

QUI TRÌNH NESTED-PCR PHÁT HIỆN VIRÚT GÂY BỆNH ĐÓM TRẮNG (WSSV) VÀ NỘI CHUẨN GIÁP XÁC MÙÒI CHÂN TRÊN NHIỀU ĐỐI TƯỢNG CẢM NHIỄM

Trần Thị Tuyết Hoa¹

ABSTRACT

White spot syndrome virus (WSSV), member of a new virus family called Nimaviridae, is an important viral pathogen responsible for severe economic loss to shrimp farmers. Techniques for the detection of WSSV by polymerase chain reaction are well established and useful. In this study, the nested-PCR protocol presents a sensitive and specific protocol for the detection of WSSV and decapod genes serving as internal control for the test. This combination is one of the specific objectives of the research. Primers named P1, P2, P3 and P4 (Kimura et al., 1996) and primer pairs named Deca-20a2 and Deca-20s9 (CSIRO, 2008) were employed for the nested-PCR. This protocol can be used to detect low levels of WSSV in different hosts: (i) Carriers and low viral load samples such as wild crabs, post-larvae may also be tested for WSSV by this method; (ii) this protocol may also be useful in confirming early stages of WSSV infection when the viral load is relatively low, such as in a very light infection before the onset of disease. In term of high specificity, the two-step PCR protocols were determined to have sensitivities less than 10pg of DNA template.

Keywords: *white spot syndrome virus, internal control, nested-PCR*

Title: *A polymerase chain reaction protocol for the detection of white spot syndrome virus (WSSV) and decapod genes serving as internal control in various infected hosts*

TÓM TẮT

Virút gây bệnh đốm trắng (WSSV), thuộc họ virus mới có tên gọi Nimaviridae, là một trong những nhóm tác nhân virus gây tổn thất nghiêm trọng cho người nuôi tôm. Để phát hiện WSSV, kỹ thuật PCR đã được thiết lập và cho thấy khả năng ứng dụng rất tốt. Trong nghiên cứu này, qui trình nested-PCR được thiết lập có tính nhạy và tính đặc hiệu cao, cho phép phát hiện WSSV và đoạn gen của giáp xác mùòi chân được sử dụng như là nội chuẩn của phản ứng. Sự kết hợp này là một trong những mục tiêu hàng đầu của nghiên cứu. Mỗi P1, P2, P3 và P4 (Kimura et al., 1996) và mỗi Deca-20a2 và Deca-20s9 (CSIRO, 2008) được sử dụng cho phản ứng PCR hai bước. Qui trình có thể ứng dụng để phát hiện WSSV cường độ rất thấp trên nhiều loại mẫu khác nhau: (i) Vật chủ trung gian, các mẫu cường độ nhiễm thấp như cua tự nhiên, hậu ấu trùng tôm cũng được phát hiện bằng phương pháp này; (ii) phương pháp cũng cho thấy khả năng ứng dụng trong trường hợp phát hiện WSSV ở giai đoạn sớm hay giai đoạn nhiễm cường độ rất nhẹ trước khi xảy ra dịch bệnh. Xét về độ nhạy của qui trình, thử nghiệm cho kết quả có thể phát hiện WSSV trong các mẫu thử có hàm lượng ADN thấp hơn 10pg.

Từ khóa: *Virút gây bệnh đốm trắng, nội chuẩn, PCR hai bước*

¹ Bộ môn Sinh học và Bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

1 GIỚI THIỆU

White spot syndrome virus (WSSV) là virus gây thiệt hại nặng nề cho nhiều vùng nuôi tôm thuộc khu vực Châu Á và trên toàn thế giới (Takahashi *et al.*, 1994, Wang *et al.*, 1995, Wongteerasupaya *et al.*, 1995). Một trong những nguyên nhân dẫn đến việc lây lan nhanh của WSSV là do phổ loài cảm nhiễm rộng. WSSV đã được phát hiện cảm nhiễm nhiều loài vật chủ khác nhau *Penaeus monodon*, *P. japonicus*, *P. indicus*, *P. chinensis*, *P. merguensis*, *P. aztecus*, *P. stylirostris*, *P. vannamei*, *P. duorarum* và *P. setiferus* (Lightner, 1996); tôm càng xanh - *Macrobrachium rosenbergii* (Peng *et al.*, 1998), cua - *Calappa lophos*, *Portunus sanguinolentus*, *Charybdis granulata* và *C. feriata* (Lo *et al.*, 1996) ...

Ở Việt Nam, WSSV cũng có khả năng bộc phát mạnh, lây lan nhanh ở các vùng nuôi tôm trọng điểm và chưa có phương pháp điều trị hữu hiệu. Do đó, việc phát hiện sớm bệnh để kịp thời xử lý nhằm giảm thiệt hại cho người nuôi tôm và nâng cao chất lượng, sản lượng tôm nuôi là một điều rất cần thiết và cấp bách. Vấn đề đặt ra là phải phát hiện sớm tác nhân gây bệnh. Hiện nay các kỹ thuật trong phòng thí nghiệm như kỹ thuật mô học, phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR) là một trong những biện pháp hữu hiệu, đáng tin cậy giúp phát hiện mầm bệnh trong giai đoạn sớm nhất. Do vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm mục tiêu phát triển qui trình PCR có thể ứng dụng trong điều kiện phòng thí nghiệm đơn giản và đặc biệt phương pháp cần đáp ứng được yêu cầu về độ chính xác cao, thời gian thực hiện nhanh, giúp giải quyết kịp thời các đòi hỏi của vụ nuôi. Qua đó người nuôi tôm có biện pháp xử lý kịp thời để hạn chế thiệt hại, nâng cao chất lượng và sản lượng tôm nuôi.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu ADN có nhiễm WSSV chiết tách từ tôm sú (*Penaeus monodon*) (6 mẫu), cua (3 mẫu), mực (1 mẫu), ốc mượn hồn (2 mẫu), giun nhiều tơ (1 mẫu). Các mẫu tôm sú thịt và cua được thu từ các ao nuôi tôm thuộc huyện Cái Nước, Tỉnh Cà Mau. Các mẫu tôm sú giống và các mẫu thức ăn tươi sống (mực, ốc mượn hồn, giun nhiều tơ – không xác định loài) được thu ở các trại sản xuất tôm giống thuộc huyện Năm Căn, Tỉnh Cà Mau. Những mẫu này đã được kiểm tra cường độ nhiễm WSSV với kit IQ2000-WSSV (Farming Intelligene Technology Cooperation, Đài Loan)

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Qui trình nested-PCR sử dụng các đoạn mồi P1, P2, P3, P4 (Kimura *et al.*, 1996) để phát hiện WSSV và cặp mồi deca-20a2, deca-20s9 phát hiện gen của nhóm giáp xác mười chân (CSIRO, 2008) (Bảng 1).

Qui trình được thiết kế bao gồm hai bước với thành phần phản ứng của các bước như sau: (i) thành phần phản ứng bước 1 (20µl): 1X PCR buffer; 1,5mM MgCl₂; 200µM dNTPs mix, 10pmol mồi deca-20s9, 10pmol mồi deca-20a2, 20pmol mồi P1; 20pmol mồi P2; 1,5U Taq ADN Polymerase và mẫu ADN chiết tách (1µl); (ii) thành phần phản ứng bước 2 (20µl): 1X PCR buffer; 1,0mM MgCl₂; 200µM

dNTPs mix, 10pmol mỗi deca-20s9, 10pmol mỗi deca-20a2, 20pmol mỗi P3; 20pmol mỗi P4; 1,5U Taq ADN Polymerase và sản phẩm PCR bước 1 (1µl). Điều kiện phản ứng PCR của hai bước được thực hiện ở cùng điều kiện như sau: nhiệt độ 94°C trong 5 phút, tiếp theo 94°C trong 30 giây, 56°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút, chu kỳ này được lặp lại 30 lần, cuối cùng là 72°C trong 5 phút.

Bảng 1: Trình tự mỗi sử dụng trong phản ứng PCR bước 1 và bước 2

Tên mỗi	Trình tự mỗi sử dụng
P1	5'-ATC-ATG-GCT-GCT-TCA-CAG-AC-3'
P2	5'-CGC-TGG-AGA-GGA-CAA-GAC-AT-3'
P3	5'-TCT-TCA-TCA-GAT-GCT-ACT-GC-3'
P4	5'-TAA-CGC-TAT-CCA-GTA-TCA-CG-3'
Deca-20a2	5'-ACT-TCC-CCC-GGA-ACC-CAA-AGA-CT- 3'
Deca-20s9	5'-GGG-GGC-ATT-CGT-ATT-GCG-A- 3'

Sản phẩm PCR được điện di bằng gel agarose 1,5% có chứa 0,5 µg/ml ethidium bromide, trong dung dịch 0,5X TAE (Tris-acetate-EDTA) ở 90V và ghi nhận với thiết bị chụp, xử lí ảnh gel (Vilber Lourmat).

Căn cứ vào thang ADN 100 bp plus (Fermentas) hay thang ADN 1kb plus (Invitrogen) để xác định trọng lượng phân tử của mẫu phân tích. Kết quả được ghi nhận: (i) vạch ở vị trí 240bp là ADN chiết tách tốt và (ii) vạch ở vị trí 982 bp là mẫu nhiễm WSSV (sản phẩm PCR bước 1) hay vạch ở vị trí 570 bp là mẫu nhiễm WSSV (sản phẩm PCR bước 2).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

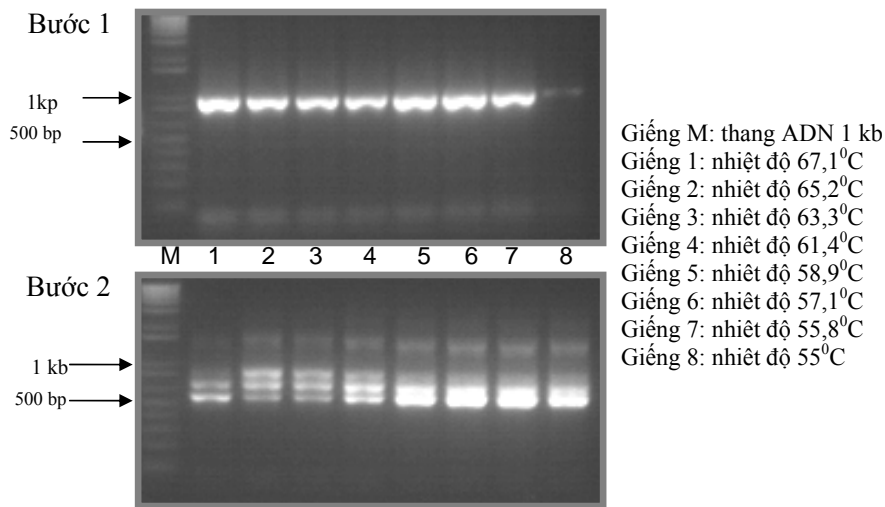
3.1 Xác định khả năng ứng dụng của các đoạn mỗi phát hiện WSSV

Sau khi thực hiện qui trình nested-PCR sử dụng các đoạn mỗi P1, P2, P3, P4 (Kimura *et al.*, 1996) với 3 mẫu ly trích ADN có chất lượng tốt. Ba mẫu này đã được kiểm tra và cho kết quả dương tính với WSSV, tương ứng với 3 mức độ nhiễm nhẹ (+), trung bình (++), nặng (+++) và tỉ lệ OD260/OD280 của các mẫu chiết tách đều có giá trị trong khoảng 1,8 - 2,0. Cả 3 mẫu thử nghiệm đều cho kết quả tốt khi sử dụng quá trình này (số liệu không trình bày). Tuy nhiên, qui trình được khảo sát thêm một số chỉ tiêu cơ bản về nhiệt độ gắn mỗi, tính nhạy... để tìm hiểu về khả năng kết hợp với mỗi deca-20a2; deca-20s9 (khuếch đại gen nội chuẩn).

3.1.1 Kiểm tra mỗi và nhiệt độ gắn mỗi

Để có thể xác định được nhiệt độ gắn mỗi thích hợp cho phản ứng PCR, phản ứng được thực hiện ở các nhiệt độ gắn mỗi khác nhau dao động ở các khoảng 67,1°C; 65,2°C; 63,3°C; 61,4°C; 58,9°C; 57,1°C; 55,8°C; 55°C. Chỉ tiêu này được khảo sát với một mẫu đã được xác định nhiễm WSSV cường độ trung bình (++). Kết quả cho thấy, sản phẩm PCR bước 1 cho kết quả tốt ở tất cả các khoảng nhiệt độ thử

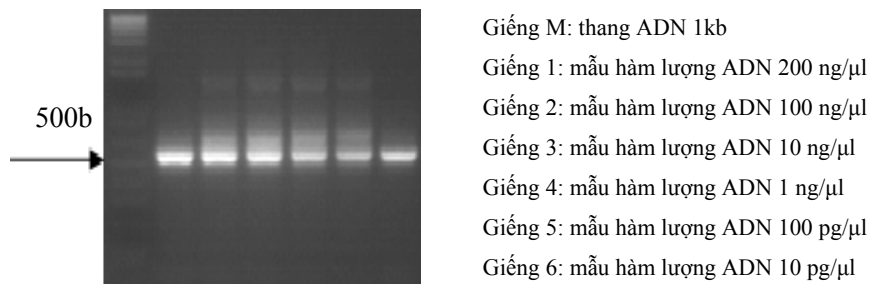
thử nghiệm, ngược lại sản phẩm PCR bước 2 chỉ cho kết quả tốt ở khoảng 57,1°C; 55,8°C (Hình 1). Dựa vào kết quả ghi nhận, nhiệt độ gắn mỗi được chọn là 56°C.



Hình 1: Kết quả PCR ở nhiều nhiệt độ gắn mỗi thực hiện trên 1 mẫu

3.1.2 Kiểm tra độ nhạy của qui trình

Để có thể xác định độ nhạy của phản ứng, qui trình được thử nghiệm với một mẫu được pha loãng ở các hàm lượng ADN khác nhau. Một mẫu chiết tách (đã xác định nồng độ ADN và nhiễm WSSV cường độ trung bình) được pha loãng để có các mẫu lần lượt tương ứng với các hàm lượng ADN là 100 ng/μl, 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl.



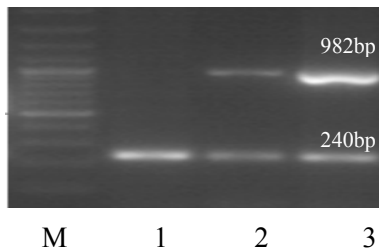
Hình 2: Độ nhạy của qui trình nested PCR

Kết quả từ hình 2 cho thấy, ở tất cả các mẫu pha loãng đều cho vạch khuếch đại rất rõ. Độ sáng của các vạch ADN giảm dần theo độ pha loãng của hàm lượng ADN khuôn. Qua kết quả còn cho thấy, với nồng độ ADN khuôn và nồng độ ADN pha loãng ở các mức độ khác nhau của mẫu nhiễm vừa (++) đều cho kết quả tốt. Vạch ở giếng thứ 6, mẫu có nồng độ pha loãng tương ứng với hàm lượng ADN 10 pg/μl nhưng vẫn cho kết quả PCR rất tốt, điều này chứng tỏ khả năng phát hiện mẫu của qui trình cao, có thể phát hiện được cả những mẫu có hàm lượng ADN thấp (10 pg/μl) thậm chí thấp hơn nữa.

3.2 Xác định khả năng ứng dụng của các đoạn mồi phát hiện gen nội chuẩn

Nghiên cứu kỹ thuật PCR trong việc chẩn đoán tác nhân gây bệnh ngày càng được nhiều người quan tâm. Tuy nhiên, phương pháp PCR cũng có nhiều mặt hạn chế như hiện tượng âm tính giả (do sai sót trong quá trình pha hóa chất, mẫu bị phân hủy trong quá trình lưu trữ, ...) và hiện tượng dương tính giả (do mẫu nhiễm trong quá trình thao tác). Để khắc phục tình trạng này, trên cơ sở qui trình PCR phát hiện WSSV (sử dụng cặp mồi do Kimura *et al.*, 1996 thiết kế), qui trình tiếp tục được phát triển với mồi đặc hiệu của giáp xác mười chân (CSIRO, 2008) để phát hiện đồng thời WSSV và ADN của giáp xác mười chân (gen nội chuẩn) nhằm kiểm soát những trường hợp âm tính giả. Điều này có ý nghĩa rất quan trọng trong việc nghiên cứu tác nhân gây bệnh đốm trắng, nâng cao mức độ tin cậy của phản ứng PCR, cũng như mức độ tin cậy của qui trình nested-PCR phát hiện WSSV này.

Qui trình PCR phát hiện WSSV và gen nội chuẩn (ADN của giáp xác mười chân - decapods) được thực hiện với 2 mẫu ADN dương tính nhiễm WSSV (cường độ nhiễm (+++) và (++)) chiết tách từ tôm bệnh thu ở Cà Mau và 1 mẫu ADN âm tính không nhiễm WSSV.



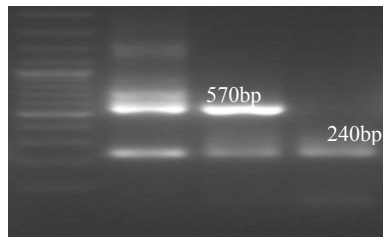
Hình 3a: Kết quả PCR bước 1

Giếng M: thang ADN 100 bp

Giếng 1: mẫu (-)

Giếng 2: mẫu (++)

Giếng 3: mẫu (+++)



Hình 3b: Kết quả PCR bước 2

Giếng M: thang ADN 100 bp

Giếng 1: mẫu (+++)

Giếng 2: mẫu (++)

Giếng 3: mẫu (-)

Hình 3: Kết quả PCR phát hiện WSSV và nội chuẩn thực hiện trên 3 mẫu

Kết quả từ hình 3a cho thấy, 2 mẫu dương tính đều hiện rõ vạch ở vị trí 982 bp (vạch thể hiện sự hiện diện của WSSV) và vạch 240 bp (vạch thể hiện sự hiện diện của gen nội chuẩn). Mẫu ở giếng 3 hiện lên vạch rõ hơn mẫu ở giếng thứ 2 do cường độ nhiễm WSSV ở mẫu giếng 3 (+++) nặng hơn mẫu ở giếng 2 (++) . Kết quả cũng cho thấy, các sản phẩm khuếch đại không cho sản phẩm không đặc hiệu và mẫu âm tính chỉ hiện lên vạch 240 bp. Điều này chứng tỏ, ở bước 1 của qui trình PCR phát hiện WSSV và nội chuẩn đã đồng thời phát hiện được WSSV và ADN của giáp xác mười chân và mức độ tin cậy của qui trình PCR phát hiện WSSV này rất cao (khắc phục được trường hợp âm tính giả).

Kết quả từ hình 3b cho thấy, ở giếng 1 và giếng 2 đều hiện rõ vạch ở vị trí 570 bp (vạch biểu hiện mẫu có sự xuất hiện của WSSV) và vạch ở vị trí 240 bp (vạch thể

hiện sự có mặt của gen nội chuẩn). Ở giếng 2 vạch ở vị trí 570 bp rõ hơn ở giếng 1, nhưng ở giếng 1 sản phẩm khuếch đại lại cho ra sản phẩm không đặc hiệu, điều này có thể do hàm lượng ADN của mẫu ở giếng 1 nhiều hơn mẫu ở giếng 2 nên khi khuếch đại mẫu ở giếng 1 đã khuếch đại ra sản phẩm không đặc hiệu. Theo Nguyễn Văn Thanh (2007), lượng ADN khuôn dư thừa có thể ảnh hưởng xấu đến quá trình khuếch đại, nếu lượng ADN khuôn quá cao thì sẽ có khuynh hướng tạo ra lượng lớn các sản phẩm được kéo dài từ đoạn môi hơn là những sản phẩm nằm giữa các đoạn môi. Do vậy, nếu muốn loại bỏ hiệu ứng của các sản phẩm không đặc hiệu này, chỉ cần cho hàm lượng ADN vừa đủ trong quá trình khuếch đại (10pg – 200ng/phản ứng). Qua kết quả cho thấy, qui trình PCR phát hiện WSSV và nội chuẩn (phát hiện ADN của giáp xác mười chân - decapods) đã cho kết quả tốt ở các mẫu khảo sát.

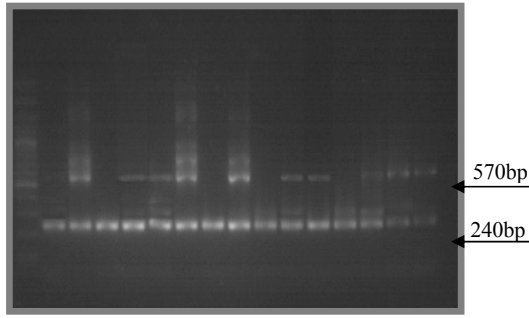
3.3 Xác định khả năng ứng dụng của qui trình

Để kiểm tra khả năng ứng dụng của qui trình vừa được tối ưu, tổng số 13 mẫu ADN chiết tách từ các vật chủ khác nhau (tôm sú giống, tôm sú thịt, cua, giun nhiều tơ, mực) được sử dụng cho quá trình khuếch đại. Các mẫu này đều được xác định nhiễm WSSV với phương pháp nested-PCR (kit WSSV-IQ2000) (Bảng 2).

Với kết quả ghi nhận từ Hình 4, có 9 mẫu dương tính và 4 mẫu âm tính được xác định. Kết quả cho thấy, qui trình nested-PCR vừa được tối ưu có thể phát hiện được WSSV tương ứng với kết quả đã được xác định bằng kit IQ2000- WSSV ở tất cả các mẫu được phân tích.

Bảng 3: Kết quả phân tích các mẫu khác nhau với qui trình nested PCR vừa được tối ưu

TT	Vật chủ	Mẫu phân tích	Cường độ nhiễm (IQ2000-WSSV)	Kết quả phân tích với qui trình được tối ưu (WSSV)	(Nội chuẩn)
1	Tôm sú trưởng thành	N ₂	+	+	+
2	Tôm sú trưởng thành	N ₄	++	+	+
3	Tôm sú trưởng thành	N ₅	+++	+	+
4	Tôm sú trưởng thành	G ₇	-	-	+
5	Tôm sú giống	W ₁	+	+	+
6	Tôm sú giống	W ₂	-	-	+
7	Cua	C ₅	+	+	+
8	Cua	N ₆	+	+	+
9	Cua	A ₆	-	-	+
10	Giun nhiều tơ	P1	+	+	+
11	Mực	M11	+	+	+
12	Ốc mượn hồn	OC ₁	+	+	+
13	Mực	M12	-	-	+



Giếng M: thang ADN 100 bp plus
 Giếng 1: đối chứng âm
 Giếng 2: đối chứng dương
 Giếng 3: mẫu G7
 Giếng 4: mẫu N2
 Giếng 5: mẫu N4
 Giếng 6: mẫu N5
 Giếng 7: mẫu W2
 Giếng 8: mẫu W1
 Giếng 9: mẫu A6
 Giếng 10: mẫu C5
 Giếng 11: mẫu N6
 Giếng 12: mẫu M12
 Giếng 13: mẫu P1
 Giếng 14: mẫu M11
 Giếng 15: mẫu OC1

Hình 4: Kết quả PCR phát hiện WSSV có nội chuẩn ứng dụng trên 13 mẫu

Kết quả từ hình 4 cho thấy, tất cả các mẫu dương tính đều cho kết quả đúng với qui trình này. Đặc biệt, gen nội chuẩn (ADN của giáp xác mười chân - decapods) đều được phát hiện trong các mẫu âm tính.

Qui trình nested-PCR có thể phát hiện WSSV và gen nội chuẩn trên nhiều đối tượng cảm nhiễm khác nhau. Điều đó cho thấy, phản ứng sử dụng các đoạn môi phù hợp để có thể khuếch đại được đoạn gen đặc trưng riêng của WSSV. Tính đặc hiệu của môi còn được thể hiện thông qua việc đoạn môi đã không khuếch đại được sản phẩm khi ADN được chiết tách từ mẫu tôm khỏe hay vật chủ không nhiễm WSSV (mẫu tôm sú trưởng thành -G7, mẫu tôm sú giống-W2, mẫu cua-A6 và mẫu mực-M12 đã được xác định không nhiễm WSSV với kit IQ2000-WSSV).

Vì vậy, qui trình này có thể được ứng dụng vào việc phát hiện WSSV trên nhiều loài vật chủ cảm nhiễm khác nhau. Bên cạnh đó, qui trình cho phép khẳng định trường hợp âm tính giả thông qua gen nội chuẩn (khuếch đại từ ADN của giáp xác mười chân- decapods).

4 KẾT LUẬN

Qui trình nested-PCR được phát triển phù hợp với điều kiện thực tế với các thay đổi về thành phần hóa chất tham gia phản ứng và chu kỳ nhiệt của phản ứng. Kết quả ghi nhận khả năng sử dụng tốt của qui trình PCR trong việc phát hiện WSSV từ nhiều đối tượng cảm nhiễm khác nhau (tôm giống, tôm thịt, cua, giun nhiều tơ, ốc mượn hồn và mực), với độ nhạy khoảng 10pg/phản ứng và thời gian khuếch đại ngắn (2 giờ).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- CSIRO, 2008. Phương pháp PCR phát hiện ADN của các giáp xác mười chân theo OIE, sử dụng các môi của CSIRO. Hội thảo về PCR phát hiện WSSV, Cần Thơ, trang 18.
- Kimura T., Yamano K., Nakano H., Momoyama K., Hiraoka M. & Inouye K. 1996. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. Fish Pathology 31: 93-98.

- Lo *et al*, 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome virus (WSSV) in Penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 25:133–141.
- Lo *et al*, 1996. White spot syndrome baculovirus (WSSV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms* 27: 215 –225.
- Nguyễn Văn Thanh, 2007. Sinh học phân tử. Nhà xuất bản giáo dục. 219 trang.
- Otta, S.K., G. Shubha. Joseph, A. Chakraborty, I. Karunasagar and I. Karunasagar. 1999. Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. *Diseases of Aquatic Organisms*. 38: 67-70.
- Peng S.E., Lo C.F., Ho C.H., Chang C.F., Kou G.H., 1998. Detection of white spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, using polymerase chain reaction. *Aquaculture* 164 _1998. 253–262.
- Takahashi Y, Itami T, Kondo M, Maeda M, Fujii R, Tomonaga S, Supamattaya K, Boonyaratpalin S, 1994. Electron microscopy evidence of bacilliform virus infection in Kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathology* 29: 121-125.
- Wang CH, Lo CF, Leu JH, Chou CM, Yeh PY, Chou HY, Tung MC, Chang CF, Su MS, Kou G.H., 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23:239-242.
- Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriurairatana S, Nash GL, Akarajamorn A, Boonsaeng V, Panyinl S, Tassanakajon A, Withyachumnarnkul B, Flegel TW, 1995. A nonoccluded systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 21:69-77.