát hiện chính xác virus DIV1 như Nested PCR (Qiu & cs., 2017), Recombinase polymerase amplification (RPA) (Chen & cs., 2020), tuy nhiên phương pháp realtime PCR có nhiều ưu điểm như độ nhạy cao, đánh giá được mức độ nhiễm nặng nhẹ của mẫu.

Một trong những khó khăn hiện nay là việc tiếp cận mẫu dương tính gặp khó khăn vì chưa có báo cáo nào về bệnh DIV1 ở Việt Nam. Nếu đưa mẫu virus dương tính vào để nghiên cứu, xây dựng quy trình xét nghiệm ở Việt Nam cũng tiềm ẩn nguy cơ lây lan mầm bệnh. Nghiên cứu này được thực hiện để thiết lập và tối ưu hoá quy trình xét nghiệm bằng realtime PCR sử dụng plasmid chứa đoạn gen đích của virus DIV1 là biện pháp tối ưu nhất hiện nay.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Plasmid pUC57-DIV1 và Plasmid pUC-GW-Kan chứa đoạn gen đích của DIV1.
- Đối chứng âm là DNA tách chiết từ tôm sạch bệnh SPF của tập đoàn Việt Úc
- Mẫu tôm dương tính các bệnh đốm trắng (WSSV), hoại tử gan tụy cấp (AHPND), vi bào tử trùng (EHP), hoại tử cơ quan tạo máu và cơ quan lập biểu mô (IHHNV) để đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp.
- Kit nhân gen QuantiTectR Probe PCR Kit (Qiagen); máy realtime (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System) và các nguyên vật liệu, hóa chất thiết bị phù hợp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tối ưu hoá quy trình xét nghiệm realtime PCR sử dụng plasmid-DNA

Trong nghiên cứu, từ việc tham khảo hai quy trình realtime PCR gốc của Qiu & cs. (2018; 2020) sử dụng hai gene major capsid protein (MCP) và ATPase (đây là hai gene đặc trưng và có vai trò quan trọng trong phân tích phả hệ và so sánh giữa các loài virus), chúng tôi tiến hành thiết lập, tối ưu hoá phương pháp realtime PCR sử dụng plasmid DNA.

- Phản ứng DIV1-MCP- real-time PCR phát hiện gene đích MCP của DIV1 sử dụng Plasmid pUC57-DIV1 chứa đựng gen MCP của DIV1 độ dài 200bp ($6,81 \times 10^{11}$ bản sao) được cloning và tổng hợp bởi Công ty Genewiz Inc (South Plainfield, Hoa Kỳ) với clone ID là ZB 1922-3/N429463.

- Phản ứng DIV1-ATPase real-time PCR phát hiện gene đích ATPase của DIV1 sử dụng Plasmid pUC-GW-Kan chứa đựng gen ATPase của DIV1 có độ dài 620bp ($5,71 \times 10^{11}$ bản sao)

được cloning và tổng hợp bởi Công ty Genewiz Inc. (South Plainfield, Hoa Kỳ) với clone ID là LB6855-6/A663496.

- Số lượng bản sao (copy) của plasmid trong mẫu chuẩn được xác định theo hướng dẫn tại Website: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>. Mỗi bản sao plasmid đại diện cho 1 gene đích hay 1 virus.

Các cặp mồi và probe tương ứng với hai phương pháp DIV1-MCP- real-time PCR và DIV1-ATPase real-time PCR sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở bảng 1.

Theo hướng dẫn sử dụng kit nhân gen QuantitectR Probe PCR, nồng độ cuối cùng của probe có thể sử dụng từ 0,1 μ M đến 0,2 μ M. Trong nghiên cứu này, tiến hành thử nghiệm tối ưu hóa phản ứng real time PCR với 03 quy trình phản ứng tương ứng với nồng độ cuối cùng của probe lần lượt là 0,1 μ M; 0,15 μ M; 0,2 μ M, với nồng độ plasmid pUC57-DIV1 và pUC-GW-Kan được pha loãng theo dãy từ 10^0 tới 10^5 lần pha loãng. Quy trình tối ưu hoá sử dụng cùng lượng Plasmid DNA và thay đổi hàm lượng probe được mô tả ở bảng 2.

Bảng 1. Trình tự nucleotide của cặp mồi và đoạn dò (probe) cho phản ứng real time PCR

| Phương pháp | Tên mồi/dò | Trình tự nucleotide | Nguồn |
|---|-----------------|--|------------------|
| Real-time PCR (DIV1-MCP- real-time PCR) | 142F | 5'-AAT CCA TGC AAG GTT CCT CAG G-3' | Qiu & cs. (2020) |
| | 142R | 5'-CAA TCA ACA TGT CGC GGT GAA C-3' | |
| | Probe | 5'-6 FAM-CCA TAC GTG CTCGCT CGG CTT CGG-TAMRA-3' | |
| Real-time PCR (DIV1-ATPase- real-timePCR) | SHIV-F | 5'-AGG AGA GGG AAA TAACGG GAA AAC-3' | Qiu & cs. (2018) |
| | SHIV-R | 5'-CGT CAG CAT TTG GTT CAT CCA TG-3' | |
| | SHIV- P (Probe) | 5'- FAM-CTG CCC ATC TAA CAC CAT CTC CCG CCC- TAMRA -3' | |

Bảng 2. Các quy trình giám định DIV1 bằng Plasmid DNA với nồng độ probe khác nhau*

| Thành phần | QT1-probe 0,1 μ M | QT2-probe 0,15 μ M | QT3-probe 0,2 μ M |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| Nước cất | 17.5 | 17.25 | 17 |
| 2X Reaction Mix | 25 | 25 | 25 |
| Mồi xuôi 142F (20 μ M) | 1 | 1 | 1 |
| Mồi ngược 142R (20 μ M) | 1 | 1 | 1 |
| Probe(10 μ M) | 0,5 | 0,75 | 1 |
| Đối chứng âm DNA (tôm SPF) | 3 | 3 | 3 |
| DNA (plasmid) | 2 | 2 | 2 |
| Tổng | 50 | 50 | 50 |

Ghi chú: *: Chu trình nhiệt cho phản ứng realtime PCR theo hướng dẫn của Kit nhân gen QuantiTectR Probe PCR Kit (Qiagen): 50°C - 2 phút, 95°C - 15 phút, 40 chu kỳ: 95°C - 15 giây 60°C - 60 giây.

2.2.2. Phương pháp đánh giá, xác nhận giá trị sử dụng quy trình

Độ nhạy phân tích

Độ nhạy phân tích được xác định thông qua giới hạn phát hiện (LOD - limit of detection) của phản ứng. LOD cho biết lượng bản sao của gen đích của virus DIV1 tối thiểu mà xét nghiệm phát hiện được trong một phản ứng (OIE, 2019a). Mẫu đối Plasmid DNA chứa đoạn gen đích được pha loãng theo cơ số 10 với nồng độ từ 10^9 đến 10^0 . Phản ứng realtime PCR được thực hiện ở các mẫu với các nồng độ plasmid-DNA đã pha loãng, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần, với thành phần phản ứng và chu trình nhiệt lựa chọn sau khi được tối ưu hoá. Giới hạn phát hiện (LOD) là số lượng của bản sao plasmid tại độ pha loãng cuối cùng có 100% số mẫu lặp lại có phản ứng (OIE, 2019a; Toohey-Kurth & cs., 2020).

Phân tích đường chuẩn và đánh giá hiệu suất của phản ứng real time PCR

Các máy real-time PCR có chương trình tự động xác lập đường chuẩn và các giá trị như Hiệu suất phản ứng (E), hệ số tương quan R^2 và độ dốc. Đường chuẩn thể hiện mối quan hệ tương quan giữa chu kỳ ngưỡng (Ct) phát hiện với nồng độ bản sao của gene đích có trong mẫu (Toohey-Kurth & cs., 2020; Johnson & cs., 2013).

Đường chuẩn được biểu diễn bằng đường tuyến tính: $y = mx + b$, trong đó: y: biểu thị giá trị Ct; x: log nồng độ bản sao của gen đích virus DIV1; m: độ dốc.

Hiệu suất phản ứng E% bằng công thức: $E\% = [10^{-1/\text{slope}} - 1] \times 100\%$. Hiệu suất của phản ứng realtime PCR đạt yêu cầu khi: E có giá trị trong khoảng 90% đến 105-110%, Độ dốc có giá trị trong khoảng từ -3,1 đến -3,6 và R^2 có giá trị $\geq 0,98$

Độ đặc hiệu phân tích của phản ứng realtime PCR

Độ đặc hiệu phân tích của phản ứng realtime PCR trong phát hiện DIV1 là khả năng phát hiện duy nhất đối với sinh vật mục tiêu DIV1 mà không có phản ứng chéo với các sinh vật gây bệnh phổ biến ở tôm và bộ gen của mẫu tôm sạch bệnh.

Để đánh giá độ đặc hiệu của phản ứng realtime PCR phát hiện DIV1 có độ đặc hiệu cao, các mẫu tôm dương tính với các nhân gây bệnh bệnh Đốm trắng (WSSV), Hoại tử gan tụy cấp (AHPND), vi bào tử trùng (EHP), hoại tử dưới vỏ và cơ quan tạo máu (IHHNV) và mẫu âm tính từ tôm sạch bệnh được lưu giữ và cung cấp bởi Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương được sử dụng để đánh giá. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần với mỗi mẫu mầm bệnh dương tính và mẫu tôm sạch bệnh.

Mức độ ổn định/ biến thiên của phản ứng

Độ lặp lại của thử nghiệm là thước đo sự thống nhất của các kết quả trong và giữa các lần xét nghiệm khi sử dụng một phương pháp thử nghiệm, trên cùng thiết bị, hóa chất, cùng phòng thí nghiệm khi được thực hiện bởi một hay nhiều người khác nhau. Trong nghiên cứu này hai cán bộ của Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương được giao để thực hiện cùng quy trình và đánh giá đánh giá thông qua hệ số biến thiên (CV) hay độ lệch chuẩn tương đối (RSD), theo công thức: $RSD(\%) = CV(\%) = \frac{SD \times 100}{\bar{x}}$,

trong đó: $SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$. Trong đó SD: độ

lệch chuẩn; n: số lần thí nghiệm; x_i : Giá trị tính được của lần thử nghiệm thứ "i"; \bar{x} : Giá trị trung bình của các lần thử nghiệm. Giá trị RSD hay CV <15% có thể được chấp nhận (Eileen, 2010).

So sánh kết quả liên phòng

Thực hiện so sánh liên phòng với các phòng thí nghiệm khác (xét nghiệm tái lập) khi quy trình xét nghiệm áp dụng với trang thiết bị, nguyên liệu tại phòng thí nghiệm khác cho kết quả xét nghiệm tương đồng đảm bảo kết quả có tính thống nhất và ổn định, có thể là giải pháp thay thế việc thực hiện giai đoạn hai của quá trình phê duyệt phương pháp (OIE, 2019a. Chapter 1.1.2).

Để đánh giá mức độ chính xác của quy trình realtime PCR sử dụng Plasmid DNA để xét nghiệm DIV1 đã xây dựng, bộ mẫu bao gồm mẫu 02 plasmid DNA (mẫu dương), 01 mẫu âm tính (DNA từ tôm sạch bệnh) được bảo quản và gửi tới các phòng thí nghiệm trong hệ thống

của Cục Thú y gồm Chi cục Thú y Vùng II (RAHO2), Vùng III (RAHO3), Vùng VI (RAHO6) và Vùng VII (RAHO7) để xét nghiệm theo quy trình đã xây dựng với các trang thiết bị, nguyên liệu sẵn có, kết quả sẽ được đối sánh kết quả với kết quả thực hiện tại Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương (NCVD). Quy trình cũng được thực hiện với mẫu plasmid đối chứng dương chuẩn được phòng thí nghiệm tham chiếu thuộc Trung tâm phòng chống bệnh tật, CISRO, Úc cung cấp.

2.2.3. Xử lý số liệu

Số liệu thu thập từ các kết quả nghiên cứu được phân tích thống kê mô tả trên phần mềm Excel 2013 với các giá trị ở dạng giá trị trung bình \pm SD. Kết quả phân tích độ nhạy, độ đặc hiệu và độ ổn định của quy trình được thực hiện trên các phần mềm tích hợp của máy realtime PCR (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System) sử dụng trong quá trình nghiên cứu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định nồng độ probe tối ưu cho phản ứng realtime PCR sử dụng plamid để phát hiện DIV1

Sau khi đánh giá kết quả về mức độ phản ứng về Ct của 3 quy trình sử dụng probe ở các nồng độ pha loãng plasmid khác nhau, kết quả thu được được trình bày ở bảng 3.

Kết quả bảng 3 cho thấy khi thực hiện trên cùng mẫu pha loãng của plasmid, quy trình 3 (QT3) có khả năng phát hiện tốt hơn hơn 2 quy trình còn lại. Với mẫu có nồng độ bản sao plasmid nhỏ nhất (pha loãng đến 10^{-9}) QT3 vẫn có phản ứng ở 1 trong 3 mẫu lặp lại. Như vậy

QT3 với nồng độ probe cuối cùng $0,2\mu\text{M}$ có độ nhạy cao hơn so với QT1 và QT2 sử dụng nồng độ probe lần lượt là $0,15$ và $0,1\mu\text{M}$. Do đó, QT3 được lựa chọn để tiếp tục đánh giá các giá trị sử dụng của phương pháp.

3.2. Kết quả đánh giá độ nhạy phân tích

3.2.1. Kết quả phân tích độ nhạy của DIV1-MCP - real-time PCR

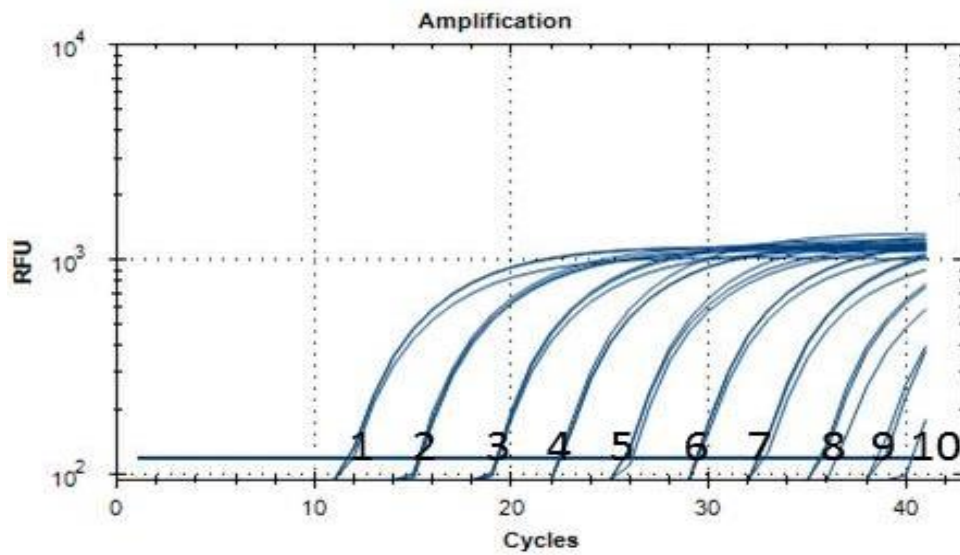
Kết quả phản ứng DIV1-MCP-real-time PCR theo QT3 với mẫu Plasmid pUC57-DIV1 chứa đựng gen MCP của DIV1 được pha loãng của từ $1,36 \times 10^9$ đến $1,36 \times 10^0$ bản sao plasmid/phản ứng, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần, mẫu đối chứng âm là mẫu DNA từ tôm SPF. Kết quả thể hiện ở hình 1 và hình 2.

Kết quả phân tích cho thấy ở nồng độ pha loãng cuối cùng tương ứng với $1,36 \times 10^1$ bản sao plasmid tất cả 3 mẫu lặp lại (100% lặp lại) có phản ứng (giá trị Ct: 35,47; 37,24; 38,67). Như vậy, giới hạn phát hiện của DIV1-MCP-real-time PCR là LOD = 13,6 bản sao plasmid DNA/phản ứng.

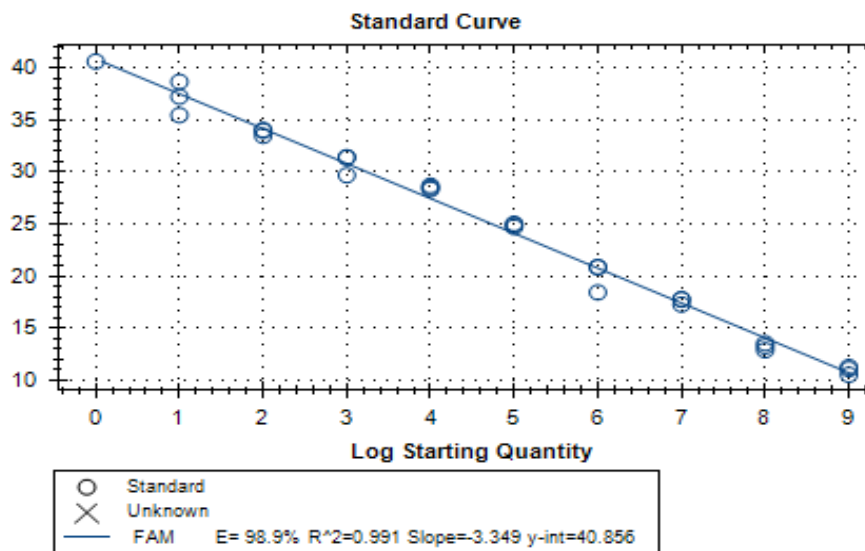
So sánh với tiêu chuẩn đạt của phản ứng realtime PCR với E có giá trị trong khoảng 90% đến 105-110%, Độ dốc có giá trị trong khoảng từ -3,1 đến -3,6 và R^2 có giá trị $\geq 0,98$. Kết quả xây dựng đường chuẩn từ phần mềm của máy Realtime PCR cho thấy kết quả đường tuyến tính được xây dựng cho phản ứng DIV1-MCP-real-time PCR là $y = 40,85 - 3,349x$, có hệ số tương quan cao $R^2 = 0,991$, Độ dốc = -3,35 trong ngưỡng cho phép và hiệu suất cao $E = 98,9\%$. Như vậy kết quả cho thấy quy trình của phản ứng DIV1-MCP-real-time PCR có độ nhạy cao.

Bảng 3. Kết quả giá trị Ct trung bình của các quy trình phản ứng thử nghiệm với các nồng độ probe được thử nghiệm

| Phương pháp | Nồng độ Probe (μM) | Hệ số pha loãng plasmid chứa gen đích của DIV1 | | | | | |
|---------------------------|---------------------------------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} | 10^{-8} | 10^{-9} |
| DIV1-MCP real-time PCR | QT1-probe $0,1\mu\text{M}$ | 22,89 | 26,58 | 29,53 | 33,88 | 37,31 | - |
| | QT2-probe $0,15\mu\text{M}$ | 22,75 | 26,67 | 29,44 | 33,67 | 36,85 | - |
| | QT3-probe $0,2\mu\text{M}$ | 22,52 | 26,10 | 29,42 | 33,21 | 36,20 | 38,16 |
| DIV1-ATPase real-time PCR | QT1-probe $0,1\mu\text{M}$ | 23,15 | 27,01 | 29,67 | 34,89 | 37,73 | - |
| | QT2-probe $0,15\mu\text{M}$ | 23,03 | 26,39 | 29,07 | 33,76 | 36,45 | - |
| | QT3-probe $0,2\mu\text{M}$ | 22,55 | 26,07 | 29,02 | 32,95 | 36,35 | 39,22 |



Hình 1. Kết quả phân tích độ nhạy của quy trình DIV1-MCP real-time PCR
(LOD 1-10: $1,36 \times 10^9$ đến $13,6 \times 10^0$ bản sao plasmid/ phản ứng)



Hình 2. Kết quả xây dựng đường chuẩn và hiệu suất của phản ứng DIV1-MCP-real-time PCR

3.2.2. Kết quả phân tích độ nhạy của DIV1-ATPase real-time PCR

Kết quả phản ứng DIV1-ATPase real-time PCR theo QT3 với mẫu Plasmid pUC-GW-Kan chứa đựng gen ATPase của DIV1 được pha loãng của từ $1,43 \times 10^9$ đến $1,43 \times 10^0$ bản sao plasmid/phản ứng, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần, mẫu đối chứng âm là mẫu DNA từ tôm SPF. Kết quả thể hiện ở hình 3 và hình 4.

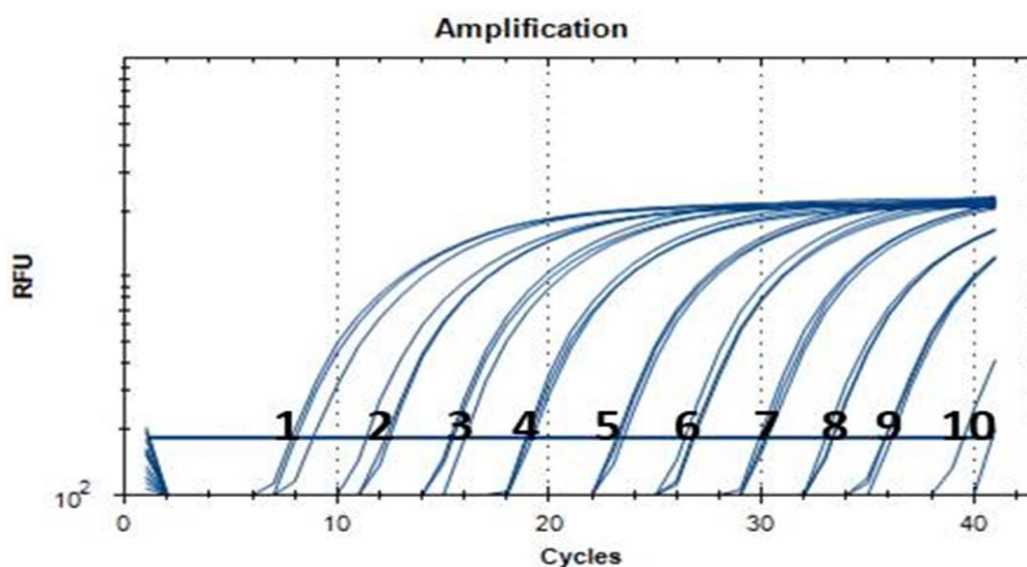
Kết quả phân tích cho thấy ở nồng độ pha loãng cuối cùng tương ứng với $1,43 \times 10^1$ bản sao plasmid tất cả 3 mẫu lặp lại (100% lặp lại) có phản ứng (giá trị Ct: 35,47; 37,24; 38,67). Như vậy, giới hạn phát hiện DIV1-ATPase real-time PCR là LOD = 14,3 bản sao plasmid DNA/phản ứng.

So sánh với tiêu chuẩn đạt của phản ứng realtime PCR với E có giá trị trong khoảng 90% đến 105%, Độ dốc có giá trị trong khoảng từ -3,1

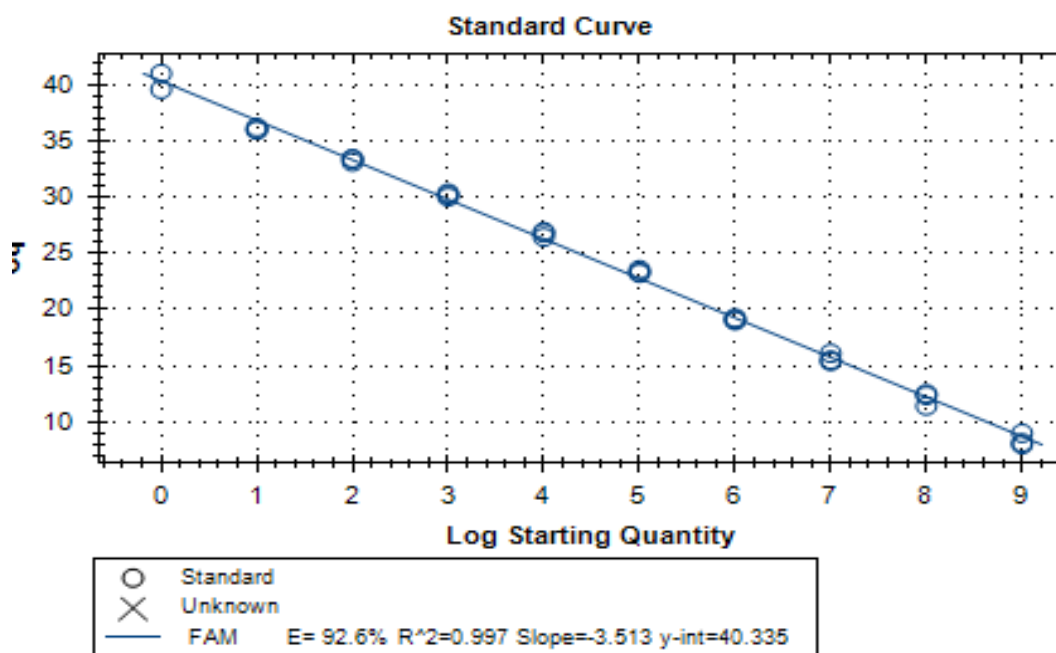
đến -3,6 và R^2 có giá trị ≥ 0.98 . Kết quả xây dựng đường chuẩn từ phần mềm của máy Realtime PCR cho thấy kết quả đường tuyến tính được xây dựng cho phản ứng DIV1-ATPase real-time PCR là $y = 40,335 - 3,513x$, có hệ số tương quan cao $R^2 = 0,997$, với độ dốc = -3.51 thuộc ngưỡng cho phép và Hiệu suất đạt yêu cầu $E = 92,6\%$.

3.3. Kết quả phân tích độ đặc hiệu của phản ứng

Kết quả kiểm tra cả 2 quy trình DIV1-MCP-real-timePCR và DIV1-ATPase real-timePCR cho các mẫu tôm dương tính với WSSV, IHHNV, AHPND, EHP được thể hiện ở hình 5.

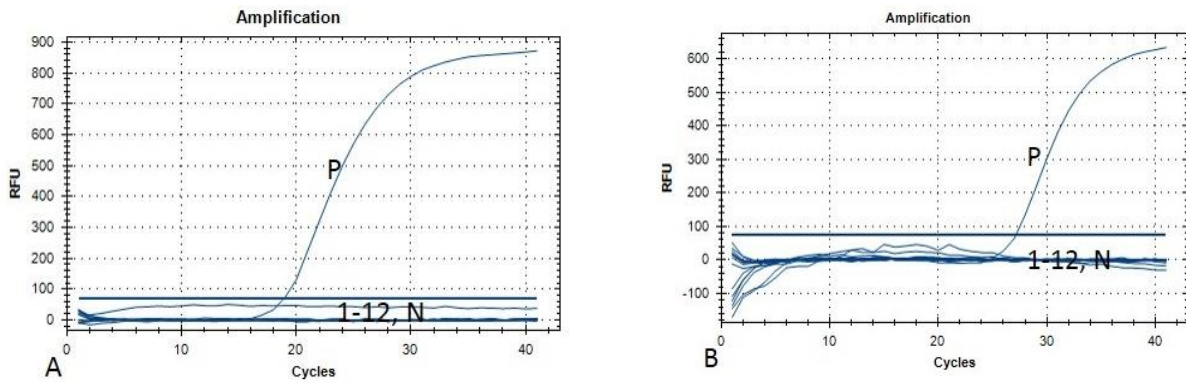


Hình 3. Kết quả phân tích độ nhạy của quy trình DIV1-ATPase real-timePCR (LOD 1-10: $1,43 \times 10^9$ đến $1,43 \times 10^0$ bản sao plasmid/1 phản ứng)



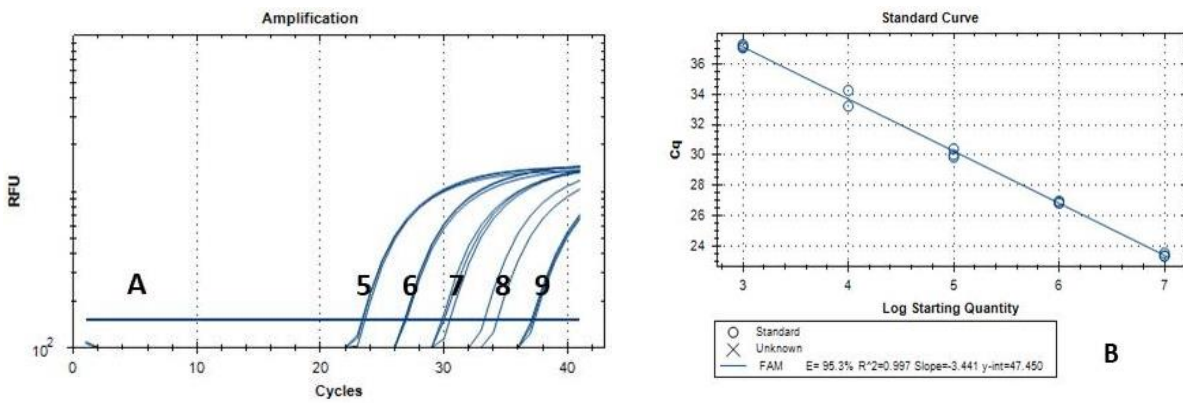
Hình 4. Kết quả xây dựng đường chuẩn và hiệu suất của phản ứng DIV1-ATPase real-timePCR

Thiết lập và tối ưu hoá quy trình realtime PCR phát hiện Decapod Iridescent Virus 1 gây bệnh trên tôm



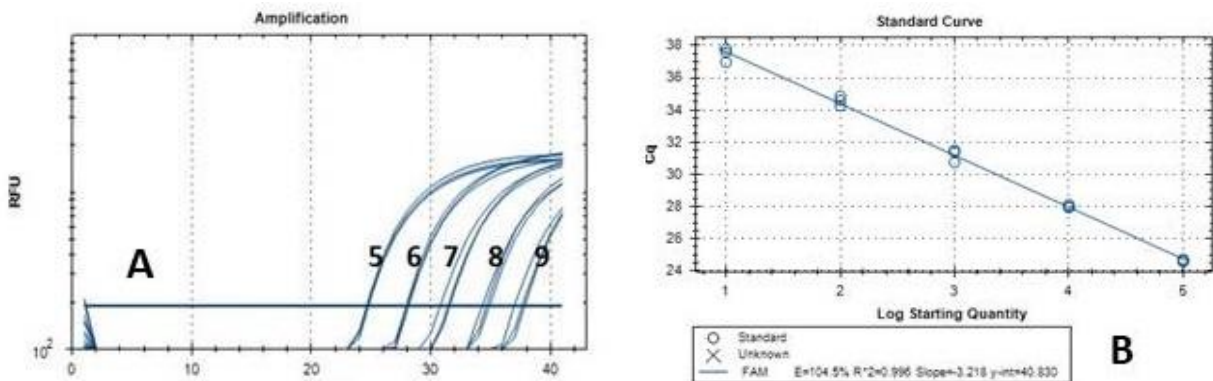
Ghi chú: A: DIV1-MCP-real-timePCR; B: DIV1-ATPase real-timePCR; Mẫu 1-3: Dương tính với WSSV; Mẫu 4-6: Dương tính với IHNV; Mẫu 7-9: Dương tính với AHPND; Mẫu 10-12: Dương tính với EHP; P: Đối chứng dương plasmid; N: Đối chứng âm.

Hình 5. Kết quả phân tích độ đặc hiệu của 2 quy trình realtime PCR



Ghi chú A: Độ nhạy phân tích (LOD) 5-10: $1,36 \times 10^5$ đến $13,6$ bản sao plasmid/phản ứng; 11: Đối chứng âm; B: Đường chuẩn và hiệu suất.

Hình 6. Xét nghiệm lặp lại DIV1-MCP real-time PCR



Ghi chú: A: Độ nhạy phân tích (LOD) 5-10: $1,43 \times 10^5$ đến $1,43 \times 10^0$ bản sao plasmid/ phản ứng; 11: Đối chứng âm. B: Đường chuẩn và hiệu suất.

Hình 7. Xét nghiệm lặp lại DIV1-ATPase real-time PCR

Bảng 4. So sánh liên phòng kết quả xét nghiệm DIV1

| Phương pháp | Ký hiệu mẫu | Kết quả phát hiện | | | | |
|---------------------------|-------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|
| | | NCVD | RAHO 2 | RAHO 3 | RAHO 6 | RAHO 7 |
| DIV1-MCP real-time PCR | DIV-1 | Dương tính | Dương tính | Dương tính | Dương tính | Dương tính |
| | DIV-2 | Dương tính | Dương tính | Dương tính | Dương tính | Dương tính |
| | DIV-3 | Âm tính | Âm tính | Âm tính | Âm tính | Âm tính |
| DIV1-ATPase real-time PCR | SHIV-1 | Dương tính | X | X | Dương tính | Dương tính |
| | SHIV-2 | Dương tính | X | X | Dương tính | Dương tính |
| | SHIV-3 | Âm tính | X | X | Âm tính | Âm tính |

Ghi chú: X: Không xét nghiệm.

Bảng 5. Giá trị Ct của mẫu tham chiếu liên phòng giữa NCVD và CISRO

| | Ký hiệu mẫu từ PTN tham chiếu | Kết quả xét nghiệm theo QT của NCVD | | Kết quả tham chiếu (CISRO) |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------|----------------------------|
| | | Lần 1 | Lần 2 | |
| DIV1-MCP real-time PCR | 2009-02-1003 | 32,2 | 31,3 | 33,6 |
| | 2009-02-1004 | 26,3 | 26,6 | 27,1 |
| | Neg | - | - | |
| DIV1-ATPase real-time PCR | 1812-07-1002 | 21,7 | 22,4 | 25,6 |
| | 1812-07-1004 | 26,9 | 28,7 | 32,4 |
| | Neg | - | - | |

Bảng 6. Tổng hợp kết quả đánh giá giá trị sử dụng phương pháp DIV1-MCP real-time PCR và DIV1-ATPase real-time PCR

| Thông số | Tiêu chí đánh giá (tham khảo) | Kết quả |
|-------------------------------|--|---------------------------------------|
| Độ đặc hiệu phân tích (ASp) | Không có phản ứng chéo với các vi sinh vật gây bệnh phổ biến ở tôm và nền mẫu | Đạt |
| Độ nhạy phân tích (ASe) - LOD | | |
| DIV1-MCP realtime PCR | 1,2 bản sao (Qiu & cs., 2020) | 13,6 bản sao/pur |
| DIV1-ATPase real-time PCR | 4 bản sao (Qiu & cs., 2018) | 14,3 bản sao/pur |
| Hiệu suất (E) | 90 ≤ E ≤ 105-110% (Toohey-Kurth & cs., 2020; Johnson & cs., 2013) E = 106,8% (Qiu & cs., 2020) ; E = 100,8% (Qiu & cs., 2018) | E = 92,5-104,5% |
| Hệ số tương quan (R) | R ² ≥ 0,99 (Toohey-Kurth & cs., 2020; Johnson & cs., 2013). | Đạt (R ² = 0,991 và 0,997) |
| Độ lặp lại | CV ≤ 15% (Eileen, 2010) | Đạt |
| So sánh liên phòng | Tương đồng | Đạt |

Kết quả phân tích cho thấy cả hai quy trình xét nghiệm DIV1-MCP-real-timePCR và DIV1-ATPase real-time PCR đều có độ đặc hiệu cao với DIV1, không gây kết quả dương tính giả hay phản ứng chéo với các bệnh thường gặp trên tôm.

3.4. Kết quả phân tích mức độ ổn định/ biến thiên của phản ứng

Quy trình real-time PCR xét nghiệm DIV1

được thực hiện lặp lại bởi nhân viên khác nhau, tại thời điểm khác nhau trong cùng phòng thí nghiệm của Trung tâm Chẩn đoán thú y Trung ương. Kết quả về mức độ ổn định được thể hiện ở hình 6 và 7.

Kết quả phân tích, hệ số biến thiên (CV) giữa hai lần xét nghiệm của hai nhân viên đều cho CV < 15%, độ lệch chuẩn thấp < 10% giá trị trung bình. Kết quả này cho thấy kết quả real-

time PCR có mức độ ổn định cao giữa các lần xét nghiệm lặp lại với mức độ biến thiên nằm trong giới hạn cho phép.

3.5. Kết quả đối sánh liên phòng

Kết quả phân tích và so sánh liên phòng với 4 phòng thí nghiệm Chi cục Thú y Vùng II, Vùng III, Vùng VI và Vùng VII sử dụng quy trình xét nghiệm DIV1 từ kết quả thiết lập và tối ưu ở nghiên cứu này được thể hiện ở bảng 4.

Như vậy kết quả so sánh liên phòng cho thấy sự tương đồng cao về kết quả xét nghiệm giữa đơn vị xây dựng và tối ưu hoá quy trình (NCVD) và các phòng thí nghiệm tại các chi cục thú y vùng 2, 3, 6 và 7, chứng tỏ mức độ đảm bảo về tính chính xác của quy trình xét nghiệm và có thể ứng dụng tại các phòng thí nghiệm ở Việt Nam.

Kết quả tham chiếu về giá trị Ct của mẫu Plamid phòng thí nghiệm tham chiếu của Trung tâm phòng chống bệnh tật, CISRO, Úc được trình bày ở bảng 5.

Kết quả đối sánh liên phòng cho thấy kết quả phân tích 2 mẫu dương và 1 mẫu âm cho kết quả tương đồng giữa hai phòng thí nghiệm. Về giá trị Ct ở kết quả phân tích mẫu theo DIV1-MCP real-time PCR có sự tương đồng cao hơn so với giá trị Ct ở kết quả phân tích mẫu theo DIV1-ATPase real-time PCR. Tuy nhiên sự chênh lệch là không đáng kể, hệ số biến thiên (CV) < 15%.

Kết quả xét nghiệm DIV1 âm tính ở mẫu tôm dương tính với WSSV, IHNV, VAHPND và EHP, cho thấy hai phương pháp real-time PCR không có phản ứng chéo với các tác nhân phổ biến gây bệnh ở tôm, khẳng định DIV1-MCP real-time PCR và DIV1-ATPase real-time PCR có độ đặc hiệu cao.

Giới hạn phát hiện LOD 100% của hai phương pháp real-time PCR thực hiện tại phòng thí nghiệm của Trung tâm Chẩn đoán thú y Trung ương lần lượt là 13,6 và 14,3 bản sao plasmid DNA/phản ứng. Thực tế, độ nhạy phân tích trong nghiên cứu này thấp hơn so công bố của tác giả trước đó, điều này có thể do nguyên liệu sử dụng và bộ kit xét nghiệm khác nhau. Tuy nhiên, kết quả này tương đồng với một số phương pháp real-time PCR được OIE khuyến cáo áp dụng phát hiện các tác nhân gây bệnh

phổ biến ở động vật thuỷ sản và động vật trên cạn như real-time PCR phát hiện vi khuẩn gây hội chứng gan tụy cấp (VpAHPND) (Han & cs., 2015), virus IHNV (Tang & Lightner, 2001) và IMNV (OIE, 2023) có LOD là 10 bản sao plasmid/phản ứng). Real-time PCR phát hiện phát hiện TSV có LOD là 100 bản sao plasmid/phản ứng (Han & cs., 2015).

Hai phương pháp real-time PCR có hiệu suất phản ứng cao (E = 92,5-104,5%) khi xét nghiệm phát hiện DIV1 ở mẫu tôm. Kết quả của phản ứng ổn định qua các lần xét nghiệm lặp lại và tương đồng giữa các phòng thí nghiệm.

4. KẾT LUẬN

Hai phương pháp real-time PCR phát hiện DIV1 sử dụng plasmid chứa gen MCP và ATPase của DIV1 đã được xây dựng và tối ưu hoá thành công, có hiệu suất, độ nhạy phân tích, độ đặc hiệu phân tích cao. Kết quả của phản ứng ổn định qua các lần xét nghiệm lặp lại và tương đồng giữa các phòng thí nghiệm trong và ngoài nước.

DIV1-ATPase real-time PCR và DIV1-MCP real-time PCR là hai quy trình phát hiện gen đích khác nhau (ATPase và MCP), do đó có thể sử dụng kiểm tra chéo trong trường hợp mẫu có kết quả xét nghiệm nghi ngờ.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí đề tài cấp bộ “Nghiên cứu sự lưu hành virus DIV1 (Decapod Iridescent Virus 1) tại Việt Nam”, do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tài trợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Biosecurity New Zealand (2022). Supplementary Import Risk Analysis: Freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) broodstock from Thailand and Israel. Ministry for Primary Industries. ISBN No: 978-1-99-105296-4
- Chen Z., Jun Huang, Fang Zhang, Yang Zhou & Huijie Huang (2020). Detection of shrimp hemocyte iridescent virus by recombinase polymerase amplification assay. *J. Molecular and Cellular Probes*. 49: 101475.
- Chen X., Qiu L., Huang J., Wang H., Zou P., Dong X., Li F. & Huang J. (2019). Susceptibility of

- Exopalaemon carinicauda to the Infection with Shrimp Hemocyte Iridescent Virus (SHIV 20141215), a Strain of Decapod Iridescent Virus 1 (DIV1). *Viruses*. 11(387): 15.
- Chen X., Qiu L., Huang J., Wang H., Zou P., Dong X., Li F. & Huang J. (2019). Susceptibility of *Exopalaemon carinicauda* to the Infection with Shrimp Hemocyte Iridescent Virus (SHIV 20141215), a Strain of Decapod Iridescent Virus 1 (DIV1). *Viruses*. 11(387): 15.
- Eileen M. Burd (2010). Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. *Clinical microbiology reviews*. pp. 550-576
- Han J.E., Tang K.F.J., Pantoja C.R., White B.L. & Lightner D.V. (2015). qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*. 442: 12-15.
- Johnson Gemma L., Nolan Tania & Bustin Stephen A. (2013) Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE. In: PCR Detection of Microbial Pathogens: Second Edition. *Methods in Molecular Biology*. 943p.
- NACA (2019). Eighteenth Meeting of the Asia Regional Advisory Group on Aquatic Animal Health: Report of the Meeting. Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand.
- NACA (2020). Decapod Iridescent Virus 1 (DIV1): an emerging threat to the shrimp industry.1 (Issue April: 1-5). Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific. Uploads 21 April 2020.
- OIE (2020a). OIE disease card - Infection with decapod iridescent virus-1 (DIV1). Retrieved from <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/a-div1-disease-card.pdf> on July 02, 2023.
- OIE (2020b). Decapod iridescent Virus 1 (DIV1) infection, Chinese Taipei (Immediate notification) Retrieved from asia.woah.org/en/events/oie-regional-virtual-meeting-on-decapod-iridescent-virus-1 on July 02, 2023.
- OIE (2020c). Decapod iridescent Virus 1 (DIV1) infection. The 15th Meeting of the Asia Regional. Retrieved from <http://www.woah.org>. on May 2020.
- OIE (2019). Infection with Taura Syndrome virus. Retrieved from https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_taura_syndrome.pdf on July 02, 2023
- OIE (2019a). Chapter 1.1.2 Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Retrieved from https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf. on July 02, 2023.
- Qiu L., Chen M.M., Wan X.Y., Li C., Zhang Q.L., Wang R.Y., Cheng D.Y., Dong X., Yang B., Wang X.H., Xiang J.H. & Huang, J. (2017). Characterization of a new member of Iridoviridae, Shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Scientific Reports*. 7(1):11834. doi: 10.1038/s41598-017-10738-8.
- Qiu L., Chen M.M., Wan X.Y., Zhang Q.L., Li C., Dong X., Yang B. & Huang, J. (2018). Detection and quantification of shrimp hemocyte iridescent virus by TaqMan probe based real-time PCR. *In Journal of Invertebrate Pathology*. 154: 95-101.
- Qiu L., Chen X., Zhao R.H., Li C., Gao W., Zhang Q.L. & Huang J. (2019). Description of a natural infection with Decapod iridescent virus 1 in farmed giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Viruses*. 11(4): 354. doi: 10.3390/v11040354.
- Qiu L., Xing C., Xiao-Meng Guo, Gao W., Zhao R.H., Zhang Q.L., Yang B. & Huang J. (2020). A TaqMan probe based real-time PCR for the detection of Decapod iridescent virus 1. *Journal of Invertebrate Pathology*. 173.
- Qiu L., Guo X.M., Xie G.S., Yong-Hui Feng, Jing-Yi Xing, Xian-Yun Ren & Jie Huang (2023) Susceptibility of kuruma shrimp to the infection with Decapod iridescent virus 1. *Frontiers in Marine Science*. 10. 1114123
- Tang K.F.J. & Lightner D.V. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *In Diseases of Aquatic Organisms*. 44(2): 79-85). <https://doi.org/10.3354/dao044079>
- Toohy-Kurth K., Monica M. Reising, Rebecca L. Tallmadge, Laura B. Goodman, Jianfa Bai, Steven R. Bolin, Janice C. Pedersen, Mangkey A. Bounpheng, Roman M. Pogranichniy, Jane Christopher-Hennings, Mary Lea Killian, Donna M. Mulrooney, Roger Maes, Shri Singh & Beate M. Crossley. (2020). Suggested guidelines for validation of real-time PCR assays in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest*. 32(6): 802-814.
- USAD (2022). Decapod Iridescent Virus (DIV1) Rapid Risk Assessment. Animal and Plant Health Inspection Service. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service
- WOAH (2022). Chapter 9.10 of the Aquatic code, infection with decapod iridescent virus 1.
- WOAH. (2021b). Infection with Infectious Myonecrosis Virus. *In Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals*. 3(2): 154-164.
- Xu L., Wang T., Li F. & Yang F. (2016). Isolation and preliminary characterization of a new pathogenic iridovirus from redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Diseases of Aquatic Organisms*. 120(1):17-26.