

## DEVELOPMENT OF A DUPLEX REALTIME PCR SYSTEM FOR THE SIMULTANEOUS DETECTION OF *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) AND *Monodon baculovirus* (MBV) IN SHRIMP

Nguyen Pham Truc Phuong\*, Nguyen Pham Phuong Thao

Research and Development Center for Hi-tech Agriculture

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 06/7/2022	Both MBV ( <i>Monodon baculovirus</i> ) and HPV ( <i>Hepatopancreatic parvovirus</i> ) are shrimp enteric viruses that infect intestinal and hepatopancreatic epithelial cells to cause significant mortalities and depressed growth in infected larval, postlarval, and early juvenile stages of shrimp, and thus present a risk to commercial aquaculture. Therefore, in this study, a procedure for detecting of monodon baculovirus (MBV) and hepatopancreatic parvovirus (HPV) in shrimp by duplex realtime PCR assay using TaqMan probes in a one-tube PCR reaction has been developed to quickly and accurately detect virus. The optimized duplex realtime PCR protocol include concentrations of primers HPVth/MBV 400 nM/400 nM, concentrations of probe HPV-P1/MBV-P1 là 300 nM/300 nM with the following conditions: initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 15s and annealing/extension at 60°C for 1 min. The results of evaluating of method show that the LAMP method have sensitivity (SE) is 100%, accuracy is (AC) 100%, specificity (SP) is 100%, the false positive rate is 0% and false negative rate is 0%.
Revised: 07/12/2022	
Published: 20/12/2022	

### KEYWORDS

*Hepatopancreatic parvovirus*

*Monodon baculovirus*

HPV

MBV

Duplex realtime PCR

Shrimp

## TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH PHÁT HIỆN *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) VÀ *Monodon baculovirus* (MBV) TRÊN TÔM BẰNG PHƯƠNG PHÁP DUPLEX REALTIME PCR

Nguyễn Phạm Trúc Phương\*, Nguyễn Phạm Phương Thảo

Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 06/7/2022	MBV ( <i>Monodon baculovirus</i> ) và HPV ( <i>Hepatopancreatic parvovirus</i> ) đều là virus ký sinh trên tế bào biểu bì gan tụy và tế bào biểu bì ruột của tôm, gây chết tôm ở giai đoạn ấu trùng Zoea, mysis và tôm giống nhỏ,... nên ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành công nghiệp nuôi tôm. Vì vậy, nghiên cứu này đã phát triển quy trình duplex realtime PCR bằng cách sử dụng đầu dò TaqMan để phát hiện nhanh và chính xác đồng thời <i>monodon baculovirus</i> (MBV) và <i>hepatopancreatic parvovirus</i> (HPV) trong cùng 1 phản ứng. Sau quá trình tối ưu các thành phần và điều kiện cần thiết như tỉ lệ mỗi HPVth/MBV 400 nM/400 nM, tỉ lệ probe HPV-P1/MBV-P1 là 300 nM/300 nM với điều kiện phản ứng như sau: 94°C trong 5 phút, tiếp theo 94°C trong 15 giây, 60°C trong 60 giây, chu kỳ này được lặp lại 40 lần. Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp được xây dựng có độ đặc hiệu (SP) đạt 100%; độ chính xác (AC) đạt 100%; độ nhạy (SE) đạt 100%; tỷ lệ âm tính giả 0% và tỷ lệ dương tính giả 0%, LOD <sub>50</sub> là 5 copy/phản ứng.
Ngày hoàn thiện: 07/12/2022	
Ngày đăng: 20/12/2022	

### TỪ KHÓA

*Hepatopancreatic parvovirus*

*Monodon baculovirus*

HPV

MBV

Duplex realtime PCR

Tôm

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6237>

\* Corresponding author. Email: [trucphuongnguyen1206@gmail.com](mailto:trucphuongnguyen1206@gmail.com)

## 1. Giới thiệu

Năm 2022, ngành thủy sản phần đầu sản xuất khoảng 260.000 - 270.000 con tôm bố mẹ (tôm thẻ chân trắng 200.000 - 210.000 con, tôm sú 60.000 con); tôm giống khoảng 140-150 tỷ con (tôm thẻ chân trắng 100-110 tỷ con và tôm sú 30-40 tỷ con). Diện tích nuôi tôm đạt 750.000 ha; sản lượng tôm các loại đạt 980 nghìn tấn, trong đó tôm sú là 275 nghìn tấn, tôm thẻ chân trắng là 675 nghìn tấn, còn lại là tôm khác. Kim ngạch xuất khẩu tôm đạt 4 tỷ USD. Do đó mở rộng quy mô sản xuất, mức độ thâm canh hoá ngày càng cao đã dẫn đến sự xuất hiện ngày càng nhiều mầm bệnh nguy hiểm đe dọa đến sự phát triển bền vững của ngành công nghiệp nuôi tôm và gây thiệt hại nghiêm trọng về mặt kinh tế. Trong đó, nghiêm trọng nhất là bệnh do virus gây ra làm ảnh hưởng đến năng suất. Hiện nay, hiện tượng đa nhiễm trên tôm xuất hiện ngày càng nhiều, điển hình là bệnh teo gan tụy Hepatopancreatic parvovirus disease (HPD) gây ra bởi *Hepatopancreatic parvovirus (HPV)* và bệnh còi do *Monodon baculovirus (MBV)*. Cả hai loại virus *MBV* và *HPV* đều là virus đường ruột và có cùng các mô đích, lây nhiễm vào tế bào biểu mô gan tụy và ruột giữa của tôm [1]. Các báo cáo đã cho thấy virus *MBV*, *HPV* gây ra bệnh nghiêm trọng ở giai đoạn ương nuôi ấu trùng, hậu ấu trùng và tôm con của *Penaeus monodon* [2], [3]. Tuy nhiên, cấu trúc của hai loại virus này là khác nhau. *MBV* là một loại baculovirus có kích thước lớn (270 × 72 nm), hình que, được bao bọc với kích thước bộ gen ước tính từ 80 đến 160 kb; ngược lại, *HPV* là một loại parvovirus có kích thước nhỏ (22 nm), có cấu trúc hình khối 20 mặt, có chứa bộ gen DNA sợi đơn có kích thước ~ 6 kb [1].

Hiện có nhiều phương pháp được sử dụng nhằm phát hiện và chuẩn đoán bệnh virus ở tôm như: mô học (nhuộm H&E), nhuộm nhanh, kính hiển vi điện tử truyền qua (transmission electron microscopy – TEM), lai tại chỗ (in situ hybridization), phản ứng PCR (polymerase chain reaction – PCR), phản ứng realtime PCR,... [4]-[7]. Tuy nhiên, các phương pháp chuẩn đoán dựa trên sự đặc trưng như trên chỉ có thể quan sát được trong các giai đoạn nhiễm trùng nặng. Trong khi đó, việc quản lý bệnh trên thủy sản nói chung và tôm nói riêng đòi hỏi một sự chuẩn đoán bệnh sớm và nhanh chóng với độ đặc hiệu và độ nhạy cao nhằm phát hiện và tránh mầm bệnh do virus gây ra, giúp cho người nông dân có thể thả được giống sạch bệnh [8]. Mặt khác, các phương pháp như nhuộm HE hay TEM cho kết quả đáng tin cậy nhưng cần được thực hiện bởi các chuyên gia giàu kinh nghiệm và đòi hỏi sự khéo léo, ngoài ra còn cần được thực hiện tại các phòng thí nghiệm được trang bị đầy đủ thiết bị, dụng cụ, vì vậy dẫn đến sự giới hạn trong việc áp dụng trên diện rộng [4], [9]. Ngoài ra, phương pháp lai *in situ* đặc hiệu nhưng độ nhạy thấp, và probe hiện có trên thị trường là đặc hiệu cho một số chủng nhất định [9].

Vì vậy, việc xây dựng một phương pháp duplex realtime PCR sẽ giúp phát hiện đồng thời 2 loại virus trong cùng một phản ứng, tiết kiệm chi phí hơn so với xét nghiệm cho từng loại virus riêng biệt. Tang và Lightner (2010) đã nghiên cứu và phát triển quy trình chẩn đoán và kiểm soát đồng thời virus *MBV* và *HPV* trên tôm sú thu thập từ Malaysia, Indonesia và Thái Lan bằng phương pháp duplex realtime PCR [1]. Phương pháp chẩn đoán này đã được Tổ chức sức khỏe động vật thế giới (OIE) đưa vào Sổ tay hướng dẫn chẩn đoán bệnh động vật thủy sản năm 2011 [10]. Từ những nguyên nhân trên, nghiên cứu này hướng đến việc tối ưu hóa quy trình phát hiện bệnh *MBV* và *HPV* trên tôm để phù hợp với điều kiện hóa chất và trang thiết bị phòng thí nghiệm ở Việt Nam có độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu cao nhằm cung cấp cơ sở khoa học cho việc lựa chọn phương pháp sàng lọc nhanh - hiệu quả, kiểm soát dịch bệnh, tiết kiệm chi phí xét nghiệm cho nhóm virus này.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

DNA chứng dương (plasmid DNA): Trình tự gen mục tiêu *MBV* (AY494591) và gen mục tiêu *HPV* (DQ002873) được chèn vào plasmid DNA (pUCIDT-Amp GoldenGate). Mẫu tôm ấu trùng (postlarvae), tôm thương phẩm dương tính với virus *HPV*, *MBV* do công ty AOSC cung cấp.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Kiểm tra độ hoạt động thực tế và độ đặc hiệu của môi

Kiểm tra độ hoạt động thực tế của môi: Sau khi môi được tổng hợp, phản ứng realtime PCR được thực hiện với các thành phần phản ứng cơ bản 10  $\mu\text{L}$  qPCRBIO Probe Mix Lo-ROX 2X (PCR BioSystems); 0,6  $\mu\text{L}$  môi xuôi 10  $\mu\text{M}$ ; 0,6  $\mu\text{L}$  môi ngược 10  $\mu\text{M}$ ; 0,6  $\mu\text{L}$  probe 10  $\mu\text{M}$ ; 2  $\mu\text{L}$  DNA plasmid có chứa trình tự gen đích và bổ sung thêm nước nuclease free để đủ 20  $\mu\text{l}$ . Phản ứng khuếch đại được thực hiện trên máy Mx3005P™ QPCR System (Agilent technologies). Điều kiện phản ứng như sau: 94°C trong 5 phút, tiếp theo 94°C trong 15 giây, 60°C trong 60 giây, chu kỳ này được lặp lại 40 lần. Khi phản ứng realtime kết thúc, giá trị C(t) được xác định để xác nhận khả năng hoạt động thực tế của môi.

Kiểm tra đặc hiệu của môi: Sau kiểm tra độ hoạt động thực tế của môi, phản ứng realtime PCR được thực hiện với các thành phần phản ứng cơ bản 10  $\mu\text{L}$  qPCRBIO Probe Mix Lo-ROX 2X (PCR BioSystems); 0,6  $\mu\text{L}$  môi xuôi 10  $\mu\text{M}$ ; 0,6  $\mu\text{L}$  môi ngược 10  $\mu\text{M}$ ; 0,6  $\mu\text{L}$  probe 10  $\mu\text{M}$ ; 2  $\mu\text{L}$  DNA plasmid có chứa trình tự gen đích của *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV), *Monodon baculovirus* (MBV), các chứng dương của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV), vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND), *Perkinsus marinus* và bổ sung thêm nước nuclease free để đủ 20  $\mu\text{l}$ . Phản ứng khuếch đại được thực hiện trên máy Mx3005P™ QPCR System (Agilent technologies). Điều kiện phản ứng như sau: 94°C trong 5 phút, tiếp theo 94°C trong 15 giây, 60°C trong 60 giây, chu kỳ này được lặp lại 40 lần. Khi phản ứng realtime PCR kết thúc, giá trị C(t) được xác định để xác nhận độ đặc hiệu của môi.

### 2.2.2. Tối ưu hóa quy trình duplex realtime PCR phát hiện virus *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) gây bệnh teo gan tụy *Hepatopancreatic parvovirus disease* (HPD) và virus *Monodon baculovirus* (MBV) gây bệnh MBV trên tôm (*Panaeus* spp.)

Hỗn hợp phản ứng duplex realtime PCR bao gồm 10  $\mu\text{L}$  qPCRBIO Probe Mix Lo-ROX 2X, DNA 1  $\mu\text{L}$ , nồng độ môi và probe được tối ưu hóa bằng ma trận 5x5, theo đó, nồng độ gradient cuối cùng của các cặp môi là 100, 200, 300, 400, 500 nM; các Taqman probe tương ứng 100, 200, 300, 400, 500 nM và bổ sung thêm nước nuclease free (Invitrogen, Mỹ) để đủ 20  $\mu\text{L}$ . Phản ứng khuếch đại được thực hiện trên máy Mx3005P™ qPCR system (Agilent technologies). Điều kiện phản ứng như sau: 94°C trong 5 phút, tiếp theo 94°C trong 15 giây, 55 - 60°C trong 60 giây, chu kỳ này được lặp lại 40 lần.

Quy trình duplex realtime PCR sử dụng 2 bộ môi lần lượt là cặp môi HPVth-F/ HPVth-R; MBV-F/ MBV-R tham khảo từ nghiên cứu của Tang và Lightner [1] dựa trên trình tự gen MBV thu nhận từ Genbank với mã số AY494591 và tương tự trình tự gen HPV có mã số trên Genbank là DQ002873 được sử dụng trong bài báo. Trình tự cặp môi được nêu trong Bảng 1.

**Bảng 1.** Trình tự cặp môi được sử dụng trong nghiên cứu

Môi	Trình tự cặp môi	Tài liệu tham khảo
MBV-F	5'-CTA CCA TAA GCT AGC ATA CGT CCT TTT-3'	[1]
MBV-R	5'- AAA GGT CAG CAA AAA ACA CTC AAT T -3'	
MBV-P1	5'- 6-HEX – ACCCTCTACCGATATGGTATCAATGTCTGGAGTT- BHQ-1-3'	
HPVth-F	5'- CGCGGCTACGAGAAGATACTTCA -3'	
HPVth-R	5'- CGACGAAGGCGATGTCTTCTG -3'	
HPVth-P1	5'- 6-FAM-ACGACAACAACA ACTATGGGAGGACCTAGGAC- BHQ-1-3'	

### 2.2.3. Xác định các thông số kỹ thuật của quy trình duplex realtime PCR phát hiện *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) và *Monodon baculovirus* (MBV)

Kiểm tra độ chọn lọc của phương pháp: Thực hiện phản ứng duplex realtime PCR với cặp môi và Taqman probe đặc hiệu cho *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV), *Monodon baculovirus* (MBV) trên mẫu tôm dương tính với HPV và MBV đã tối ưu các điều kiện ở nội dung 2.2.2 và các virus khác trên tôm như *Yellowhead complex virus* (YHV), *Infection Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus* (IHHNV), *Vibrio parahaemolyticus* (EMS),... Tất cả phản ứng

duplex realtime PCR được thực hiện với mỗi tác nhân 3 phản ứng, mỗi phản ứng 3 lần lặp lại. Kết quả thu được tính toán như sau: SP (độ chọn lọc) =  $(NA/N-) \times 100\%$ . Trong đó: N-: tổng số mẫu dương tính giả + tổng số mẫu âm tính thật; NA: tổng số mẫu dương tính giả.

Xác định giới hạn phát hiện của phương pháp ( $LOD_{50}$ ): Được thực hiện theo phương pháp Spearman-Kärber 50% Endpoint. Các mẫu tôm (tôm post, tôm thương phẩm) - đã được khẳng định không nhiễm *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) và *Monodon baculovirus* (MBV) bằng Kit thương mại được ly trích DNA. Tiếp theo, các mẫu DNA này sẽ được nhiễm chủ động chứng dương có vật liệu di truyền của HPV và MBV ở nồng độ 1 copy/ $\mu$ l; 5 copy/ $\mu$ l; 10 copy/ $\mu$ l; 20 copy/ $\mu$ l; 40 copy/ $\mu$ l; 80 copy/ $\mu$ l; 100 copy/ $\mu$ l. Giới hạn phát hiện (Limit of Detection-  $LOD_{50}$ ) được tính theo công thức Spearman-Kärber như sau:  $\log(LOD_{50}) = L - d(\sum P_i - 0.5) = m$  hay  $LOD_{50} = 10^m$ . Trong đó: **LOD<sub>50</sub>**: Giới hạn phát hiện của phương pháp; **L**: log của nồng độ DNA thấp nhất mà tại đó 100% số lần lặp lại phản ứng cho kết quả dương tính; **d**: log của hệ số nồng độ pha loãng ( $d = \log 2$ ); **P<sub>i</sub>**: Tỷ lệ mẫu cho kết quả dương tính nằm trong khoảng  $50\% \leq P_i \leq 100\%$  tương ứng với với nồng độ pha loãng thứ i; **Um**: Ước lượng sai số của m, với  $Um = d \sqrt{\sum (P_i(1 - P_i)) / (n - 1)}$ ; **n**: Số lần lặp lại đối với nồng độ pha loãng thứ i ( $n = 10$ ). Phản ứng được tiến hành với điều kiện đã tối ưu ở nội dung 2.2.2 với nồng độ DNA vừa nêu trên.

Xác định các thông số kỹ thuật của phương pháp: Các thông số của phương pháp duplex realtime PCR được xác định bao gồm: độ nhạy, độ đặc hiệu độ chính xác, tỷ lệ dương tính giả, tỷ lệ âm tính giả. Phản ứng được tiến hành như sau: pha loãng nồng độ DNA trong khoảng 5- 10 lần  $LOD_{50}$ , chuẩn bị 20 mẫu trắng (kiểm tra âm tính với virus HPV, MBV). Tiếp theo, DNA của tôm ly trích từ mẫu trắng sẽ tiến hành nhiễm chủ động DNA đối chứng dương có vật liệu di truyền của virus HPV và MBV ở nồng độ khoảng 50-100 copy/phản ứng. Phản ứng duplex realtime PCR được tiến hành với các điều kiện đã tối ưu ở nội dung 2.2.2 và nồng độ DNA chuẩn bị ở trên để khảo sát các thông số kỹ thuật của phương pháp duplex realtime PCR phát hiện virus *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) và *Monodon baculovirus* (MBV).

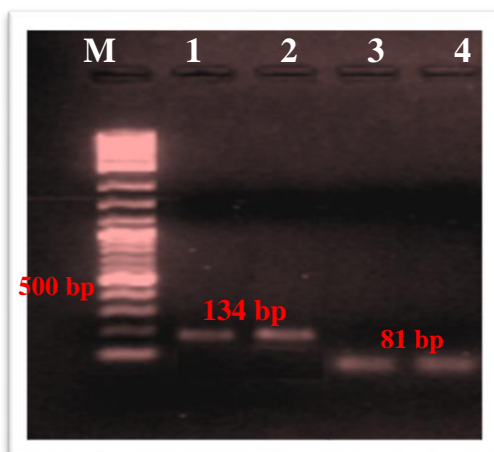
Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu thí nghiệm được tổng hợp và xử lý thống kê ANOVA đơn yếu tố bằng phần mềm Minitab 16.

### 3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

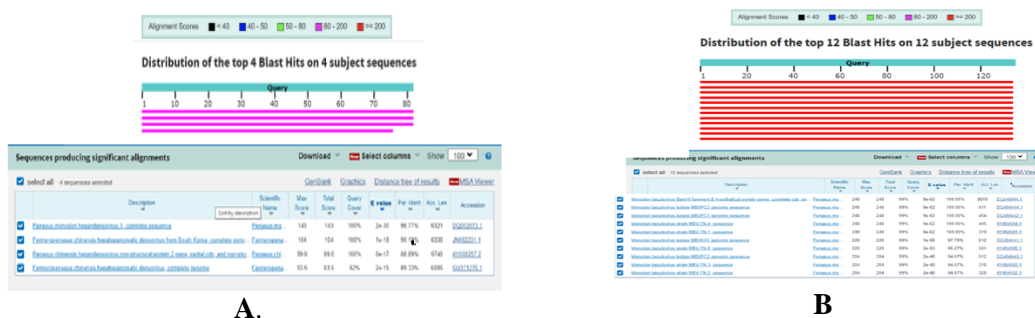
#### 3.1. Kiểm tra độ hoạt động thực tế của mồi và probe phát hiện virus MBV và HPV

Kiểm tra độ hoạt động thực tế của cặp mồi HPVth-F/HPVth-R và cặp mồi MBV-F/ MBV-R bằng cách thực hiện phản ứng PCR với DNA chứng dương chứa trình tự mục tiêu HPV và MBV. Kết quả cho thấy, sản phẩm khuếch đại của phản ứng PCR có kích thước lần lượt là 134 bp, 81 bp phù hợp với kích thước trình tự gen mục tiêu MBV, HPV (Hình 1). Bên cạnh đó, các sản phẩm khuếch đại của phản ứng PCR gửi giải trình tự gen tại công ty AIT Biotech, Singapore để chắc chắn trình tự mục tiêu HPV và MBV. Kết quả giải trình tự sẽ được so sánh với trình tự gen HPV và MBV có trong ngân hàng gen trên NCBI bằng cách sử dụng phần mềm BLAST alignment để nhận diện. Kết quả cho thấy, các đoạn trình tự được nhân bản trong phản ứng PCR được giải trình tự đã tương đồng 100% với trình tự mục tiêu của gen HPV, MBV và tương đồng với các trình tự của gen của virus HPV, MBV gây bệnh ở tôm trên ngân hàng gen NCBI (Hình 2). Kết quả này khẳng định cặp mồi HPVth-F/HPVth-R và MBV-F/ MBV-R đã khuếch đại chính xác trình tự của gen HPV, MBV gây bệnh trên tôm.

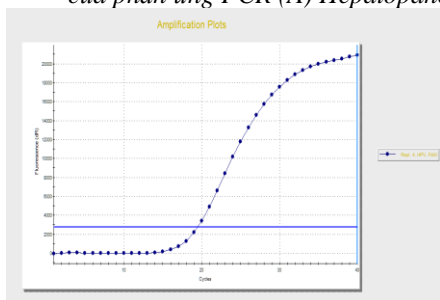
Khả năng hoạt động của từng đoạn dò (probe) với cặp mồi tương ứng được thực hiện bằng phản ứng real time PCR với tín hiệu huỳnh quang vượt ngưỡng. Cặp mồi HPVth sử dụng probe gắn màu FAM, cặp mồi MBV với đoạn dò gắn màu HEX. Dựa vào biểu đồ khuếch đại tín hiệu huỳnh quang, các đoạn dò HPVth-P1, MBV-P1 hoạt động hiệu quả, cho tín hiệu huỳnh quang vượt ngưỡng tương ứng với các cặp mồi (Hình 3, Hình 4).



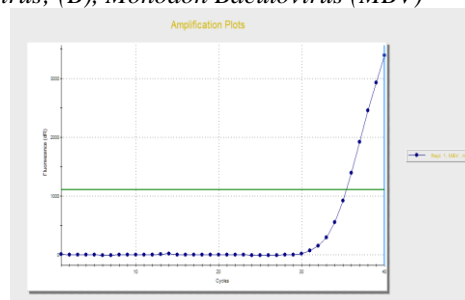
**Hình 1.** Kết quả PCR kiểm tra độ hoạt động thực tế của môi HPV và MBV  
Giếng M: thang DNA, Giếng (1)(2) DNA plasmid với cặp môi MBV-F/MBV-R, Giếng (3)(4) DNA plasmid với cặp môi HPV-F/HPV-R



**Hình 2.** Kết quả so sánh trình tự gen HPV, MBV trên ngân hàng gen NCBI với sản phẩm khuếch đại của phản ứng PCR (A) *Hepatopancreatic Parvovirus*; (B), *Monodon Baculovirus* (MBV)



**Hình 3.** Biểu đồ khuếch đại tín hiệu huỳnh quang của cặp môi HPVth-F/HPVth-R với đoạn dò HPVth-P1 gắn màu FAM



**Hình 4.** Biểu đồ khuếch đại tín hiệu huỳnh quang của cặp môi MBV-F/MBV-R với đoạn dò MBV-P1 gắn màu HEX

### 3.2. Tối ưu hóa quy trình duplex realtime PCR phát hiện virus *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) gây bệnh teo gan tụy *Hepatopancreatic parvovirus disease* (HPD) và virus *Monodon baculovirus* (MBV) gây bệnh còi MBV trên tôm

Trong nghiên cứu này, để phát hiện virus HPV và MBV, hai bộ môi HPVth và MBV đã được sử dụng. Kết quả phân tích được xác định là dương tính với HPV và MBV khi có tín hiệu huỳnh quang vượt đường nền. Để đảm bảo độ tin cậy của quy trình phát hiện, trong mỗi lần phân tích đều phải có mẫu đối chứng âm và đối chứng dương với HPV và MBV đi kèm.

Nồng độ môi là yếu tố cơ bản quyết định đến sự thành công của phản ứng realtime PCR. Nồng độ môi quá cao có thể gây hiện tượng gắn môi không đặc hiệu, nồng độ quá thấp làm giảm

hiệu giá phản ứng do thiếu môi cho những chu kỳ cuối cùng. Nồng độ môi tối ưu cho mỗi phản ứng dao động trong khoảng 100 - 500nM. Kết quả tối ưu nồng độ môi HPVth-F/HPVth-R và MBV-F/MBV-R của phương pháp duplex realtime PCR phát hiện trình tự HPV và MBV được thể hiện ở bảng 3. Các nghiệm thức có tỉ lệ nồng độ môi HPVth-F/ HPVth-R và MBV-F/ MBV-R 200/500 nM, 300/500 nM, 400/400 nM, 400/500 nM cho giá trị Ct thấp nhất và khác biệt ý nghĩa thống kê các nghiệm thức tỉ lệ môi còn lại. Trong các nghiệm thức 200/500 nM, 300/500 nM, 400/400 nM, 400/500 nM thì tỉ lệ nồng độ môi HPVth-F/HPVth-R và MBV-F/MBV-R (400/400 nM) là tối ưu nhất với giá trị Ct thấp và khuếch đại hiệu quả sản phẩm chứa trình tự HPV và MBV lần lượt là DNA chứng dương  $10^3$  copy/phản ứng so với tỉ lệ nồng độ còn lại. Như vậy, nồng độ môi HPVth-F/HPVth-R và MBV-F/MBV-R với tỉ lệ là 400/400 nM là tối ưu nhất của phép thử duplex realtime PCR để phát hiện trình tự gen mục tiêu của HPV và MBV. Kết quả khảo sát nồng độ môi được thể hiện qua bảng 2.

**Bảng 2.** Kết quả tối ưu nồng độ cặp môi HPVth-F/HPVth-R và MBV-F/MBV-R cho duplex realtime PCR phát hiện trình tự HPV và MBV

Nghiệm thức	Tỉ lệ nồng độ môi HPV/MBV	HPV		MBV	
		Chu kì ngưỡng (Ct)	Cường độ tín hiệu huỳnh quang (dRn)	Chu kì ngưỡng (Ct)	Cường độ tín hiệu huỳnh quang (dRn)
1	100 nM /100nM	31,44 <sup>i</sup>	2,11	28,97 <sup>g</sup>	0,58
2	200 nM /100nM	28,53 <sup>g</sup>	3,41	28,91 <sup>g</sup>	0,57
3	300nM/100nM	27,92 <sup>bcdef</sup>	4,15	28,86 <sup>g</sup>	0,58
4	400nM/100nM	27,81 <sup>abcd</sup>	4,72	28,92 <sup>g</sup>	0,58
5	500nM/100nM	27,97 <sup>def</sup>	4,88	28,85 <sup>g</sup>	0,54
6	100nM/200nM	31,67 <sup>jk</sup>	2,08	28,02 <sup>abcdef</sup>	0,93
7	200nM/200nM	28,55 <sup>g</sup>	3,46	28,07 <sup>def</sup>	0,92
8	300nM/200nM	27,93 <sup>cdef</sup>	4,13	28,13 <sup>ef</sup>	0,92
9	400nM/200nM	27,79 <sup>abc</sup>	4,74	28,02 <sup>bcdef</sup>	0,95
10	500nM/200nM	27,85 <sup>abcde</sup>	5,16	27,86 <sup>abcde</sup>	0,95
11	100nM/300nM	31,75 <sup>k</sup>	2,09	27,81 <sup>abcd</sup>	1,12
12	200nM/300nM	28,51 <sup>g</sup>	3,50	28,03 <sup>cdef</sup>	1,10
13	300nM/300nM	28,06 <sup>f</sup>	4,03	28,02 <sup>bcdef</sup>	1,06
14	400nM/300nM	27,92 <sup>bcdef</sup>	4,64	27,71 <sup>a</sup>	1,08
15	500nM/300nM	27,81 <sup>abcd</sup>	5,31	27,71 <sup>ab</sup>	1,11
16	100nM/400nM	31,56 <sup>ij</sup>	2,13	27,87 <sup>abcde</sup>	1,20
17	200nM/400nM	28,43 <sup>g</sup>	3,37	28,05 <sup>cdef</sup>	1,16
18	300nM/400nM	27,97 <sup>def</sup>	4,09	27,74 <sup>abc</sup>	1,16
19	<b>400nM/400nM</b>	<b>27,76<sup>ab</sup></b>	<b>4,77</b>	<b>27,79<sup>abcd</sup></b>	<b>1,16</b>
20	500nM/400nM	27,87 <sup>abcde</sup>	5,09	27,91 <sup>abcde</sup>	1,12
21	100nM/500nM	31,22 <sup>h</sup>	2,16	28,16 <sup>ef</sup>	1,21
22	200nM/500nM	28,42 <sup>g</sup>	3,58	27,79 <sup>abcd</sup>	1,22
23	300nM/500nM	28,01 <sup>ef</sup>	4,08	27,95 <sup>abcde</sup>	1,13
24	400nM/500nM	27,71 <sup>a</sup>	4,80	28,05 <sup>cdef</sup>	1,20
25	500nM/500nM	27,86 <sup>abcde</sup>	4,90	28,33 <sup>f</sup>	1,13

Nồng độ đoạn dò (probe) cũng là 1 yếu tố quan trọng trong phản ứng duplex realtime PCR. Do đó, cần có một nồng độ đoạn dò nhất định để sử dụng vừa đủ trong quá trình thực hiện phản ứng, tránh trường hợp thiếu hoặc dư probe. Nếu nồng độ đoạn dò thấp sẽ không phản ánh chính xác hàm lượng DNA mục tiêu có trong mẫu, còn nồng độ quá cao sẽ không cần thiết và gây lãng phí. Nồng độ đoạn dò tối ưu cho phản ứng realtime PCR được khảo sát từ 50 đến 350 nM với độ tăng là 50 nM nhằm tìm ra nồng độ cho giá trị Ct nhỏ nhất, cường độ tín hiệu huỳnh quang cao nhất. Kết quả bảng 4 cho thấy nồng độ đoạn dò HPVth-P1 và MBV-P1 là 250nM và 300nM có chu kỳ ngưỡng thấp nhất và có cường độ tín hiệu huỳnh quang cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức nồng độ đoạn dò còn lại. Trong đó, nồng độ đoạn dò HPVth-P1 và MBV-P1 là 300nM, tối ưu hơn nồng độ đoạn dò HPVth-P1 và MBV-P1 250nM vì có chu kỳ

ngưỡng thấp hơn ( $C_{tFAM} = 29,13$  và  $C_{tHEX} = 29,36$ ) và cũng có tín hiệu huỳnh quang tốt nhất ( $dRn-FAM = 8,42$  và  $dRn-HEX = 1,62$ ). Như vậy, nồng độ đoạn dò HPV-P1 và MBV-P1 với tỉ lệ là 300nM là nồng độ phù hợp cho phản ứng duplex real time PCR để phát hiện trình tự gen mục tiêu của HPV và MBV. Kết quả khảo sát nồng độ đoạn dò được thể hiện qua bảng 3.

**Bảng 3.** Kết quả tối ưu nồng độ đoạn dò của cặp probe HPV-P1 và MBV-P1 cho duplex realtime PCR phát hiện trình tự HPV và MBV

Nghiem thứ	Tỉ lệ nồng độ đoạn dò HPV-P1/MBV-P1(nM)	FAM		HEX	
		Chu kì ngưỡng (Ct)	Cường độ tín hiệu huỳnh quang (dRn)	Chu kì ngưỡng (Ct)	Cường độ tín hiệu huỳnh quang (dRn)
1	50	31,11 <sup>e</sup>	6,70	30,43 <sup>c</sup>	1,31
2	100	29,95 <sup>d</sup>	7,46	29,79 <sup>b</sup>	1,44
3	150	29,54 <sup>c</sup>	7,99	29,63 <sup>ab</sup>	1,52
4	200	29,28 <sup>b</sup>	8,29	29,70 <sup>b</sup>	1,56
5	250	29,26 <sup>ab</sup>	8,36	29,54 <sup>ab</sup>	1,57
6	<b>300</b>	<b>29,13<sup>a</sup></b>	<b>8,42</b>	<b>29,36<sup>a</sup></b>	<b>1,62</b>
7	350	29,72 <sup>cd</sup>	8,02	29,75 <sup>b</sup>	1,58

Nhiệt độ gắn mỗi là một trong những chỉ tiêu quan trọng ảnh hưởng lớn đến kết quả của phản ứng realtime PCR. Nhiệt độ gắn mỗi quá cao hoặc quá thấp đều ảnh hưởng không tốt đến kết quả phản ứng realtime PCR. Nhiệt độ gắn mỗi quá thấp so với nhiệt độ biến tính của mỗi và probe sử dụng thì dễ tạo ra các sản phẩm không mong muốn. Nhiệt độ gắn mỗi quá cao sẽ cản trở sự bắt cặp của mỗi và đoạn dò vào DNA bản mẫu hiệu quả nhân bản sẽ không cao. Nhiệt độ gắn mỗi tùy thuộc vào độ lớn và nhiệt độ nóng chảy của mỗi. Thông thường nhiệt độ gắn mỗi so với nhiệt độ biến tính của mỗi sai khác  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Gradient nhiệt độ khảo sát được xác định bằng cách lấy nhiệt độ trung bình giữa mỗi có nhiệt độ thấp nhất và mỗi có nhiệt độ cao nhất  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  ( $T_a = (T_{m1} + T_{m2})/2 \pm 5$ ). Khoảng gradient nhiệt độ khảo sát từ  $55^{\circ}\text{C}$  đến  $65^{\circ}\text{C}$ . Kết quả khảo sát nhiệt độ gắn mỗi được thể hiện qua bảng 4. Kết quả bảng 4 cho thấy nhiệt độ gắn mỗi ở  $60^{\circ}\text{C}$  có chu kỳ ngưỡng thấp nhất ( $C_{tFAM} = 29,59$  và  $C_{tHEX} = 28,45$ ) và khác biệt với các mức nhiệt độ còn lại khi thực hiện phản ứng realtime PCR trên đối chứng dương là DNA chứng dương  $10^3$  copies/ phản ứng. Bên cạnh đó, nhiệt độ  $60^{\circ}\text{C}$  cho tín hiệu huỳnh quang cao hơn đa số các nhiệt độ còn lại ở nguồn mẫu DNA chứng dương. Như vậy, nhiệt độ gắn mỗi  $60^{\circ}\text{C}$  là nhiệt độ thích hợp cho hệ primer và probe HPVth-F/HPVth-R và MBV-F/MBV-R trong phản ứng duplex realtime PCR phát hiện bệnh do virus HPV và MBV.

**Bảng 4.** Kết quả khảo sát nhiệt độ gắn mỗi của cặp mỗi HPVth-F/HPVth-R và MBV-F/MBV-R trên DNA chứng dương  $10^3$  copies/phản ứng

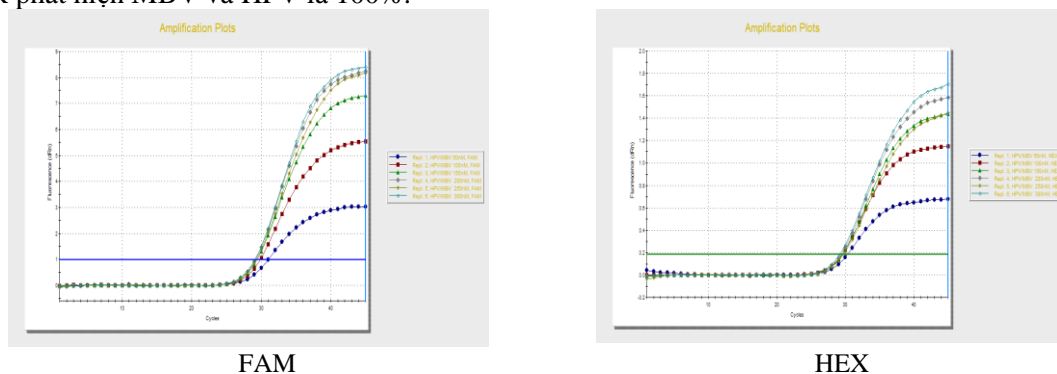
Nghiem thứ	Nhiệt độ gắn mỗi ( $^{\circ}\text{C}$ )	FAM		HEX	
		Chu kì ngưỡng (Ct)	Cường độ tín hiệu huỳnh quang (dRn)	Chu kì ngưỡng (Ct)	Cường độ tín hiệu huỳnh quang (dRn)
1	55	30,04	1,44	29,81	1,21
2	<b>60</b>	<b>29,59</b>	<b>1,52</b>	<b>28,45</b>	<b>1,22</b>
3	65	30,93	1,56	29,30	1,13

### 3.3. Xác định các thông số kỹ thuật của quy trình duplex realtime PCR phát hiện virus hepatopancreatic parvovirus (HPV) và virus monodon baculovirus (MBV)

#### 3.3.1. Kiểm tra độ chọn lọc của phương pháp

Kết quả phản ứng duplex realtime PCR phát hiện virus *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) và virus *Monodon baculovirus* (MBV) được thể hiện qua Hình 5 cho thấy, chỉ có DNA ly trích từ các mẫu tôm khảng định dương tính với HPV và MBV thu thập ở các vùng sinh thái khác nhau có tín hiệu huỳnh quang vượt ngưỡng (dương tính). Ngược lại, đối với các mẫu DNA ly trích từ các virus khác gây bệnh trên tôm như WSSV, IHHNV, AHPND, YHV, EHP thì tín hiệu huỳnh quang nằm dưới đường tín hiệu huỳnh quang nền (âm tính) (Hình 5). Từ đó, cho thấy quy trình

duplex realtime PCR xây dựng chỉ phát hiện virus *hepatopancreatic parvovirus* (HPV) gây bệnh teo gan tụy HPD và virus *monodon baculovirus* (MBV) gây bệnh còi MBV trên tôm và không phát hiện các virus khác gây bệnh trên tôm. Như vậy, độ chọn lọc của quy trình duplex realtime PCR phát hiện MBV và HPV là 100%.



**Hình 5.** Kết quả kiểm tra độ chọn lọc của phương pháp duplex realtime PCR trên mẫu tôm dương tính với HPV và MBV ở các vùng khác nhau ((FAM: HPV; HEX: MBV)

### 3.3.2. Xác định giới hạn phát hiện của phương pháp ( $LOD_{50}$ )

Các thí nghiệm để xác định  $LOD_{50}$  được thực hiện trên các mẫu tôm kháng định âm tính với virus *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) và *monodon baculovirus* (MBV). Tiếp theo, các mẫu DNA này sẽ được nhiễm chủ động chúng dương có vật liệu di truyền của HPV và MBV ở mật độ như sau: 1 copy/ $\mu$ l; 5 copy/ $\mu$ l; 10 copy/ $\mu$ l; 20 copy/ $\mu$ l; 40 copy/ $\mu$ l; 80 copy/ $\mu$ l; 100 copy/ $\mu$ l. Kết quả phát hiện trình tự gen mục tiêu của HPV và MBV trong các mẫu đã gây nhiễm được trình bày ở Bảng 5.

**Bảng 5.** Kết quả xác định giới hạn phát hiện  $LOD_{50}$  của phương pháp duplex realtime PCR phát hiện virus *hepatopancreatic parvovirus* (HPV) và virus *monodon baculovirus* (MBV)

Nồng độ DNA (copy/phản ứng)	Số lần lặp lại	FAM		HEX	
		Số lần cho kết quả dương tính	Tỉ lệ dương tính	Số lần cho kết quả dương tính	Tỉ lệ dương tính
1	6	0	0	0	0
5	6	3	0,5	4	0,67
10	6	3	0,5	4	0,67
20	6	4	0,67	4	0,67
40	6	6	1	6	1
80	6	6	1	6	1
100	6	6	1	6	1

Kết quả cho thấy giới hạn phát hiện  $LOD_{50}$  trung bình của phương pháp duplex realtime PCR phát hiện *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) và *Monodon baculovirus* (MBV) trên vật liệu di truyền của HPV và MBV với nồng độ DNA là 5 copy/phản ứng, với độ tin cậy 95%, giá trị  $LOD_{50}$  của phương pháp dao động trong khoảng 5-10 copy/ phản ứng. Kết quả nghiên cứu này có độ nhạy gần tương đương với kết quả nghiên cứu ứng dụng phương pháp duplex realtime để phát hiện và định lượng *monodon baculovirus* (MBV) và *hepatopancreatic parvovirus* (HPV) ở tôm sú của Tang & Lightner (2011) với độ nhạy từ 1- 10 copy/phản ứng [1].

### 3.3.3. Xác định các thông số kỹ thuật của phương pháp

Các thông số kỹ thuật được xác định cho nhóm mẫu tôm. Nhóm mẫu được thực hiện trên các mẫu trắng – âm tính với HPV và MBV. Mật độ gây nhiễm trong khoảng 50-100 copy/phản ứng. Kết quả khảo sát các thông số kỹ thuật của phương pháp duplex realtime PCR phát hiện *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) và *Monodon baculovirus* (MBV) được tính toán và tóm tắt trong Bảng 6.

**Bảng 6.** Kết quả xác định các thông số kỹ thuật của phương pháp duplex realtime PCR phát hiện *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) và *Monodon baculovirus* (MBV) được đánh giá và so sánh với Kit thương mại

Nền mẫu	Độ đặc hiệu (%)	Độ nhạy (%)	Độ chính xác (%)	Tỷ lệ âm tính giả (%)	Tỷ lệ dương tính giả (%)
Mẫu tôm	100	100	100	0	0
Yêu cầu(*)	≥ 90,4	≥ 98	≥ 94	≤ 2	≤ 9,6

(\*) Tham chiếu theo MMC- Microbiology Methods Committee, Canada

Kết quả Bảng 6 cho thấy các thông số kỹ thuật nói trên của phương pháp duplex realtime PCR phát hiện *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) và *Monodon baculovirus* (MBV) cho thấy hoàn toàn đáp ứng yêu cầu của phương pháp phân tích tiêu chuẩn. Thời gian cho kết quả phân tích bằng phương pháp duplex realtime PCR phát hiện *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) và *Monodon baculovirus* (MBV) trong vòng 4-6 giờ. Đây là cơ sở kỹ thuật để triển khai áp dụng phương pháp duplex realtime PCR phát hiện *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) và *Monodon baculovirus* (MBV) đến các phòng thí nghiệm phân tích bệnh trên tôm.

#### 4. Kết luận

Đã tối ưu hóa được quy trình phát *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) và *Monodon baculovirus* (MBV) trên tôm bằng phương pháp duplex realtime PCR khuếch đại đoạn gen mục tiêu HPV và MBV. Quy trình thiết lập được các thông số cơ bản như sau: tỉ lệ nồng độ mỗi (HPV/MBV) lần lượt là 400 nM/ 400 nM, nồng độ đoạn dò (Taqman probe) HPV (300 nM), nồng độ đoạn dò (Taqman probe) MBV (300nM). Với chu trình nhiệt là 95°C trong 5 phút; 40 chu kỳ 95°C trong 15 giây; 60°C trong 1 phút. Kết quả các thông số kỹ thuật cho thấy, độ đặc hiệu (SP) đạt 100%; độ nhạy (SE) 100%; độ chính xác (AC) 100%; tỷ lệ dương tính giả (0%); tỷ lệ âm tính giả (0%); giới hạn phát hiện (LOD<sub>50</sub>) với nồng độ DNA 5 copy/phản ứng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] K. F. J. Tang and D. V. Lightner, "Duplex realtime PCR for detection and quantification of monodon baculovirus (MBV) and hepatopancreatic parvovirus (HPV) in *Penaeus monodon*," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 93, pp. 191-198, 2011.
- [2] D. C. Yan, K. F. J. Tang, and D. V. Lightner, "Development of a realtime PCR assay for detection of *monodon baculovirus* (MBV) in penaeid shrimp," *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 102, pp. 97-100, 2009.
- [3] M. P. Safeena, P. Rai, and I. Karunasagar, "Molecular Biology and Epidemiology of Hepatopancreatic parvovirus of Penaeid Shrimp," *Indian Journal of Virology*, vol. 23, no. 2, pp. 191-202, 2012.
- [4] W. Sukhumsirichart, W. Kiatpathomchai, C. Wongteerasupaya, B. Withyachumnarnkul, T. W. Flegel, V. Boonseang, and S. Panyim, "Detection of *hepatopancreatic parvovirus* (HPV) infection in *Penaeus monodon* using PCR-ELISA," *Molecular and Cellular Probes*, vol. 16, pp. 409-413, 2002.
- [5] O. H. T. Dang, T. D. N. Tran, and T. V. Tran, "Multiplex PCR protocol for simultaneous detection of *white spot syndrome virus* (WSSV) and *hepatopancreatic parvovirus* (HPV) in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 3, pp. 144-150, 2010.
- [6] S. Jeeva, N. I. Kim, I. K. Jang, and T. J. Choi, "Development of Two Quantitative Realtime PCR Diagnostic Kits for HPV Isolates from Korea," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 22, no. 10, pp. 1350-1358, 2012.
- [7] R. Yadav, A. Paria, S. Mankame, M. Makesh, A. Chaudhari, and K. V. Rajendran, "Development of SYBR Green and TaqMan quantitative realtime PCR assays for *hepatopancreatic parvovirus* (HPV) infecting *Penaeus monodon* in India," *Molecular and Cellular Probes*, vol. 29, no. 6, pp. 442-448, 2015.
- [8] D. R. Kumar, M. Sanjuktha, J. J. S. Rajan, R. A. Bharathi, T. C. Santiago, S. V. Alavandi, and M. Poornima, "Development of SYBR Green based real time PCR assay for detection of monodon baculovirus in *Penaeus monodon*," *Journal of Virological Methods*, vol. 205, pp. 81-86, 2014.
- [9] W. Sukhumsirichart, C. Wongteerasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim, S. Sriurairatana, B. Withyachumnarnkul, and T. W. Flegel, "Characterization and PCR detection of *hepatopancreatic parvovirus* (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 38, pp. 1-10, 1999.
- [10] OIE, *Hepatopancreatic parvovirus disease*, OIE Aquatic Animal Disease Cards, 2007.