

Research Article**Development and validation of a real-time PCR method for quantification of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in plant protection products****Vu Khanh Van, Tran Hong Ba, Pham Ngoc Ha, Pham Van Quan****National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam**(Received: 21 Jan 2026; Revised: 04 Feb 2026; Accepted: 13 Feb 2026)***Abstract**

Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus (HearNPV) is a biological control agent used for the management of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*, an insect pest that causes significant damage to a wide range of economically important crops. The development and use of biological pesticides containing HearNPV have contributed to reducing the adverse impacts of chemical pesticides and are consistent with the orientation toward sustainable agricultural development. However, the conventional method for quantifying viral occlusion bodies (OBs) using a hemocytometer has several limitations in terms of accuracy, repeatability, and the ability to distinguish OBs from particulate excipients present in the formulation matrix. Real-time PCR enables the sensitive, specific, and highly reproducible detection and quantification of viral DNA and has been successfully applied for the quality control of various viral preparations worldwide.

In this study, a real-time PCR method for the quantification of HearNPV occlusion bodies was developed based on the amplification of a virus-specific fragment of the DNA polymerase gene. DNA extracted from samples with known concentrations, determined using a hemocytometer, was used to establish a standard curve, which served as the basis for quantifying the corresponding OB concentration in plant protection products. The results showed that the developed method achieved 100% accuracy, sensitivity, and specificity, with a limit of detection and limit of quantification of 10^2 OBs/mL, while no amplification signal was observed in the negative control samples. The standard curve demonstrated a strong linear correlation between the Ct values and $\log_{10}$ viral OB concentration ($R^2 = 0.995$), with an amplification efficiency of 90.5%. Both repeatability and reproducibility met the acceptance criteria specified in ISO 22118:2011. These findings demonstrate the potential of the developed method for the quantification and quality control of plant protection products containing HearNPV.

Keywords: *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus; real-time PCR; virus quantification; plant protection products; hemocytometer.

*Corresponding author: Pham Van Quan (E-mail: quanpham9719@gmail.com)
<https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4757>

Copyright © 2026 The author(s). This article is licensed under [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Xây dựng phương pháp định lượng *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus trong thuốc bảo vệ thực vật bằng kỹ thuật real-time PCR

Vũ Khánh Vân, Trần Hồng Ba, Phạm Ngọc Hà, Phạm Văn Quân
Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus (HearNPV) là tác nhân sinh học được ứng dụng trong phòng trừ sâu xanh đục trái *Helicoverpa armigera*, đối tượng gây hại nghiêm trọng trên nhiều cây trồng kinh tế. Việc phát triển và sử dụng thuốc bảo vệ thực vật sinh học chứa HearNPV góp phần giảm thiểu tác động bất lợi của thuốc hóa học, phù hợp với định hướng phát triển nông nghiệp bền vững. Tuy nhiên, phương pháp định lượng thể vùi virus (occlusion bodies - OB) truyền thống bằng buồng đếm hồng cầu còn nhiều hạn chế về độ chính xác, tính lặp lại và khả năng phân biệt OB với các hạt phụ gia trong nền chế phẩm. Kỹ thuật real-time PCR cho phép phát hiện và định lượng DNA virus với độ nhạy, độ đặc hiệu và độ lặp lại cao, đã được ứng dụng thành công trong kiểm soát chất lượng nhiều chế phẩm virus trên thế giới. Trong nghiên cứu này, phương pháp real-time PCR định lượng thể vùi HearNPV được xây dựng dựa trên việc khuếch đại đoạn gen mã hóa DNA polymerase đặc hiệu của virus. DNA tách chiết từ mẫu thử có nồng độ xác định bằng buồng đếm hồng cầu được sử dụng để thiết lập đường chuẩn và làm cơ sở định lượng mật độ OB tương ứng trong mẫu thuốc bảo vệ thực vật. Kết quả cho thấy phương pháp xây dựng có độ chính xác, độ nhạy và độ đặc hiệu đạt 100%, với giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng là 10^2 OB/mL và không ghi nhận tín hiệu khuếch đại ở các mẫu đối chứng âm. Đường chuẩn thu được có mối tương quan tuyến tính tốt giữa giá trị Ct và $\log_{10}$ nồng độ virus ($R^2 = 0,995$), với hiệu suất khuếch đại đạt 90,5%; độ lặp lại và độ tái lập đều đáp ứng tiêu chí chấp nhận theo ISO 22118:2011. Từ đây, phương pháp cho thấy tiềm năng ứng dụng trong định lượng và kiểm soát chất lượng thuốc bảo vệ thực vật sinh học chứa HearNPV.

Từ khóa: *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus; real-time PCR; định lượng virus; thuốc bảo vệ thực vật; buồng đếm hồng cầu.

1. GIỚI THIỆU

Việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) hóa học đã góp phần đáng kể trong việc kiểm soát sâu bệnh và nâng cao năng suất cây trồng trong nông nghiệp hiện đại. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc lạm dụng thuốc trừ sâu hóa học gây ra những tác động tiêu cực nghiêm trọng đối với môi trường và sức khỏe con người, bao gồm ô nhiễm đất và nước, tồn dư hóa chất trong thực phẩm, suy giảm đa dạng sinh học và làm gia tăng nguy cơ kháng thuốc ở sinh vật gây hại [1, 2]. Trước những thách thức đó, thuốc BVTV sinh học được xem là giải pháp thay thế bền vững. Các chế phẩm sinh học có nguồn gốc từ vi sinh vật, thực vật hoặc khoáng chất thường có độc tính thấp, khả năng phân hủy sinh học cao và ít ảnh hưởng đến sinh vật không phải mục tiêu, phù hợp với định hướng nông nghiệp sinh thái và nông nghiệp hữu cơ [3, 4]. Trong số các nhóm thuốc BVTV sinh học, các chế phẩm có nguồn gốc từ virus côn trùng, đặc biệt là các virus thuộc họ Baculoviridae, đã thu hút sự quan tâm lớn nhờ tính đặc hiệu cao và độ an toàn sinh học tốt. Baculovirus xâm nhập vật chủ chủ yếu qua đường tiêu hóa, trong đó thể vùi virus (occlusion bodies - OBs) là dạng tồn tại chính trong các chế phẩm thương mại [5, 6]. Baculovirus xâm nhiễm vật chủ thông qua biểu mô ruột giữa, nơi DNA virus được giải phóng từ các OB. Quá trình tiết chitinase sau đó phá hủy cấu trúc tế bào, dẫn đến cái chết của vật chủ [15], đồng thời vẫn duy trì tính đặc hiệu cao, không ảnh hưởng đến các sinh vật có ích [16].

Sâu xanh đục trái hay *Helicoverpa armigera* là một trong những loài sâu hại nguy hiểm nhất trên phạm vi toàn cầu, có phổ ký chủ rộng và gây thiệt hại nghiêm trọng trên nhiều cây trồng kinh tế quan trọng như bông vải, cà chua, ngô và cây ăn quả. Đáng chú ý, loài sâu này có khả năng phát triển tính kháng nhanh đối với nhiều nhóm thuốc BVTV hóa học, làm giảm hiệu quả phòng trừ và gia tăng chi phí sản xuất nông nghiệp [7, 8]. Trong bối cảnh đó, *H. armigera* nucleopolyhedrovirus (HearNPV) thuộc chi *Alphabaculovirus* đã được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi như một tác nhân kiểm soát sinh học đặc hiệu đối với sâu xanh đục trái. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả phòng trừ cao của HearNPV trong điều kiện phòng thí nghiệm và thực địa, đồng thời ghi nhận mức độ an toàn cao đối với con người, động vật và các sinh vật có ích [9]. Hiệu lực sinh học của thuốc BVTV chứa baculovirus phụ thuộc chặt chẽ vào nồng độ OB và chất lượng virus trong chế phẩm. Sự

biến động về mật độ OB virus giữa các lô sản xuất, sự suy giảm hoạt tính trong quá trình bảo quản và ảnh hưởng của các chất mang, phụ gia có thể làm giảm đáng kể hiệu quả phòng trừ sâu hại [5, 10].

Hiện nay, phương pháp định lượng OB virus phổ biến nhất là đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu hoặc kính hiển vi quang học. Tuy nhiên, các phương pháp này có nhiều hạn chế như độ chính xác không cao, phụ thuộc lớn vào kinh nghiệm của người thao tác, khó phân biệt thể vùi nguyên vẹn và thể vùi bị hư hỏng, cũng như dễ bị nhiễu bởi các thành phần nền trong chế phẩm thuốc BVTV [11]. Sự phát triển của các kỹ thuật sinh học phân tử, đặc biệt là PCR định lượng thời gian thực (real-time PCR), đã mở ra hướng tiếp cận mới trong phát hiện và định lượng virus. Real-time PCR cho phép định lượng chính xác DNA virus thông qua mối tương quan giữa chu kỳ ngưỡng (Ct) và log nồng độ DNA mục tiêu, với độ nhạy cao, dải động rộng và khả năng tái lập tốt [11, 12]. Trong những năm gần đây, real-time PCR đã được ứng dụng thành công để định lượng nhiều baculovirus khác nhau như HearNPV và *Spodoptera exigua* NPV trong cả nghiên cứu và kiểm soát chất lượng sản phẩm thương mại, cho thấy tiềm năng lớn của phương pháp này trong việc tiêu chuẩn hóa thuốc BVTV sinh học [11, 12]. Tuy nhiên, tại Việt Nam, việc xây dựng và áp dụng các phương pháp real-time PCR định lượng baculovirus trong thuốc BVTV sinh học vẫn còn hạn chế, đặc biệt là thiếu các quy trình được thẩm định theo tiêu chuẩn quốc tế và phù hợp với điều kiện kiểm nghiệm trong nước. Nhu cầu xây dựng phương pháp kiểm nghiệm hiệu quả cho thuốc BVTV sinh học ngày càng trở nên cấp thiết, đặc biệt trong bối cảnh ngành nông nghiệp đang định hướng phát triển bền vững, hữu cơ và an toàn sinh học [17].

Việc phát triển phương pháp real-time PCR nhằm định lượng HearNPV không chỉ giúp đánh giá chính xác nồng độ virus trong chế phẩm mà còn hỗ trợ kiểm soát chất lượng sản xuất, tiêu chuẩn hóa sản phẩm và tuân thủ các yêu cầu pháp lý ngày càng cao đối với thuốc BVTV. Mục tiêu của nghiên cứu này là xây dựng và thẩm định một quy trình real-time PCR định lượng HearNPV trong thuốc bảo vệ thực vật, đánh giá các thông số kỹ thuật cơ bản như giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ nhạy, độ chính xác, độ đặc hiệu, độ lặp lại và độ tái lập, từ đó đề xuất một phương pháp có thể áp dụng trong thực tiễn kiểm nghiệm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng/Nguyên liệu nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên mẫu kiểm soát chất lượng (Quality Control, QC) là chế phẩm thuốc bảo vệ thực vật sinh học dạng bột chứa HearNPV do Henan Jiyuan Baiyun Industry Co., Ltd. sản xuất và được cung cấp thông qua nhà phân phối là Công ty TNHH Nông Sinh. Mẫu QC được nhập khẩu từ Trung Quốc và bảo quản trong điều kiện đông lạnh nhằm đảm bảo tính toàn vẹn của virus cũng như nồng độ các thể vùi virus. Theo thông tin kỹ thuật do nhà sản xuất cung cấp, nồng độ công bố của mẫu QC là $5,0 \times 10^{10}$ HearNPV OB/mL (Certificate of Analysis: HearNPV- Batch No.:250125).

2.2. Hóa chất, thiết bị

2.2.1. Hóa chất chính

Các hóa chất chính được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: bộ kit tách chiết QIAamp MinElute Media Kit (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ); Luminaris HiGreen qPCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ); môi tổng hợp (Integrated DNA Technologies - IDT, Hoa Kỳ); hóa chất ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) và BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit dùng cho quá trình làm sạch sản phẩm PCR trước khi giải trình tự gen; ống PCR chuyên dụng cho real-time PCR (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) và các hóa chất phụ trợ khác phục vụ quá trình phân tích.

2.2.2. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị và dụng cụ chính được sử dụng trong nghiên cứu gồm: máy real-time PCR CFX96 Touch (Bio-Rad, Hoa Kỳ); máy đo quang phổ NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ); máy ly tâm lạnh MIKRO 220R (Hettich, Đức); máy ly tâm mini spindown (GeneReach, Đài Loan); máy lắc vortex (IKA, Đức); kính hiển vi quang học (Olympus, Nhật Bản); buồng đếm hồng cầu Neubauer (Marienfeld, Đức) cùng các thiết bị và dụng cụ phụ trợ khác.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Tinh sạch và định lượng HearNPV bằng buồng đếm hồng cầu

Tiến hành ly tâm mẫu với tốc độ 1.500 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ dịch môi trường. Các lần tiếp theo

được tiến hành sau khi pha loãng bằng nước cất vô trùng hoặc dung dịch SDS 0,1%, sau đó ly tâm ở tốc độ 1.500 vòng/phút trong 5 phút và gạn bỏ phần dịch nổi. Phần cặn màu trắng đục chứa thể vùi virus sau đó được hòa tan trong nước cất vô trùng để tạo thành huyền phù virus [13].

Huyền phù virus sau đó được pha loãng thập phân nối tiếp và lựa chọn độ pha loãng phù hợp để định lượng bằng buồng đếm hồng cầu. Đặt và ấn cố định lamên lên trên cùng của buồng đếm. Nhỏ 10 μ L huyền phù chứa OB virus vào mép của tấm lamên phủ. Chờ cho đến khi chất lỏng được hút hoàn toàn vào buồng đếm nhờ hiện tượng mao dẫn. Bề mặt của lưới phải được bao phủ hoàn toàn bởi huyền phù virus. Tiến hành đếm tại 5 ô vuông lớn, kích thước mỗi ô vuông lớn là 1×1 mm. Mỗi mẫu được đếm lặp lại 3 lần độc lập; mỗi lần lặp sử dụng huyền phù đã được trộn đều trước khi đếm. Tiến hành tính toán kết quả theo công thức dưới đây:

$$\text{Tổng số thể vùi (OB) trên mL} = \text{Số OB trung bình trên một ô vuông lớn} \times \text{hệ số pha loãng} \times 10^4$$

2.3.2. Kỹ thuật tách chiết DNA và giải trình tự gen

DNA virus HearNPV được tách chiết theo quy trình của bộ kit QIAamp MinElute Virus. Nồng độ DNA tổng số của HearNPV được định lượng bằng máy Nanodrop tại bước sóng 260 nm và có mật độ quang OD₂₆₀ từ 1,8 - 2,0. Dung dịch chứa DNA được bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng.

Kiểm tra trình tự của đoạn gen đích theo quy trình của bộ kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing nhằm khẳng định mẫu đối chứng dương. Thực hiện giải trình tự đoạn gen đích *HanDNApol* mã hóa DNA polymerase của HearNPV có kích thước 79 bp bằng cặp mồi đặc hiệu [14]. Trình tự DNA tương ứng với gen đích được tiến hành so sánh độ tương đồng với dữ liệu của ngân hàng GenBank Hoa Kỳ bằng công cụ Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.3.3. Định lượng virus trong thuốc BVTV sinh học bằng real-time PCR

Trong nghiên cứu này, phương pháp real-time PCR được xây dựng dựa trên việc khuếch đại đoạn trình tự *HanDNApol* có kích thước 79 bp. Phản ứng sử dụng trình tự mồi bao gồm: mồi xuôi (5' - CATTGCCAACAGTATTTACGGATATT-3'), mồi ngược (5' - TTCTCTACCGATCTTGGTGATGTAAT-3'), được tham khảo từ nghiên cứu của tác giả Pedrini và cộng sự (2011) [14]. Thành phần phản ứng real-time PCR gồm Luminaris HiGreen qPCR Master Mix 2X, mỗi mồi với nồng độ cuối 10 μ M, DNA khuôn (100 - 200 ng) và nước không chứa nuclease, với tổng thể tích phản ứng là 25 μ L. Phản ứng real-time PCR được thực hiện với chương trình nhiệt gồm: 50°C trong 2 phút, 95°C trong 5 phút; 45 chu kỳ gồm 95°C trong 30 giây và 62°C trong 1 phút. Sau khi khuếch đại, tiến hành quan sát đường cong nóng chảy từ 60°C đến 95°C để kiểm tra tính đặc hiệu của sản phẩm.

2.3.4. Thẩm định phương pháp

Các thông số thẩm định phương pháp được xây dựng theo tiêu chuẩn ISO 22118:2011 và Hướng dẫn về tiêu chí hiệu năng và thẩm định phương pháp phân tích DNA đặc hiệu và protein đặc hiệu trong thực phẩm. Các chỉ tiêu đánh giá bao gồm: giới hạn phát hiện (LOD), độ chính xác (AC $\geq$ 90%), độ đặc hiệu (SP $\geq$ 90%), độ nhạy (SE $\geq$ 90%), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại ($\leq$ 25%) và độ tái lập ($\leq$ 35%).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định và định lượng HearNPV bằng buồng đếm hồng cầu

Mẫu QC HearNPV được định lượng sơ bộ bằng phương pháp đếm trực tiếp sử dụng buồng đếm hồng cầu nhằm ước tính mật độ OB virus trong chế phẩm. Mẫu sau khi tinh sạch và pha loãng đến 10^{-5} được tiến hành đếm tại 5 ô vuông lớn và thí nghiệm được lặp lại 3 lần (L1 - L3) để đảm bảo độ tin cậy của kết quả. **Bảng 1** thể hiện kết quả định lượng của các lần thử nghiệm.

Bảng 1. Kết quả định lượng và quy đổi mật độ OB HearNPV bằng buồng đếm hồng cầu

Số lần thử nghiệm	Số thể vùi virus đếm được tại 5 vị trí ô vuông lớn	Số đếm OB trung bình	Nồng độ OB (OB/mL)
L1	43; 62; 70; 25; 54	50,8	$5,1 \times 10^{10}$
L2	30; 64; 52; 42; 61	49,8	$5,0 \times 10^{10}$
L3	68; 55; 25; 39; 64	50,2	$5,0 \times 10^{10}$

Kết quả tại **Bảng 1** cho thấy số lượng OB virus giữa các ô trong cùng một lần lặp có sự dao động tương đối rõ rệt. Mức biến thiên này phản ánh sự phân bố không hoàn toàn đồng đều của virus trong huyền phù. Tuy nhiên, giá trị trung bình giữa các lần lặp lại tương đối ổn định, dao động trong khoảng 49,8 - 50,8 OB/ô vuông, cho thấy sự phù hợp để sử dụng làm dữ liệu định lượng tham chiếu trong nghiên cứu. Khi quy đổi theo công thức chuẩn của buồng đếm Neubauer, mật độ thể vùi HearNPV thu được nằm trong khoảng $5,0 \times 10^{10}$ đến $5,1 \times 10^{10}$ OB/mL, phù hợp với nồng độ do nhà sản xuất công bố đối với mẫu QC là $5,0 \times 10^{10}$ OB/mL

Để xác nhận sự hiện diện của HearNPV, nhóm nghiên cứu tiến hành giải trình tự đoạn gen *HanDNApol* của HearNPV nhằm định danh chính xác tác nhân có trong mẫu thử. *HanDNApol* được lựa chọn làm gen đích do là gen thiết yếu, tồn tại ở dạng đơn bản sao trong hệ gen baculovirus, có mức độ bảo tồn cao giữa các chủng HearNPV nhưng vẫn đảm bảo tính đặc hiệu so với các nucleopolyhedrovirus khác, phù hợp với mục tiêu xây dựng phương pháp [14, 18]. **Hình 2** cho thấy trình tự thu được có mức độ tương đồng cao với trình tự tham chiếu của chủng HearNPV mã KJ701029.1, với độ bao phủ 100% và mức độ tương đồng 99%. Kết quả thu được khẳng định mẫu virus sử dụng trong nghiên cứu là HearNPV và đủ điều kiện làm mẫu đối chứng dương để xây dựng và thẩm định phương pháp real-time PCR.

Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus strain LB1, complete genome

Sequence ID: [KJ701029.1](#) Length: 131966 Number of Matches: 1

Range 1: 61796 to 61864 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼Next Match](#) [▲Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
122 bits(66)	5e-24	68/69(99%)	0/69(0%)	Plus/Plus
Query 11	AGTATTTACGGATATTTTGGAA	tttttCAAACCGCTCGCCAATTACATCACCAAGATC	70	
Sbjct 61796	AGTATTTACGGATATTTTGGAA	tttttCAAACCGCTCGCCAATTACATCACCAAGATC	61855	
Query 71	GGTAGAGAA	79		
Sbjct 61856	GGTAGAGAA	61864		

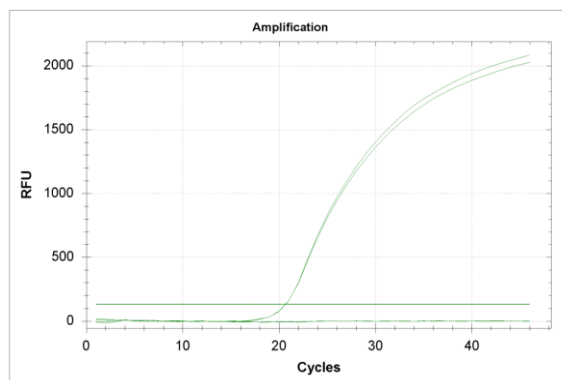
Hình 2. Kết quả so sánh dữ liệu giải trình tự gen với dữ liệu trên GenBank

3.2. Thẩm định phương pháp

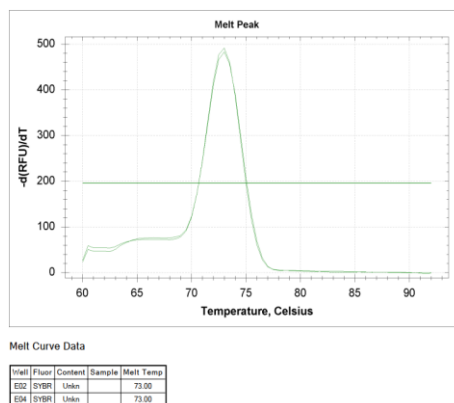
Quá trình thẩm định phương pháp sử dụng thông số quy định theo tiêu chuẩn ISO 22118:2011 và Hướng dẫn về tiêu chí hiệu năng và thẩm định phương pháp phân tích DNA và protein đặc hiệu trong thực phẩm. Các thông số cần tiến hành xác định bao gồm: giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ chính xác ($AC \geq 90\%$), độ nhạy ($SE \geq 90\%$), độ đặc hiệu ($SP \geq 90\%$), độ lặp lại (≤ 25), độ tái lặp (≤ 35) [18].

3.2.1 Kiểm tra khả năng khuếch đại gen *HanDNApol*

Kết quả ở **Hình 3** cho thấy tín hiệu huỳnh quang khuếch đại gen *HanDNApol* trên mẫu đối chứng dương tại nồng độ 10^9 OB/mL xuất hiện dưới dạng đường cong khuếch đại điển hình, với giá trị Ct khoảng 17. Nhiệt độ nóng chảy (TM) của cặp mồi đạt $73,0^\circ\text{C}$ (**Hình 4**). Điều này chứng tỏ cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu hoạt động tốt, đặc hiệu với đoạn gen đích *HanDNApol*.



Hình 3. Tín hiệu khuếch đại đoạn gen *HanDNApol* [14].

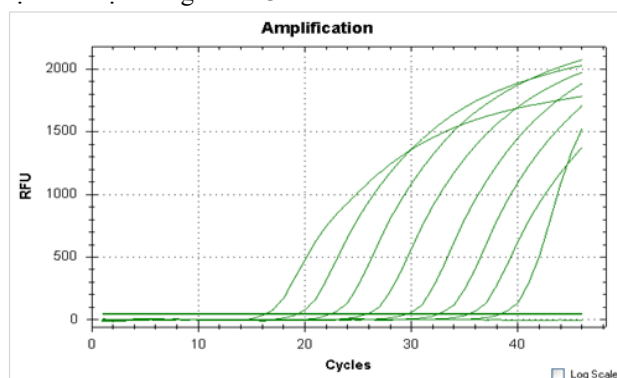


Hình 4. Nhiệt độ nóng chảy (T_m) của cặp môi đặc hiệu đoạn gen *HanDNApol*

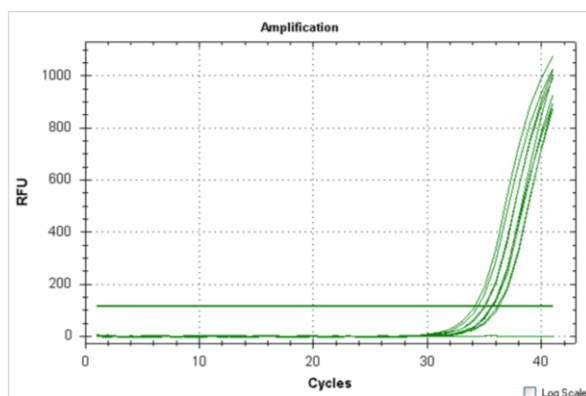
3.2.2. Thẩm định phương pháp

a) Giới hạn phát hiện của phương pháp

Giới hạn phát hiện của phương pháp (LOD) được tính theo nồng độ OB thấp nhất trong mẫu thử, tại đó tối thiểu 90% mẫu cho kết quả dương tính. Để xác định LOD, DNA tách chiết từ huyền phù virus có mật độ OB khác nhau: 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 và 10^1 OB/mL được dùng làm khuôn trong phản ứng real-time PCR. Kết quả thu được được thể hiện trong **Hình 5**.



Hình 5. Khảo sát giới hạn phát hiện của phương pháp real-time PCR với các mẫu thử có nồng độ khác nhau (10^1 - 10^9 OB/mL)



Hình 6. Tín hiệu khuếch đại của 10 lần lặp lại phản ứng real-time PCR tại nồng độ mẫu thử 10^2 OB/mL

Khảo sát giới hạn phát hiện cho thấy với DNA tách chiết từ nồng độ virus 10^2 OB/mL, ngưỡng chu kỳ Ct đạt xấp xỉ 35. Kết quả này cho thấy nồng độ virus 10^2 OB/mL được dự đoán là ngưỡng thấp nhất mà phương pháp này có thể phát hiện chắc chắn sự hiện diện của gen *HearNPVpol*. Để xác nhận LOD, phản ứng được lặp lại 10 lần với DNA tách chiết từ mẫu có nồng độ 10^2 OB/mL. Kết quả thu được được trình bày trong **Hình 6** và **Bảng 2**.

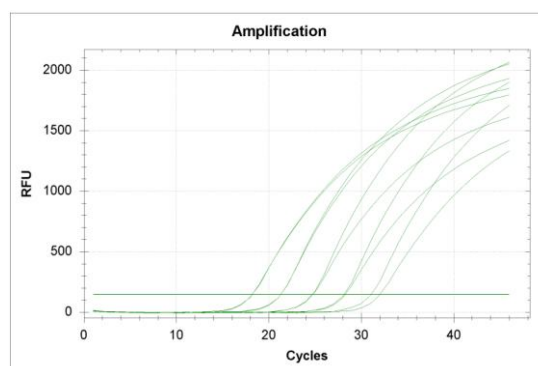
Bảng 2. Giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) trong 10 lần lặp lại phản ứng real-time PCR với mẫu thử có nồng độ 10^2 OB/mL.

Mẫu	Giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct)
HearNPV (+) 10^2 OB/mL – 1	35,72
HearNPV (+) 10^2 OB/mL – 2	35,74
HearNPV (+) 10^2 OB/mL – 3	35,65
HearNPV (+) 10^2 OB/mL – 4	35,09
HearNPV (+) 10^2 OB/mL – 5	35,05
HearNPV (+) 10^2 OB/mL – 6	34,48
HearNPV (+) 10^2 OB/mL – 7	35,20
HearNPV (+) 10^2 OB/mL – 8	35,32
HearNPV (+) 10^2 OB/mL – 9	35,48
HearNPV (+) 10^2 OB/mL – 10	35,65

Kết quả thử nghiệm ở nồng độ 10^2 OB/mL của mẫu thử cho thấy tỉ lệ phát hiện là 100%. Do đó, LOD của phương pháp được xác định là 10^2 OB/mL.

b) Độ chính xác, độ đặc hiệu và độ nhạy của phương pháp

Để xác định các thông số độ chính xác (AC), độ đặc hiệu (SP) và độ nhạy (SE) của phương pháp, hai nhóm mẫu được đưa vào thử nghiệm bao gồm: nhóm 1 - mẫu chứa HearNPV, nhóm 2 - mẫu không chứa HearNPV. Kết quả thu được từ phản ứng real-time PCR của hai nhóm mẫu này được thể hiện trong **Hình 7** và **Bảng 3**.



Hình 7. Tín hiệu khuếch đại điển hình của 2 nhóm mẫu
(nhóm 1: mẫu có chứa HearNPV, nhóm 2: mẫu không chứa HearNPV)

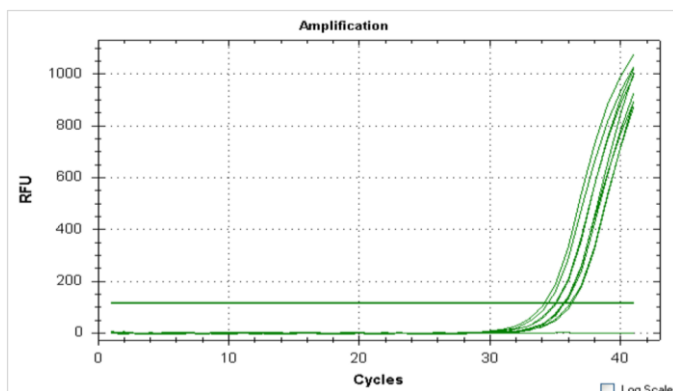
Bảng 3. Giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) của hai nhóm mẫu

STT	Tên mẫu	Ngưỡng chu kỳ Ct	Tên mẫu	Ngưỡng chu kỳ Ct
	Nhóm 1: Mẫu có chứa HearNPV		Nhóm 2: Mẫu không chứa HearNPV	
1	HearNPV – 1	17,23	Mẫu đối chứng – 1	NA
2	HearNPV – 2	17,12	Mẫu đối chứng – 2	NA
3	HearNPV – 3	20,34	Mẫu đối chứng – 3	NA
4	HearNPV – 4	20,29	Mẫu đối chứng – 4	NA
5	HearNPV – 5	23,26	Mẫu đối chứng – 5	NA
6	HearNPV – 6	23,49	Mẫu đối chứng – 6	NA
7	HearNPV – 7	27,24	Mẫu đối chứng – 7	NA
8	HearNPV – 8	27,23	Mẫu đối chứng – 8	NA
9	HearNPV – 9	31,54	Mẫu đối chứng – 9	NA
10	HearNPV – 10	31,73	Mẫu đối chứng – 10	NA

Kết quả thu được trong **Hình 7** và **Bảng 3** cho thấy nhóm số 1 gồm các mẫu chứa HearNPV ở nồng độ 10^5 - 10^9 OB/mL đều xuất hiện tín hiệu khuếch đại với chu kỳ ngưỡng Ct khoảng 17 - 31 và Tm của cặp mồi đạt 73°C. Nhóm số 2 gồm 10 mẫu đối chứng không chứa HearNPV không phát hiện bất kỳ tín hiệu khuếch đại gen nào. Từ đó cho thấy phương pháp real-time PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho HearNPV có độ chính xác, độ đặc hiệu và độ nhạy đạt 100%.

c) Giới hạn định lượng

Từ mẫu có nồng độ virus thấp nhất mà phương pháp này có thể phát hiện, nhóm đề tài tiến hành thử nghiệm tính toán độ lặp lại và độ tái lập, nhằm xác định giới hạn định lượng của phương pháp (**Hình 8**).

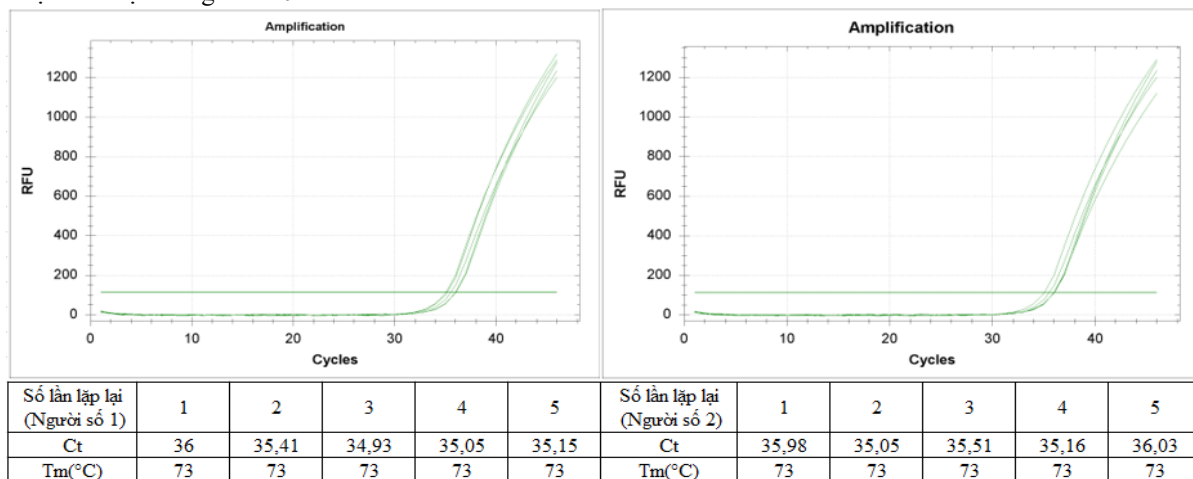


Hình 8. Tín hiệu khuếch đại lặp lại 10 lần tại nồng độ HearNPV tại 10^2 OB/mL

Kết quả từ **Hình 8** cho thấy kết quả thử nghiệm lặp lại 10 phản ứng real-time PCR được thực hiện trên mẫu virus có nồng độ 10^2 OB/mL cho tỷ lệ phát hiện là 100% và các giá trị ngưỡng tín hiệu. Từ đó, có thể kết luận giới hạn định lượng của phương pháp là 10^2 OB/mL.

d) Độ lặp lại, độ tái lập của phương pháp

Để tiến hành xác định độ lặp lại (RSDr) và độ tái lập (RSDR) của phương pháp, các thí nghiệm được tiến hành lặp lại 5 lần/mẫu và được thực hiện trong điều kiện tái lập trên 2 kiểm nghiệm viên. Kết quả thu được được thể hiện trong **Hình 9**.



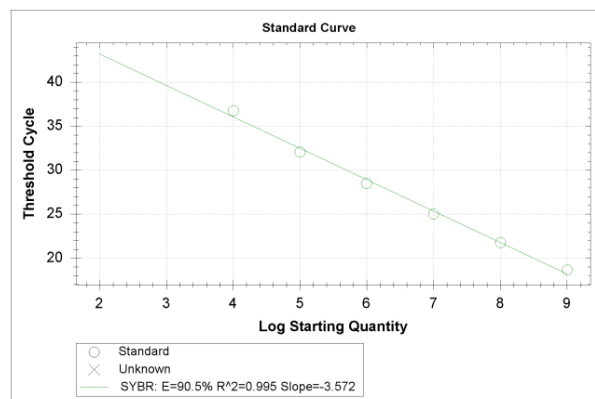
Hình 9. Tín hiệu khuếch đại và giá trị chu kỳ ngưỡng của 5 lần lặp lại với mẫu thử có nồng độ 10^2 OB/mL của hai kiểm nghiệm viên

Dựa trên **Hình 9**, với DNA tách chiết từ mẫu có nồng độ 10^2 OB/mL, phản ứng real-time PCR cho thấy kết quả giữa các lần lặp có sự tương đồng cao ở cả hai kiểm nghiệm viên, phản ánh tính ổn định và độ tin cậy của hệ thống phản ứng trong điều kiện khảo sát. Giá trị Ct của kiểm nghiệm viên 1 dao động trong khoảng 34,93 - 36,00 (Ct trung bình 35,31; SD = 0,41), trong khi kiểm nghiệm viên 2 ghi nhận giá trị Ct trong khoảng 35,05 - 36,03 (Ct trung bình 35,55; SD = 0,41). Sự chênh lệch Ct trung bình giữa hai kiểm nghiệm viên là rất nhỏ, cho thấy ảnh hưởng của yếu tố người thao tác đến kết quả phân tích là không đáng kể.

Kết quả đánh giá độ lặp lại theo tiêu chí độ lệch chuẩn tương đối (RSD) dựa trên hướng dẫn của ISO 22118:2011 cho thấy giá trị RSD của kiểm nghiệm viên 1 và 2 lần lượt là 0,0033 và 0,0035, đều thấp hơn ngưỡng chấp nhận 0,25. Điều này chứng tỏ mức độ phân tán của kết quả thấp và độ lặp lại của phép thử đạt yêu cầu. Đồng thời, độ tái lập giữa hai kiểm nghiệm viên đạt giá trị 0,0047, thỏa mãn tiêu chí nhỏ hơn 0,35, khẳng định độ chụm giữa những người thực hiện là tốt và biến thiên giữa các lần thao tác là không đáng kể. Bên cạnh đó, phân tích đường cong nóng chảy cho thấy giá trị T_m đồng nhất ở mức 73,0°C trong tất cả các lần lặp, chứng minh sản phẩm khuếch đại có độ đặc hiệu và độ ổn định cao.

3.3. Xây dựng đường chuẩn

Phương pháp định lượng được xác định dựa trên mối liên hệ tuyến tính giữa mật độ virus trong mẫu và giá trị C_t tương ứng. Trên cơ sở phần mềm của thiết bị, đường chuẩn được xây dựng như trong **Hình 10**.



Hình 10. Đường chuẩn xây dựng từ DNA tách chiết từ mẫu thử có nồng độ 10^2 đến 10^7 OB/mL

Kết quả cho thấy đường chuẩn có tương quan tuyến tính cao với giá trị R^2 đạt 0,995, độ dốc = -3,572 và hiệu quả khuếch đại $E = 90,5\%$. Như vậy, đường chuẩn của phản ứng real-time PCR trong nghiên cứu này cho kết quả đáng tin cậy. Đường biểu diễn chuẩn được biểu thị bằng một hàm số biểu thị mối tương quan tuyến tính giữa chu kỳ ngưỡng ($Y = C_t$) với log10 của số lượng OB ban đầu ($X = \log_{10} S_q$). Hàm số đó là: $Y = -3,572X + 50,35$. Từ hàm số này, trị số OB ban đầu S_q (Starting quantity) được xác định sử dụng công thức: $S_q = 10[(C_t - 50,35)/-3,572]$.

4. KẾT LUẬN

Kết quả định lượng sơ bộ bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer với hệ số pha loãng 10^5 cho nồng độ OB trung bình của HearNPV xấp xỉ $5,0 \times 10^{10}$ OB/mL, phù hợp với nồng độ công bố của nhà sản xuất và được sử dụng làm giá trị tham chiếu cho quá trình xây dựng phương pháp real-time PCR.

Tên cơ sở đó, phương pháp real-time PCR nhắm đích gen mã hóa DNA polymerase của virus HearNPV đã được xây dựng với giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng đồng thời đạt 10^2 OB/mL; các chỉ tiêu độ chính xác, độ đặc hiệu và độ nhạy đều đạt 100%. Đường chuẩn thể hiện mối tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa giá trị C_t và log nồng độ virus ban đầu ($R^2 = 0,995$), với hiệu suất khuếch đại 90,5%, đáp ứng các tiêu chí chấp nhận theo ISO 22118:2011.

Tổng hợp các kết quả cho thấy phương pháp real-time PCR được đề xuất có độ tin cậy và tính ổn định phù hợp, có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát chất lượng và định lượng HearNPV trong các chế phẩm thuốc bảo vệ thực vật sinh học, góp phần nâng cao hiệu quả quản lý và sử dụng các chế phẩm virus trong sản xuất nông nghiệp bền vững.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. M. Tudi, H. D. Ruan, L. Wang, *et al.*, "Agriculture Development, pesticide application and its impact on the environment," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 18, no. 3, p. 1112, 2021.
- [2]. V. M. Pathak, V. Verma, B. S. Rawat, *et al.*, "Current status of pesticide effects on environment, human health and its eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review," *Frontiers in Microbiology*, vol. 13, p. 962619, 2022.

- [3]. M. S. Ayilara, O. S. Adeleke, S. A. Akinola, *et al.*, “Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 14, p. 1040901, 2023.
- [4]. G. M. Daraban, R. M. Hlihor, L. C. Rosca, *et al.*, “Pesticides vs. Biopesticides: from pest management to toxicity and impacts on the environment and human health,” *Toxics*, vol. 11, no. 12, p. 983, 2023.
- [5]. M. Martínez-Balardi, J. Caballero, E. Aguirre, *et al.*, “Baculoviruses as microbial pesticides: potential, challenges, and market overview,” *Viruses*, vol. 17, no. 7, p. 917, 2025.
- [6]. Y. Gelaye and B. Negash, “The role of baculoviruses in controlling insect pests: A review,” *Cogent Food & Agriculture*, vol. 9, no. 1, p. 2254139, 2023.
- [7]. R. Jayaraj, P. Megha, and P. Sreedev, “Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment,” *Interdisciplinary Toxicology*, vol. 9, no. 3-4, pp. 90-100, 2016.
- [8]. C. A. Damalas and S. D. Koutroubas, “Farmers’ exposure to pesticides: Toxicity types and ways of prevention,” *Toxics*, vol. 4, no. 1, p. 1, 2016.
- [9]. J. H. Chang, M. L. Choi, J. S. Park, *et al.*, “An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin,” *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 84, no. 1, pp. 30-37, 2003.
- [10]. R. Chaudhary, S. Kumar, V. Sharma, *et al.*, “Microbial bio-control agents in sustainable pest management: Current status and future prospects,” *Journal of Agriculture and Food Research*, vol. 18, p. 101421, 2024.
- [11]. R. I. Graham, K. S. Grzywacz, J. Wilson, *et al.*, “Development of a real-time qpcr assay for quantification of covert Baculovirus infections in a major African crop pest,” *Insects*, vol. 6, no. 3, pp. 746-759, 2015.
- [12]. L. A. da Silva, B. R. de Camargo, A. A. F. M. S. Fisch, *et al.*, “Identification and detection of known and new viruses in larvae of laboratory-reared fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*,” *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 210, p. 108290, 2025.
- [13]. I. Nazli-Huda, A. Sajap, and W. Lau, “Stability of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus in sodium dodecyl sulphate,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 16, pp. 3877-3881, 2012.
- [14]. M. R. Pedrini, S. Reid, L. K. Nielsen, and L. C. Chan, “Kinetic characterization of the group II *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus propagated in suspension cell cultures: Implications for development of a biopesticides production process,” *Biotechnology Progress*, vol. 27, no. 3, pp. 614-624, 2011.
- [15]. H. R. Lee, J. Jung, M. Riu, and C. M. Ryu, “A new frontier for biological control against plant pathogenic nematodes and insect pests I: by microbes,” *Research in Plant Disease*, vol. 23, no. 2, pp. 114-149, 2017.
- [16]. Y. Gelaye and B. Negash, “The role of baculoviruses in controlling insect pests: A review,” *Cogent Food & Agriculture*, vol. 9, no. 1, p. 2254139, 2023.
- [17]. Tuoi Tre Online, “Vietnam to increase the use of biological plant protection products by 30%,” Dec. 28, 2023. [Online]. Available: <https://tuoitre.vn/viet-nam-se-su-dung-thuoc-bao-ve-thuc-vat-sinh-hoc-tang-them-30-20231228155953896.htm> [Accessed Oct. 24, 2025].
- [18]. E. A. Herniou, J. A. Olszewski, J. S. Cory, and D. R. O’Reilly, “The genome sequence and evolution of baculoviruses,” *Annual Review of Entomology*, vol. 48, pp. 211-234, 2003.