

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT REALTIME-PCR TRONG CHẨN ĐOÁN VIRUS TÚI (SACBROOD VIRUS) NHIỄM TRÊN ĐÀN ONG MẬT NUÔI TẠI HÀ NỘI

PHẠM HỒNG THÁI, TRỊNH THỊ THU THỦY, NGUYỄN THỊ LAN,
NGUYỄN VĂN CƯỜNG, NGUYỄN VĂN GIANG,
HÀ VIỆT CƯỜNG, ĐẶNG HƯƠNG LAN
Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Việt Nam nằm trong vùng có khí hậu nhiệt đới gió mùa nên có nguồn hoa và nguồn mật phong phú phù hợp cho sự phát triển nghề nuôi ong mật. Do đó, nghề nuôi ong lấy mật từ lâu đã và đang đóng một vai trò quan trọng trong đời sống con người bởi vì: Nó mang lại lợi nhuận kinh tế to lớn cho người nuôi ong, có giá trị chữa bệnh, giải trí và giữ cân bằng sinh thái (Phùng Hữu Chính, 2012; Crane, 1991).

Cũng như các động vật khác ong mật dễ bị tấn công bởi một số vi sinh vật. Trong đó, nguy hiểm hơn cả là bệnh do virus, vì bệnh do virus không thể điều trị bằng thuốc kháng sinh được. Trong số hơn 18 loại virus gây hại cho ong mật (Bakonyi *et al.*, 2002; Aubert *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2008, Thai *et al.*, 2011) thì *Sacbrood virus* gây chết ấu trùng, là một trong những bệnh virus nghiêm trọng nhất (Ball, 1999; Liu *et al.*, 2010; Neumann and Careck, 2010). Bệnh làm chết ấu trùng chủ yếu ở giai đoạn sau vít nắp và tiền nhộng. Khả năng lây nhiễm của virus này là rất lớn, chỉ cần một ấu trùng bệnh có thể lây nhiễm cho 3000 đàn ong khỏe (Bailey and Ball, 1991). Việc phát hiện sớm virus này là vô cùng quan trọng để đưa ra phương pháp phòng trị kịp thời và ngăn ngừa được tồn dư kháng sinh trong mật ong (Mascher *et al.*, 1996). Trong số các phương pháp chẩn đoán hiện đại thì kỹ thuật Realtime-PCR (hay còn gọi là quantitative PCR/qPCR) được cho là nhanh và chính xác hơn cả (Fleige and Michael, 2006; Siede *et al.*, 2008). Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá độ nhạy của kỹ thuật Realtime-PCR so với kỹ thuật RT-PCR (Reverse Transcription PCR) và khả năng phát hiện virus ở nồng độ thấp.

I. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng: Mẫu ấu trùng ong được thu thập ở Gia Lâm và bảo quản trong cồn (ethanol 90⁰) ở điều kiện phòng thí nghiệm cho đến khi tách chiết RNA.

Phương pháp tách chiết RNA tổng số: RNA tổng số được tách chiết từ 18 mẫu ấu trùng ong bằng TRIzol-LS (*Invitrogen*). Trước khi tiến hành thực hiện phản ứng PCR, sản phẩm tách chiết được kiểm tra hàm lượng và độ tinh sạch bằng máy NanoDrop.

Cặp môi sử dụng: Trong cả hai kỹ thuật RT-PCR và Realtime-PCR đều sử dụng cặp môi SB1f-SB2r (Grabensteiner *et al.*, 2001), mỗi môi bao gồm 20 nucleotid sau đây: SB1f (ACC AAC CGA TTC CTC AGT AG), SB2r (CCT TGG AAC TCT GCT GTG TA)

Quy trình RT-PCR: One step RT-PCR, với thành phần phản ứng và chu trình nhiệt như sau:

Thành phần phản ứng (20µl)		Chu trình nhiệt		
		Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ
H ₂ O	7,5µl			
Dream Taq Master Mix 2X	10,0µl	42	30 phút	1x
Mồi SB 1 f	0,5µl	95	5 phút	1x
Mồi SB 2 r	0,5µl	94	45 giây	35x
Reverse aid	0,5µl	54	30 giây	
RNA	1,0µl	72	1 phút	

Điện di sản phẩm RT-PCR: Sau khi chạy xong phản ứng RT-PCR, sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose (1%) ở hiệu điện thế 100V trong thời gian 20 phút. Bản gel sau khi điện di được đọc kết quả trên hệ thống UV geldoc-Biorad.

Quy trình Realtime-PCR với thành phần phản ứng và chu trình nhiệt như sau:

Thành phần phản ứng (20µl)		Chu trình nhiệt		
		Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ
H ₂ O	8,2µl			
QuantiFast SYBR Green RT-PCR	10,0µl	50	10 phút	1x
Mồi SB 1 f	0,3µl	95	5 phút	1x
Mồi SB 2 r	0,3µl	95	10 giây	40x
QuantiFast RT Mix	0,2µl	54	30 giây	
RNA	1,0µl	72	1 phút	
		95	0 giây	1x

Xác định nồng độ virus có thể phát hiện trên mẫu bệnh: Pha loãng các mẫu RNA từ 10⁻¹ đến 10⁻⁷ và thực hiện phản ứng Realtime - PCR (theo quy trình như mô tả ở trên).

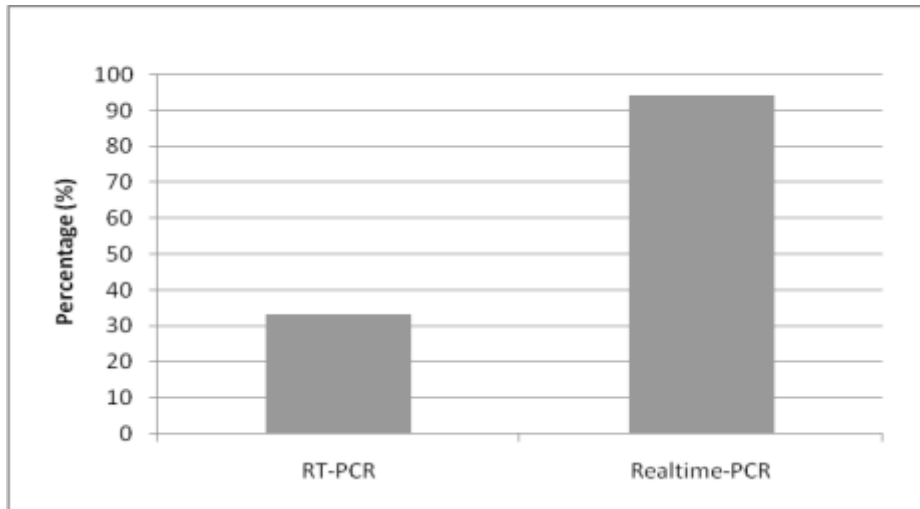
II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Tất cả các mẫu RNA tách chiết được đều có hàm lượng và độ tinh sạch cần thiết cho phản ứng PCR. Kết quả phân tích được trình bày ở bảng 1 và hình 1 cho thấy: Trong khi kỹ thuật RT-PCR chỉ phát hiện được 6/18 mẫu dương tính (33,33%) thì với kỹ thuật Realtime-PCR đã phát hiện hầu hết các mẫu mẫu dương tính, 17/18 (94,44%). Rõ ràng kỹ thuật Realtime-PCR có độ nhạy cao hơn nhiều so với kỹ thuật RT-PCR.

Bảng 1

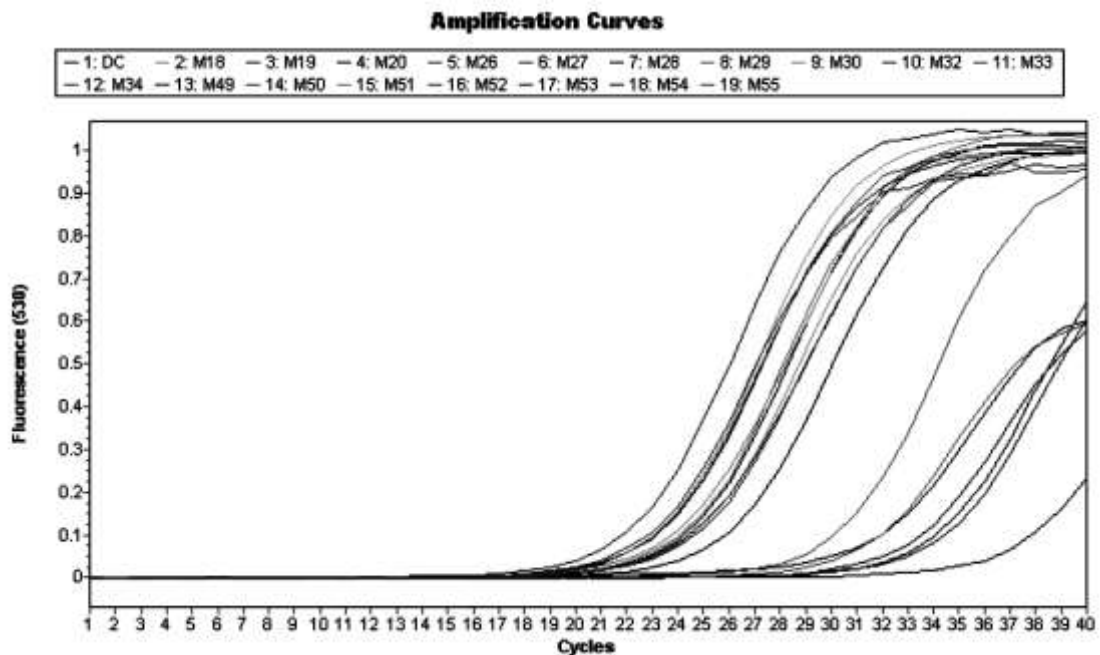
Kết quả kiểm tra của 2 kỹ thuật PCR

TT	Số hiệu mẫu	PCR	RT-PCR	TT	Số hiệu mẫu	PCR	RT-PCR
1	M18	+	+	10	M33	-	+
2	M19	-	-	11	M34	-	+
3	M20	+	+	12	M49	+	+
4	M26	-	+	13	M50	-	+
5	M27	+	+	14	M51	-	+
6	M28	+	+	15	M52	-	+
7	M29	+	+	16	M53	-	+
8	M30	-	+	17	M54	-	+
9	M32	-	+	18	M55	-	+



Hình 1. Tỷ lệ chẩn đoán của hai phương pháp RT-PCR và Realtime-PCR

Hình 2 cho thấy nồng độ RNA của virus trong các mẫu cho đường cong khuếch đại khác nhau. Những đường xuất hiện sớm là các mẫu có nồng độ virus cao hơn và ngược lại là mẫu có nồng độ thấp hoặc âm tính (mẫu đối chứng âm). XEM BÔNG 1592, 1593



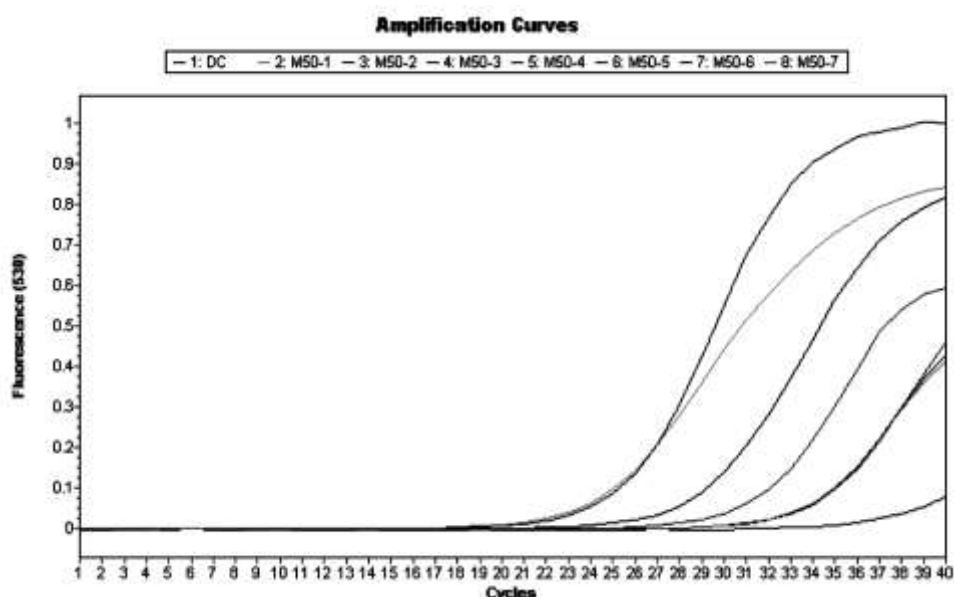
Hình 2. Đường cong khuếch đại sản phẩm RNA của 18 mẫu virus

Để làm sáng tỏ độ nhạy của phản ứng Realtime-PCR, chúng tôi tiến hành pha loãng RNA tổng số của mẫu M50 (mẫu dương tính trong bảng 1) từ 10^{-1} đến 10^{-7} . Phản ứng Realtime-PCR được thực hiện và kết quả được trình bày tại bảng 2 và hình 3 thì đến nồng độ 10^{-7} không thể phát hiện được trên máy.

Bảng 2

Chu kỳ ngưỡng và nhiệt độ nóng chảy của các mẫu pha loãng

TT	Số hiệu mẫu	Chu kỳ ngưỡng	Nhiệt độ nóng chảy
1	DC (-)	> 35.00	76.63
2	M50-1	23.97	81.17
3	M50-2	24.87	81.68
4	M50-3	28.50	81.79
5	M50-4	30.65	81.89
6	M50-5	32.56	81.95
7	M50-6	34.26	82.00
8	M50-7	> 35.00	76.18



Hình 3. Đường cong khuếch đại của các mẫu pha loãng (10^{-1} - 10^{-7})

Kết quả thí nghiệm xác định chu kỳ ngưỡng và nhiệt độ nóng chảy của các mẫu pha loãng (bảng 2) cũng cho thấy: Mẫu càng loãng dần thì chu kỳ ngưỡng càng cao và khi nồng độ pha loãng tới 10^{-7} thì Realtime-PCR không phát hiện được (mẫu âm tính). Trong khi đó theo Bailey and Ball (1991) thì một ấu trùng chết do bệnh này có chứa khoảng 10^{12} phần tử virus. Trong thực tế thí nghiệm này, chúng tôi chỉ lấy $\frac{1}{2}$ cơ thể ấu trùng bị bệnh, do đó khi pha loãng tới 10^{-7} thì gần như không còn khả năng phát hiện virus trong mẫu. Điều này cũng chứng tỏ rằng chỉ một lượng nhỏ virus có trong ấu trùng ong bệnh vẫn có thể phát hiện được.

III. KẾT LUẬN

Kỹ thuật Realtime-PCR ứng dụng trong chẩn đoán bệnh ấu trùng tui cho tỷ lệ phát hiện dương tính đối với Sacbrood virus cao hơn kỹ thuật RT-PCR nhiều lần (94,44%).

Chẩn đoán Sacbrood virus bằng Realtime-PCR cho khả năng phát hiện ở nồng độ pha loãng 10^{-6} so với nồng độ gốc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Aubert M., Ball B.V., Fries I., Moritz R., Milani N., Bernardinelli I.** 2008. Virology and the honey bee. Directorate-General for Research EUR: 489 pp.
2. **Bailey. L. & Ball. B.V.,** 1991. Honey bee pathology. Academic Press, UK: 193 pp.
3. **Bakonyi T., Grabensteiner E., Kolodziejek J., Rusvai M., Topolska G., Ritter W. & Nowotny N.,** 2002. Phylogenetic analysis of acute bee paralysis virus strains. Appl. and Environ. Microbiology, 68 (12): 6446-6450.
4. **Ball B.V,** 1999. Sacbrood. In M.E. Colin *et al.* (ed.), Bee disease diagnosis. Options Mediteranéennes, Zaragoza, Spain: 91-97.
5. **Fleige S. & Michael W.P.,** 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. Molecular Aspects of Medicine 27 (2006): 126-139.
6. **Grabensteiner E., Ritter W., Carter M. J., Davison S., Pechhacker H., Kolodziejek J., Boecking O., Derakhshifar I., Moosbeckhofer R., Licek E. & Nowony N.,** 2001. Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): Rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. Clin. Diagn. Lab. Immun. 8 (1): 93-104.
7. **Liu X., Zhang Y., Yan X. & Han R.,** 2010. Prevention of Chinese Sacbrood Virus Infection in *Apis cerana* using RNA Interference. Current Microbiology Publisher: Springer New York.
8. **Mascher A., Lavagnoli S. & Curatolo M.,** 1996. Determination of residual oxytetracycline in honey with an immunoassay kit. Apidologie (1996) 27: 229-233
9. **Neumann P. & Carreck N.L.,** 2010. Honey bee colony losses. J. Apicultureal Research 49 (1): 1-6.
10. **Nielsen S.L., Nicolaisen M. & Kryger P.,** 2008. Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. Apidologie, 39 (2008): 310-314
11. **Siede R., Konig M., Buchler R., Failing K., Thiel H.J.,** 2008. A real-time PCR based survey on acute bee paralysis virus in German bee colonies. Apidologie, 39: 650-661.
12. **Thai P.H., Cuong H.V., Giang N.V., Chien T.D., Dinh N.V., Hung H.Q.,** 2011. Molecular detections of sacbrood and deformed wing virus infected on *Apis mellifera* in the northern Vietnam. Sci. and Tech. J. Agric. and Rural Devel., 165: 33-36.

APPLICATION OF REALTIME-PCR FOR DETECTING SACBROOD VIRUS ON HONEYBEES IN HA NOI

PHAM HONG THAI, TRINH THI THU THUY, NGUYEN THI LAN,
NGUYEN VAN CUONG, NGUYEN VAN GIANG, HA VIET CUONG, DANG HUONG LAN

SUMMARY

As well as other animals, honeybees are often infected by microorganism included sacbrood virus (SBV). The early infective SBV detection and diagnosis became necessary for control of SBV. In this research, the Realtime-PCR (qPCR) technique was applied in comparison with RT-PCR technique in which the total RNA were extracted by TRIzol-LS. The results of examination of 18 honeybee samples that analysed with both techniques were showed with significant differences, in which qPCR was positive detection with 17/18 samples (94.44%) while RT-PCR technique was detected only 6/18 positive samples (33.33%). In addition, the experiment, qPCR was showed the high capacity for SBV detection even with the dilutation concentration of 10^{-6} that is more sensirive in comparison with RT-PCR technique.