

TCVN 8710-XX:2025

Xuất bản lần 1

**BỆNH THỦY SẴN – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN X: BỆNH NHIỄM TRÙNG XUẤT HUYẾT DO VI RÚT
(VHS) GÂY BỆNH TRÊN CÁ**

*Aquatic Animal Disease - Diagnostic procedure -
Part X: Viral haemorrhagic septicaemia disease in fish*

HÀ NỘI – 2025

Lời nói đầu

TCVN xxxx-x:2025 được xây dựng trên cơ sở tham khảo OIE/WOAH, 2021 *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals*. Chapter 2.3.10. *Infection with viral haemorrhagic septicaemia virus*

TCVN xxxx-x:2025 do Trung tâm Chẩn đoán thú y Trung ương, Cục Chăn nuôi và Thú y biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Môi trường đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 8710 *Bệnh thủy sản – Quy trình chẩn đoán* gồm các phần sau đây:

- TCVN 8710-1:2011, *Phần 1: Bệnh còi do vi rút ở tôm;*
- TCVN 8710-2:2019, *Phần 2: Bệnh hoại tử thần kinh ở cá biển;*
- TCVN 8710-3:2019, *Phần 3: Bệnh đốm trắng ở tôm;*
- TCVN 8710-4:2019, *Phần 4: Bệnh đầu vàng ở tôm;*
- TCVN 8710-5:2023, *Phần 5: Hội chứng taura ở tôm;*
- TCVN 8710-6:2019, *Phần 6: Bệnh do Koi herpesvi rút ở cá chép;*
- TCVN 8710-7:2019, *Phần 7: Bệnh xuất huyết mùa xuân ở cá chép;*
- TCVN 8710-8:2023, *Phần 8: Bệnh hoại tử cơ ở tôm (IMNV);*
- TCVN 8710-9:2012, *Phần 9: Bệnh hoại tử gan tụy ở tôm;*
- TCVN 8710-10:2015, *Phần 10: Bệnh do Perkinsus marinus ở nhuyễn thể hai mảnh vỏ;*
- TCVN 8710-11:2015, *Phần 11: Bệnh do Perkinsus olseni ở nhuyễn thể hai mảnh vỏ;*
- TCVN 8710-12:2019, *Phần 12: Bệnh vi bào tử do Enterocytozoon hepatopenaei ở tôm;*
- TCVN 8710-13:2015, *Phần 13: Bệnh gan tụy do Parvovirus ở tôm;*
- TCVN 8710-14:2015, *Phần 14: Hội chứng lở loét (EUS) ở cá;*
- TCVN 8710-15:2015, *Phần 15: Bệnh nhiễm trùng do Aeromonas hydrophila ở cá;*
- TCVN 8710-16:2016, *Phần 16: Bệnh gan thận mũ ở cá da trơn;*
- TCVN 8710-17:2016, *Phần 17: Bệnh sữa trên tôm hùm;*
- TCVN 8710-19:2019, *Phần 19: Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm;*
- TCVN 8710-20:2019, *Phần 20: Bệnh hoại tử dưới vỏ và cơ quan tạo máu ở tôm;*
- TCVN 8710-21:2019, *Phần 21: Bệnh do vi khuẩn Streptococcus agalactiae ở cá;*
- TCVN 8710-22:2022, *Phần 22: Bệnh sán lá 16 móc ở cá;*
- TCVN 8710-23:2022, *Phần 23: Bệnh hoại tử cơ quan tạo máu do IHNV ở cá hồi;*
- TCVN 8710-24:2022, *Phần 24: Bệnh do sán lá Dollfustrema sp. ở cá da trơn;*
- TCVN 8710-25:2022, *Phần 25: Bệnh do ký sinh trùng Bonamia ostreae và Bonamia exitiosa ở hàu.*
- TCVN 8710-26:2023, *Phần 26: Bệnh hoại tử cơ quan tạo máu do EHNV ở cá*

TCVN 8710-X:2025

- TCVN 8710-27:2023, *Phần 27: Bệnh do vi rút Tilapia lake (TiLV) ở cá rô phi*
- TCVN 8710-28:2023, *Phần 28: Bệnh do RSIV ở cá biển*

Bệnh thủy sản – Quy trình chẩn đoán –

Phần x: Bệnh nhiễm trùng xuất huyết do vi rút (VHS) gây bệnh trên cá

Aquatic animal disease – Diagnostic procedure –

Part x: Viral haemorrhagic septicaemia disease in fish

CẢNH BÁO – Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn sức khỏe thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy trình chẩn đoán bệnh nhiễm trùng xuất huyết do vi rút (VHS) gây bệnh trên cá.

2 Thuật ngữ, định nghĩa và các từ viết tắt

2.1 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau:

2.1.1

Bệnh nhiễm trùng xuất huyết do vi rút (VHS) gây bệnh trên cá

Là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm do vi rút đối với các loài cá Hồi, cá Vược và một số loài cá khác.

2.1.2

Vi rút gây bệnh nhiễm trùng xuất huyết ở cá (*Viral haemorrhagic septicaemia*- VHS)

Vi rút VHS hình que một đầu tròn (hình viên đạn), có đường kính khoảng 70 nm và dài 180 nm, chứa một bộ gen RNA chuỗi đơn, với khoảng 11.000 nucleotide và có một vỏ bọc chứa glycoprotein màng, là kháng nguyên bề mặt trung hòa. Các bộ gen mã hóa sáu protein: 1 nucleoprotein N; 1

phosphoprotein P (trước đây được gọi là M1); 1 matrix protein M (trước đây được gọi là M2); 1 glycoprotein G; 1 protein phi virion NV và 1 polymerase L (Walker và cộng sự, 2000). Trình tự nucleotide của gen G đã được sử dụng để phân loại các chủng VHSV thành 4 kiểu gen chính (I, II, III và IV) và 9 phân nhóm (Ia–Ie và IVa–IVd) với sự phân bố địa lý gần như khác biệt (EinerJensen et al., 2004; Elsayed et al., 2006).

Kiểu gen Ia: Được phân lập tại các trang trại cá hồi vân Châu Âu và một số loài cá có vây khác ở Châu Âu như: cá hồi nâu (*Salmo trutta*), cá chó (*Esox lucius*), cá xám (*Thymallus thymallus*) và cá bơn nuôi ở biển (*Scophthalmus maximus*).

Kiểu gen Ib: Phân lập từ cá có vây ở biển Baltic, Kattegat, Skagerrak, biển Bắc và Eo biển Manche. Một trường hợp duy nhất được tìm thấy tại Nhật Bản.

Kiểu gen Ic: Phân lập từ cá hồi vân nuôi nước ngọt của Đan Mạch

Kiểu gen Id: Phân lập từ cá hồi vân nuôi ở biển ở Phần Lan, VHSV mang kiểu gen Id có độc tính ít hơn kiểu gen Ia

Kiểu gen Ie: Phân lập được từ cá ở môi trường nước ngọt và môi trường biển (Biển Đen ở Georgia và Thổ Nhĩ Kỳ) như: cá bơn nuôi và cá Bơn hoang dã, cá hồi vân, cá tuyết (*Merlangius merlangus*) và cá vược châu âu (*Dicentrarchus labrax*) ở biển đen.

Kiểu gen II: Phân lập ở các loài cá có vây hoang dã ở biển như cá trích Đại Tây Dương (*Clupea harengus*) từ biển Baltic, bao gồm vịnh Bothnia và vịnh Phần Lan. Kiểu gen II cũng được phát hiện ở cá mút đá (*Lampetra fluviatilis*) ở vùng nước ngọt sông Kalajoki và Lestijoki, nơi có cửa thoát ra Vịnh Bothnia.

Kiểu gen III: Phân lập ở cá vây hoang dã và cá nuôi ở biển Bắc Đại Tây Dương từ Flemish Cap đến bờ biển Na Uy, biển Bắc xung quanh nước Anh, quần đảo, Kattegat, Skagerrak như cá bơn, cá hồi vân, cá bàng chài (*wrasse*).

Kiểu gen IVa: Phân lập ở cá có vây như cá trích Thái Bình Dương (*Clupea pallasii pallasii*) tại biển Bắc Mỹ trải dài từ California đến Alaska ở phía tây và xung quanh vùng đông bắc Hoa Kỳ cho đến Newfoundland, Canada. Kiểu gen IVa cũng đã được báo cáo ở cá bơn vĩ (*Paralichthys olivaceus*) tại các nước châu Á như Hàn Quốc và Nhật Bản.

Kiểu gen IVb: Phân lập ở cá có vây tại vùng nước ngọt từ vùng hồ lớn Laurentian ở Bắc Mỹ

Kiểu gen IVc: Phân lập ở các loài cá có vây tại vùng nước cửa sông của New Brunswick và Nova Scotia, Canada

Kiểu gen IVd: Phân lập ở Iceland cá vây tròn hoang dã và nuôi ở biển (*Cyclopterus lumpus*).

2.2 Các từ viết tắt

- **VHS:** Viral haemorrhagic septicaemia;
- **ADN** (Deoxyribonucleic acid): Axit deoxyribonucleic;
- **ARN** (Ribonucleic acid): Axit Ribonucleic;
- **PBS** (Phosphate buffered saline): Dung dịch muối đệm phosphat;
- **RT-PCR** (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction):
Phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược;
- **Real-time RT-PCR** (Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction):
Phản ứng chuỗi trùng hợp phiên mã ngược thời gian thực;
- **TAE** (Tris-acetate-EDTA): Tris-axetat-axit etylendiamintetraaxetic;
- **TBE** (Tris-borate-EDTA): Tris-borat-axit etylendiamintetraaxetic;
- **TE** (Tris-EDTA): Tris-axit etylendiamintetraaxetic.
- **Ct** (Cycle threshold): Chu kỳ ngưỡng.

3 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích, sử dụng nước cất, nước khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ các trường hợp có quy định khác.

3.1 Thuốc thử và vật liệu thử dùng chung

3.1.1 Ethanol, từ 70 % đến ethanol tuyệt đối

3.1.2 Dung dịch muối đệm phosphate (PBS)

3.2 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phương pháp sinh học phân tử

3.2.1 Mồi và dò (primers/probe) real-time RT - PCR, gồm mồi xuôi, mồi ngược và dò

3.2.2 Mồi (primers) RT-PCR, gồm mồi xuôi và mồi ngược

3.2.3 Kít nhân gen PCR

3.2.4 Kít nhân gen RT- PCR

3.2.5 Kít nhân gen Real-time RT- PCR

TCVN 8710-X:2025

3.2.6 Kít tách chiết ARN

3.2.7 Thạch agarose

3.2.8 Dung dịch đệm TAE hoặc TBE (xem A.1)

3.2.9 Chất nhuộm màu, Ví dụ: Sybr safe

3.2.10 Chất đệm tải mẫu (Loading dye 6X)

3.2.11 Thang chuẩn ADN (Ladder/ Marker)

3.2.12 Dung dịch đệm TE

3.2.13 Nước tinh khiết, không có nuclease.

4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm sinh học và những thiết bị, dụng cụ sau:

4.1 Thiết bị, dụng cụ dùng chung

4.1.1 Tủ lạnh, có thể duy trì ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C

4.1.2 Tủ lạnh âm sâu, có thể duy trì ở nhiệt độ từ âm 20 °C tới âm 80 °C

4.1.3 Buồng cấy an toàn sinh học cấp 2

4.1.4 Pipet đơn kênh các loại

4.1.5 Ống đong, dung tích 100 ml; 500 ml; 1000 ml

4.1.6 Máy ly tâm, có thể hoạt động với gia tốc 2 000 *g* đến 4 000 *g* và gia tốc 12 000 *g*

4.1.7 Máy nghiền mẫu

4.1.8 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg

4.1.9 Dụng cụ chứa mẫu, kín, có nắp đậy, không rò rỉ, vô trùng

4.1.10 Panh, kéo, vô trùng

4.1.11 Máy ủ nhiệt, từ 0 °C đến 100 °C

4.2 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp sinh học phân tử

- 4.2.1 Máy nhân gen PCR
- 4.2.2 Máy real-time PCR
- 4.2.3 Máy tách chiết ARN/ADN
- 4.2.4 Máy lắc trộn Vortex
- 4.2.5 Máy đọc sản phẩm PCR
- 4.2.6 Bộ điện di, gồm bộ nguồn và bể chạy điện di
- 4.2.7 Khay đựng đá lạnh
- 4.2.8 Bộ khuôn và lược đổ thạch

5 Chẩn đoán lâm sàng

5.1 Đặc điểm dịch tễ

Các loài mẫn cảm với VHS là cá hồi (*Oncorhynchus* spp.), cá hồi nâu (*Salmo trutta*), cá thymall (*Thymallus thymallus*), cá hồi trắng (*Coregonus* spp.), cá chó (*Esox lucius*), cá bơn (*Scophthalmus maximus*), tuyết Thái Bình Dương (*Gadus macrocephalus*), cá trích Thái Bình Dương (*Clupea pallasii*), cá tuyết Đại Tây Dương (*Gadus morhua*), cá vược châu Âu (*Dicentrarchus labrax*), cá tuyết chấm đen (*Melanogrammus aeglefinus*), cá tuyết đá (*Rhinonemus cimbrius*), cá trích cơm (*Sprattus sprattus*), cá trích (*Clupea harengus*) và một số loài cá khác.

Cá hồi vân cỡ nhỏ (0,3 g đến 3 g) dễ bị nhiễm vi rút VHS nhất là với kiểu gen Ia, tỷ lệ tử vong gần 100%. Đối với kiểu gen VHSV Ib, II và III các loài sống hoang dã như cá trích Đại Tây Dương và cá trích châu Âu có khả năng là vật chủ tự nhiên, không có dấu hiệu lâm sàng của bệnh và có nồng độ vi rút thấp. Kiểu gen IVa cá trích Thái Bình Dương là vật chủ tự nhiên, Kiểu gen IVa gây bệnh cho cá hồi, cá bơn và cá bơn (turbot và bastard halibut). Kiểu gen VHSV III gây ra bệnh ở cá bơn (turbot) và cá mú nuôi.

Vi rút VHS có thể gây bệnh và chết ở tất cả các giai đoạn sống của cá mẫn cảm. Nhiệt độ nước là yếu tố môi trường quan trọng, bệnh xuất hiện khi nhiệt độ nước từ 4°C đến 14°C. Tỷ lệ tử vong cao nhất ở nhiệt độ nước khoảng từ 9 °C đến 12 °C

Bệnh do vi rút VHS xuất hiện ở tất cả các mùa nhưng thường xuất hiện mùa xuân khi nhiệt độ nước thích hợp.

Vi rút VHS ổn định trong nước ngọt hơn trong nước biển. Vi rút có thể tồn tại trong nước ngọt trong 28 đến 35 ngày ở 4°C (Parry & Dixon, 1997) và được phát hiện là có khả năng lây nhiễm trong 1 năm ở 4°C trong nước ngọt đã lọc (Hawley & Garver, 2008). Trong nước ngọt thô ở 15°C, khả năng khử hoạt

tính 99,9% thời gian là 13 ngày, nhưng trong nước biển vi rút bị bất hoạt trong vòng 4 ngày (Hawley & Garver, 2008).

Bệnh chủ yếu lây truyền theo chiều ngang qua nước, với sự bài tiết vi rút qua nước tiểu và trực tiếp qua da (Smail & Snow, 2011). Ngoài ra bệnh lây truyền qua miệng con mồi và vật trung gian bị nhiễm bệnh như các loài chim ăn cá mang vi rút trên mỏ và chân hoặc thông qua việc nôn ra cá bị nhiễm bệnh (Schonherz et al. 2012, Peters & Neukirch, 1986). Không có dấu hiệu hoặc bằng chứng nào về sự lây truyền của VHSV theo chiều dọc từ bố mẹ sang con (Bovo et al., 2005a; Munro & Gregory, 2010).

Một số cá thể sống sót sau dịch bệnh sẽ trở thành vật mang vi rút lâu dài, có thể truyền bệnh cho cá thể sống chung môi trường nhưng chưa nhiễm bệnh.

5.2 Triệu chứng và bệnh tích

- Cá bị nhiễm vi rút VHS có biểu hiện xuất huyết ban, xuất huyết toàn thân ở da, mô cơ (đặc biệt ở cơ lưng) và các cơ quan nội tạng. Thận có màu đỏ sẫm ở giai đoạn cấp tính và có thể biểu hiện hoại tử nghiêm trọng ở cá sắp chết, lách sưng, gan thường nhợt nhạt và lốm đốm, đường tiêu hóa, ruột sau nhợt nhạt và không có thức ăn..

- Ở cá có dấu hiệu lâm sàng, vi rút có nhiều ở tất cả các mô bao gồm mang, da và cơ (Sandlund và cộng sự, 2014). Các cơ quan đích là phía trước thận, tim và lá lách, vì đây là những vị trí vi rút xâm nhập nhiều nhất. Ở giai đoạn mạn tính, nồng độ vi rút có thể tăng cao trong não (Smail & Snow, 2011; Wolf, 1988).

6 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

6.1 Lấy mẫu

- Cá hương, cá bột, cá con có trọng lượng nhỏ hơn 1g: Lấy mẫu từ 01 đến 03 gram/ mẫu
- Cá giống và thương phẩm có trọng lượng từ 1g đến 50g: Lấy nguyên con, từ 5 con đến 15 con.
- Cá thương phẩm có trọng lượng lớn hơn 50g: Lấy nguyên con, từ 3 con đến 5 con hoặc lấy mang, da, cơ, tim, thận, lách của từ 3 con đến 5 con.
- Cá bố mẹ: Lấy nguyên con 1 con/mẫu hoặc hoặc lấy mang, da, cơ, tim, thận, lách, tinh dịch và dịch buồng trứng của 1 con/ mẫu

Mẫu bệnh phẩm phải được lấy vô trùng và để riêng biệt trong lọ dụng cụ chứa mẫu (4.1.9).

Tất cả các mẫu phải được dán nhãn, ghi kí hiệu và gửi kèm theo phiếu gửi mẫu bệnh phẩm và thông tin dịch tễ của mẫu.

CHÚ Ý: Khuyến nghị mô tối ưu để phát hiện VHS là thận trước, lá lách và tim (không nên lấy mẫu gan). Cá bố mẹ nên lấy tinh dịch và dịch buồng trứng.

6.2 Bảo quản mẫu

Bảo quản vận chuyển:

Bảo quản mẫu ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C không quá 48 h khi vận chuyển về phòng thí nghiệm hoặc bảo quản trong ethanol 70 % đến ethanol tuyệt đối với tỉ lệ 1:10 (mẫu : ethanol).

Bảo quản tại phòng thí nghiệm:

Mẫu xét nghiệm bằng phương pháp PCR được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C chuyển đến phòng thí nghiệm chưa phân tích ngay phải được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C đến âm 80 °C hoặc được bảo quản trong dung dịch Phosphate Buffered Saline (PBS) (3.1.2) theo tỉ lệ 1:10 (mẫu : PBS) ở nhiệt độ âm 20 °C đến âm 80 °C hoặc bảo quản trong ethanol từ 70% đến ethanol tuyệt đối.

6.3 Chuẩn bị mẫu

Dùng panh, kéo (4.1.10) vô trùng để thực hiện các thao tác: tách, cắt lấy mẫu (mang, da, cơ, tim, thận, lách). Mẫu được chia thành 2 phần: 1 phần cho thực hiện xét nghiệm và 1 phần lưu trữ.

Cho mẫu vào dung dịch PBS (3.1.2) theo tỷ lệ 1:10 (mẫu : PBS), đồng nhất mẫu bằng máy nghiền mẫu (4.1.7) hoặc bằng cối, chày nghiền mẫu để tạo thành huyền dịch 10 %. Chuyển huyền dịch vào 2 ống vô trùng đóng nắp, một ống mẫu để xét nghiệm và một ống lưu mẫu.

CHÚ Ý: Với mẫu đã bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C đến âm 80 °C cần rã đông ngoài nhiệt độ phòng trước khi thực hiện đồng nhất mẫu.

6.4 Tách chiết ARN

Sử dụng bộ kit tách chiết (3.2.6) thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

VÍ DỤ: Sử dụng kit tách chiết ARN: InviMAG®Virus DNA/RNA Mini Kit/ KF96, Cat. No: 7441050100 (xem phụ lục B1) hoặc sử dụng kit tách chiết TACO RNA/DNA extraction Kit (GeneReach Cat. No. atc-d/rna, 320 tests (xem phụ lục B2) hoặc PureLink Viral RNA/DNA mini kit (50) (Cat. No: 12280-050) xem phụ lục B3)¹⁾

6.5 Phương pháp RT-PCR

6.5.1 Chuẩn bị môi

¹⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

Phương pháp RT-PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu forward primer 3F / reverse primer 2R (3.2.2) để phát hiện vi rút gây bệnh nhiễm trùng xuất huyết ở cá .

Trình tự cặp mồi (xem phụ lục C, Bảng C1).

Mồi được chuẩn bị như sau:

- Mồi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy ly tâm (4.1.6) trong 30 s để mồi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Dùng dung dịch đệm TE (3.2.12) để hoàn nguyên mồi ở nồng độ 100 μ M làm gốc.
- Mồi được sử dụng ở nồng độ 20 μ M: Pha loãng mồi gốc bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.13) (20 μ l mồi gốc và 80 μ l nước tinh khiết không có nuclease).

6.5.2 Tiến hành phản ứng RT-PCR

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy nhân gen PCR (4.2.1) theo phương pháp RT- PCR khuếch đại đoạn gen đặc hiệu của vi rút gây bệnh nhiễm trùng xuất huyết ở cá sử dụng cặp mồi forward primer 3F/ reverse primer 2R (3.2.2) (xem phụ lục C)

6.5.3 Điện di

6.5.3.1 Chuẩn bị bản thạch

Pha thạch với nồng độ agarose (3.2.7) từ 1,5 % đến 2 % bằng dung dịch đệm TBE 1X hoặc TAE 1X (3.2.8) vào chai thủy tinh 250 ml, lắc đều rồi đun sôi;

Khi nhiệt độ giảm xuống khoảng 40 °C đến 50 °C thì bổ sung 10 μ l chất nhuộm màu (3.2.9) vào mỗi 100 ml thạch. Lắc nhẹ tránh tạo bọt để chất nhuộm màu tan đều.

Tiến hành đổ thạch vào khay điện di đã được cài lọc; không nên đổ bản thạch dày quá 0,8 cm.

Khi bản thạch đông lại thì tiến hành gỡ lọc khỏi bản thạch.

Chuyển bản thạch vào bể điện di (4.2.6), đổ dung dịch đệm (TBE 1X hoặc TAE 1X) cùng loại với dung dịch pha agarose đã đun vào bể điện di cho tới khi ngập bản thạch.

CHÚ THÍCH: Có thể dùng các sản phẩm có sẵn chất nhuộm ADN để pha chế thạch agarose (VÍ DỤ: Sybr safe DNA gel stain và sử dụng theo quy định của nhà sản xuất).

6.5.3.2 Chạy điện di

Hút 2 μ l chất đệm tải mẫu (Loading dye 6X) (3.2.10) vào 8 μ l sản phẩm PCR trộn đều và cho vào các giếng trên bản thạch. Thực hiện điện di trong bộ điện di, chạy kèm theo thang chuẩn ADN (3.2.11) để

so sánh kích thước sản phẩm khuếch đại. Hút 10 µl thang chuẩn ADN (3.2.11) vào một giếng trên bản thạch.

Điện di ở hiệu điện thế 100 V trong thời gian 30 min.

6.5.4 Đọc kết quả

Sau khi điện di, đọc kết quả trên máy đọc sản phẩm PCR (4.2.5).

Điều kiện của phản ứng được công nhận khi:

- Đối chứng âm không có vạch sáng (không có sản phẩm khuếch đại);
- Đối chứng dương có vạch sáng kích thước 319 bp
- Thang chuẩn ADN sáng và chia vạch rõ ràng

Với điều kiện phản ứng trên

Mẫu xét nghiệm âm tính khi:

- Tại giếng của mẫu thử không xuất hiện vạch sáng (không có sản phẩm khuếch đại);

Mẫu xét nghiệm dương tính khi:

- Tại giếng của mẫu thử xuất hiện vạch sáng kích thước 319 bp

6.6 Phương pháp real-time RT - PCR

6.6.1 Chuẩn bị môi

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy real-time PCR (4.2.2) theo phương pháp real-time RT-PCR khuếch đại đoạn gen đặc hiệu của vi rút gây bệnh nhiễm trùng xuất huyết ở cá sử dụng cặp mồi VHSV-ArhusF / VHSV-ArhusR, đoạn dò VHSV-Arhus-TAMRA probe hoặc cặp mồi forward primer / reverse primer, đoạn dò FAM-labelled probe (3.2.1). Trình tự cặp mồi được nêu trong Bảng Trình tự cặp mồi (xem phụ lục D, Bảng D1).

Môi được chuẩn bị như sau:

- Môi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy ly tâm (4.1.6) trong 30 s để môi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Khi hoàn nguyên, nên dùng dung dịch đệm TE (3.2.12) để hoàn nguyên môi ở nồng độ 100 µM làm gốc.
- Môi được sử dụng ở nồng độ 25 µM: pha loãng môi gốc bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.13) (25 µl môi gốc và 75 µl nước tinh khiết không có nuclease).

- Đoạn dò sử dụng nồng độ 10 μM : pha loãng đoạn dò bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.13) (10 μl mỗi gốc và 90 μl nước tinh khiết không có nuclease)

6.6.2 Tiến hành phản ứng real-time RT - PCR

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy real-time PCR (4.2.2) theo phương pháp real-time RT-PCR sử dụng cặp mồi VHSV-ArhusF / VHSV-ArhusR, đoạn dò VHSV-Arhus-TAMRA probe hoặc cặp mồi forward primer / reverse primer, đoạn dò FAM-labelled probe, sử dụng kit nhân gen real-time RT-PCR (3.2.5) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6.6.3 Đọc kết quả

Điều kiện của phản ứng được công nhận khi:

- Mẫu đối chứng âm phải cho kết quả âm tính (không có giá trị Ct).
- Mẫu đối chứng dương phải cho kết quả dương tính và có giá trị Ct so với giá trị Ct của mẫu đã được chuẩn độ trước đó có khoảng giá trị Ct = ± 2

Với điều kiện phản ứng như trên:

- Mẫu có giá trị Ct < 35 được xem là dương tính
- Mẫu không có giá trị Ct là âm tính
- Mẫu có giá trị Ct trong khoảng $35 \leq \text{Ct} \leq 40$ được xem là nghi ngờ.

CHÚ Ý:

- Những mẫu nghi ngờ, cần được thực hiện xét nghiệm lại hoặc sử dụng phương pháp xét nghiệm tương đương khác để khẳng định kết quả.
- Phản ứng real-time RT- PCR phải bao gồm: mẫu kiểm tra, mẫu kiểm chứng dương và mẫu kiểm chứng âm;
- Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng real-time RT- PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

7 Kết luận

Mẫu cá được xác định mắc bệnh nhiễm trùng xuất huyết do vi rút (VHS) khi có những đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đặc trưng của bệnh và:

- Có kết quả dương tính với VHS bằng phương pháp RT- PCR hoặc
- Có kết quả dương tính với VHS bằng phương pháp real-time RT- PCR.

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị thuốc thử

A.1 Dung dịch đệm TAE 1X hoặc TBE 1X

A.1.1 Thành phần

Dung dịch TAE (hoặc TBE) 10X: 100 ml

Nước khử ion: 900 ml

Tổng: 1000 ml dung dịch TAE (TBE) 1X

A.1.2 Chuẩn bị

Lấy 100 ml dung dịch TAE (TBE) 10X hoà chung với 900 ml nước khử ion, khuấy và lắc đều.

Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

A.2 Dung dịch muối đệm phosphat (PBS)

A.2.1 Thành phần

Natri clorua (NaCl) 8 g

Natri hydro photphat dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2,9 g

Kali dihydro photphat (KH_2PO_4) 0,2 g

Kali clorua (KCl) 0,2 g

Nước cất 1000 ml

A.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trên vào 1000 ml nước cất, khuấy và lắc đều.

Chỉnh pH về trung tính bằng dung dịch NaOH 1N hoặc dung dịch HCl 1N. Hấp vô trùng ở 121 °C trong 30 min.

Phụ lục B

(Tham khảo)

Quy trình tách chiết ARN

CẢNH BÁO: Việc tách chiết ARN có sử dụng hoá chất nguy hiểm và có khả năng gây hại nếu thao tác không cẩn thận. Do vậy, nên tránh tiếp xúc trực tiếp với da và hít phải hơi của các hoá chất này. Luôn luôn đeo găng tay, khẩu trang, mặc quần áo bảo hộ khi thực hiện các thao tác này.

B1. Tách chiết ARN bằng bộ kit InviMAG®Virus DNA/RNA Mini Kit/ KF96**B1.1. Chuẩn bị hóa chất**

Các hóa chất cần được chuẩn bị và bảo quản theo đúng hướng dẫn của bộ kit InviMAG®Virus DNA/RNA Mini Kit/ KF96, Cat. No: 7441050100, với thể tích vừa đủ cho số lượng mẫu chiết tách, bao gồm:

- (1) Dung dịch đệm Lysis Buffer RV
- (2) Dung dịch rửa 1 (Wash 1)
- (3) Dung dịch rửa 2 (Wash 2)
- (4) Hỗn hợp hạt từ tính (Bead Mix)
- (5) Dung dịch thu hồi ADN/ARN Elution Buffer (EB)

Nếu chiết tách RNA bằng máy chiết tách tự động Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex, cần phải chuẩn bị trước các đĩa chứa dung dịch chiết tách theo hệ thống của máy như sau:

- + Đĩa Washing 1: 800µl dung dịch Wash 1/giếng;
- + Đĩa Washing Wash 2 và Washing Wash 3: 800µl dung dịch Wash 2/giếng;
- + Đĩa Elution Buffer: 100µl dung dịch EB/giếng.

B1.2. Tiến hành

- Hủy dịch 10% của mẫu bệnh phẩm được rã đông, trộn đều bằng máy vortex. Ly tâm mẫu trong máy ly tâm lạnh với lực ly tâm 2500 g/15 min.

- Hút 200µl dịch trong bên trên sau khi ly tâm vào ống eppendorf 1,5ml vô trùng có chứa sẵn 200 µl dung dịch đệm Lysis. Trộn đều mẫu bằng máy vortex và spin để kéo các phần bám trên nắp ống xuống.

- Chuyển toàn bộ dung dịch trong ống eppendorf vào đĩa chứa mẫu 96 giếng (mỗi giếng tương ứng với một mẫu chiết tách). Dùng giấy dán đĩa chuyên dụng dán kín mặt đĩa.

- Đặt đĩa lên máy lắc, ủ nhiệt (HLC-MHR23). Lắc đĩa với gia tốc 750rpm/15 min, nhiệt độ 65 °C.

- Lấy đĩa ra khỏi máy lắc, để nguội trong 5 min, tháo bỏ giấy dán đĩa. Bổ sung 420 µl dung dịch Bead Mix (gồm có 400 µl Binding solution và 20 µl MAP) vào mỗi giếng.

TCVN 8710-X:2025

- Chuyển tất cả các đĩa bao gồm: đĩa Tip Combs, đĩa Elution Buffer, đĩa Washing Wash 3, đĩa Washing Wash 2, đĩa Washing Wash 1 và đĩa chứa mẫu vào từng khay của máy chiết tách tự động theo hướng dẫn của máy.

- Chọn chương trình chiết tách RNA đã được cài đặt trước đó theo hướng dẫn của hãng sản xuất kit InviMAG®Virus DNA/RNA Mini Kit/ KF96.

- Sau 34 min, quá trình chiết tách hoàn tất. Thu hồi ARN của từng giếng vào ống eppendorf 0.5 ml tương ứng đã ghi rõ ký hiệu mẫu.

- Bảo quản mẫu ARN ở 4 °C trong vài giờ và âm 20 °C đến âm 80 °C trong thời gian lâu hơn.

B.2. Tách chiết ADN bằng TACO RNA/DNA extraction Kít

B.2.1 Vật liệu: Bộ kít chiết tách TACO RNA/DNA extraction Kít (GeneReach Cat. No. atc-d/rna, 320 tests)

Ethanol tuyệt đối

B.2.2 Chuẩn bị:

- Pha dung dịch đệm rửa A (washing buffer A) với 135 ml ethanol tuyệt đối

- Pha dung dịch đệm rửa B (washing buffer B) với 230 ml ethanol tuyệt đối

- Tiến hành theo sơ đồ

Thuốc Thử	Lượng (μl)	Thuốc thử	Lượng (μl)		H	G	F	E	D	C	B	A
Ethanol tuyệt đối	250	–	–	▶ 1								
Dung dịch đệm rửa A	750	Hạt từ	50	▶ 2								
Dung dịch đệm rửa A	750	–	–	▶ 3								
Dung dịch đệm rửa B	750	–	–	▶ 4								
Dung dịch đệm rửa B	750	–	–	▶ 5								
Nước đệm	100	–	–	▶ 6								
Ethanol tuyệt đối	250	–	–	▶ 7								
Dung dịch đệm rửa A	750	Hạt từ	50	▶ 8								
Dung dịch đệm rửa A	750	–	–	▶ 9								
Dung dịch đệm rửa B	750	–	–	▶ 10								
Dung dịch đệm rửa B	750	–	–	▶ 11								
Nước đệm	100	–	–	▶ 12								

B.2.3 Chuẩn bị mẫu:

- Cho 250 µL/mẫu dung dịch đệm vào các ống eppendort.
- Cho 100 µL/mẫu vào ống eppendort chứa dung dịch đệm.
- Lắc bằng máy lắc trộn vortex (4.2.4) trong 15 s.
- Ly tâm 12000 g trong 1 min.
- Cho 350 µL (mẫu và dung dịch đệm) vào các giếng ở cột 1 hoặc 7.

B.2.4 Đưa mẫu vào máy TACO

- Đặt đĩa vào máy TACO
- Đặt lược vào máy TACO.
- Sử dụng máy TACO theo hướng dẫn sử dụng: Máy TACO tự động chiết tách trong khoảng 50 min.
- Thu 100 µL ADN từ các giếng trong cột 6 hoặc 12 sang các ống eppendort mới.

CHÚ Ý: Mẫu đối chứng âm và mẫu đối chứng dương đều được tách chiết ARN trong cùng thời điểm với mẫu cần phát hiện

B.3. Tách chiết ARN bằng bộ kit Invitrogen PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit**B.3.1. Chuẩn bị hoá chất**

Các hóa chất cần được chuẩn bị và bảo quản theo đúng hướng dẫn của bộ kit Invitrogen PureLink Viral RNA/DNA mini Kit, Cat. No: 12280-050, với thể tích vừa đủ cho số lượng mẫu chiết tách, bao gồm:

- Proteinase K
- Dung dịch đệm Lysis Buffer
- Dung dịch Carrier RNA
- Dung dịch Wash buffer (W5)
- Nước RNase-free (E3)
- Cách pha hỗn hợp dung dịch Carrier và Lysis Buffer

$$N \times 0.21 \text{ ml} = A \text{ ml}$$

$$A \text{ ml} \times 28 \text{ µL/ml} = B \text{ µL}$$

Trong đó: N là số mẫu cần tách chiết

A là tổng số ml Lysis Buffer cần cho N mẫu;

B là tổng số µL Carrier RNA cần cho N mẫu.

B.3.2. Tiến Hành

1. Cho 25 µL Proteinase K vào ống eppendorf 1,5 ml;
2. Cho 200 µL mẫu vào ống eppendorf chứa Proteinase K;
- CHÚ Ý: nếu thể tích mẫu <200 µL thì có thể điều chỉnh thể tích mẫu cho đủ 200 µL bằng dung dịch PBS hoặc 0.9 % NaCl.
3. Cho hỗn hợp dung dịch Lysis Buffer và Carrier RNA vào ống chứa mẫu; đóng nắp ống và vortex 15s;
4. Ủ mẫu ở 56 °C trong 15 min;
5. Cho thêm 250 µL ethanol 96 % đến ethanol tuyệt đối vào ống mẫu; đóng nắp và vortex 15 s;
6. Để ở nhiệt độ phòng 5 min;

CHÚ Ý: mẫu mô sau khi để ở nhiệt độ phòng 5 min thì đem ly tâm 12.000 vòng trong 2 min và lấy dịch nổi bên trên.

7. Chuyển toàn bộ mẫu tách chiết vào cột lọc;
8. Ly tâm cột lọc ở 12.000 vòng trong 2 min đến 3 min; chuyển cột lọc sang ống thu mới;
9. Cho 500 µL nước rửa Wash buffer (W5) vào cột lọc; ly tâm 12.000 vòng trong 2 min đến 3 min; Chuyển cột lọc sang ống thu mới;
10. Lặp lại bước 9 với 500 µL nước rửa Wash buffer (W5) một lần nữa;
11. Loại bỏ ống thu và chuyển cột lọc sang ống thu mới;
12. Ly tâm khô 12000 vòng trong 1 min cho khô sạch nước rửa W5;
13. Chuyển cột lọc sang ống eppendorf 1,5 µL;
14. Cho 10 - 50 µL nước RNase-free (E3) (có sẵn) vào cột lọc;
15. Để ở nhiệt độ phòng 1 min; Ly tâm cột lọc ở 12000 vòng trong 1 min đến 2 min.
16. Lấy sản phẩm dưới cột lọc; Bảo quản mẫu ARN ở 4 °C trong vài giờ và âm 20 °C đến âm 80 °C trong thời gian lâu hơn.

Phụ lục C

(Quy định)

Phương pháp RT - PCR phát hiện vi rút gây nhiễm trùng xuất huyết ở cá**C.1 Trình tự cặp mồi****Bảng C.1 – Trình tự cặp mồi ^[4]**

Cặp mồi	Trình tự mồi từ đầu 5' tới 3'	Sản phẩm (bp)
forward primer 3F	5'-GGG-ACA-GGA-ATG-ACC-ATG-AT-3'	319 bp
reverse primer 2R	5'-TCT-GTC-ACC-TTG-ATC-CCC-TCC-AG-3'	

C.2 Thực hiện phản ứng RT - PCR

Thực hiện phản ứng RT - PCR sử dụng cặp mồi forward primer 3F/ reverse primer 2R

Chuẩn bị dung dịch cho phản ứng sử dụng cặp mồi forward primer 3F/ reverse primer 2R đã được chuẩn bị (3.2.2) và kit nhân gen (3.2.4) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví DỤ: Chuẩn bị MasterMix cho phản ứng RT-PCR theo kit SuperScript[®] III One-Step RT-PCR with Platinum[®] Taq. Cat: 12574-026³⁾ hoặc kit tương đương theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thành phần cho 1 phản ứng (xem bảng C.2).

Bảng C.2 – Thành phần phản ứng RT - PCR

Thành phần	Nồng độ (μM)	Thể tích cho 1 phản ứng (μl)
Nước không có ARN/ADN		6
Dung dịch 2x Reaction Mix		12,5
Mồi forward primer 3F	20	0,5
Mồi reverse primer 2R	20	0,5
Enzyme		0.5
Tổng thể tích dung dịch đệm thực hiện phản ứng		20

Chuyển 20 μl hỗn hợp nhân gen vào mỗi ống phản ứng:

Mẫu đối chứng dương: Cho 5 μl mẫu ARN đã được giám định hoặc sử dụng các chủng chuẩn.

Mẫu đối chứng âm: Cho 5 μl nước tinh khiết không có nuclease.

Mẫu thử: Cho 5 μl mẫu kiểm tra vào ống phản ứng.

Tiến hành phản ứng RT - PCR bằng máy nhân gen (4.2.1) đã cài đặt chu trình nhiệt (xem Bảng C.3).

³⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương

Bảng C.3 – Chu trình nhiệt của phản ứng RT - PCR

Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ (vòng)
50	30 min	1
94	02 min	1
94	15 s	40
60	30 s	
68	60 s	
68	5 min	1
Giữ ở 4 °C đến khi tắt máy		

CHÚ Ý:

- + Phản ứng RT- PCR phải bao gồm: mẫu kiểm tra, mẫu kiểm chứng dương (mẫu chiết tách và mẫu chạy nhân gen) và mẫu kiểm chứng âm (mẫu chiết tách và mẫu chạy nhân gen);
- + Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng RT - PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng;
- + Tùy theo kit sử dụng mà thành phần hỗn hợp phản ứng có thể khác nhau, việc thực hiện chuẩn bị hỗn hợp phản ứng nên tuân thủ theo hướng dẫn của kit được sử dụng.

Phụ lục D

(Quy định)

Phương pháp real-time RT - PCR phát hiện vi rút gây bệnh nhiễm trùng xuất huyết ở cá.**D.1 Trình tự cặp mồi****Bảng D.1 – Trình tự cặp mồi [3,5]**

TT	Cặp mồi	Trình tự mồi từ đầu 5' tới 3'
1	VHSV-ArhusF	5' - AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC -3'
2	VHSV-ArhusR	5' - TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA -3'
3	VHSV-Arhus-TAMRA probe	5' - 6FAM -TAG-AGG-GCC-TTG-GTGATC-TTC-TG-TAMRA -3'
4	forward primer	5'-ATG-AGG-CAG-GTG-TCG-GAG-G-3'
5	reverse primer	5'-TGT-AGT-AGG-ACT-CTC-CCA-GCA-TCC-3'
6	FAM-labelled probe	5'- 6FAM -TAC-GCC-ATC-ATG-ATG-AGT- MGBNFQ -3'

D.2 Thực hiện phản ứng real-time RT - PCR

Kỹ thuật real-time RT - PCR bao gồm:

Chuẩn bị dung dịch cho phản ứng sử dụng một trong 02 cặp mồi VHSV-ArhusF / VHSV-ArhusR, đoạn dò VHSV-Arhus-TAMRA probe (Jonstrup và cs, 2013) hoặc cặp mồi forward primer / reverse primer, đoạn dò FAM-labelled probe (Garver và cs, 2011) đã được chuẩn bị (3.2.1) và kit nhân gen real-time RT - PCR (3.2.5) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví dụ: theo Kit nhân gen qScript XLT One-Step RT-qPCRToughMix, Code: 95132.500⁵⁾, Đóng gói: 500 mẫu/Kit. Quantabio. Mỹ hoặc kit tương đương theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thành phần cho 1 phản ứng (xem bảng D.2).

Bảng D.2 – Thành phần phản ứng real-time RT - PCR

STT	Thành phần	Nồng độ (μM)	Thể tích cho 1 phản ứng (μl)
1	Nước không có RNA/ADN		6

⁵⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

2	Dung dịch 2X reaction mix		12,5
3	Mồi xuôi	25	0,5
4	Mồi ngược	25	0,5
5	Đoạn dò	10	0,5
Tổng thể tích dung dịch đệm thực hiện phản ứng			20

Chuyển 20 µl hỗn hợp nhân gen vào mỗi ống phản ứng:

Mẫu đối chứng dương: Cho 5 µl mẫu ARN đã được giám định hoặc sử dụng các chủng VHS chuẩn.

Mẫu đối chứng âm: Cho 5 µl nước tinh khiết không có nuclease.

Mẫu thử: Cho 5 µl mẫu ARN kiểm tra vào ống phản ứng.

Tiến hành phản ứng real-time RT - PCR bằng máy real-time PCR (4.2.2) đã cài đặt chu trình nhiệt được nêu trong bảng D.3.

Bảng D.3 – Chu trình nhiệt của phản ứng real-time RT – PCR

Nhiệt độ, °C	Thời gian	Số chu kỳ (vòng)
50	10 min	01
95	01 min	01
95	10 s	45
60(*)	30 s	

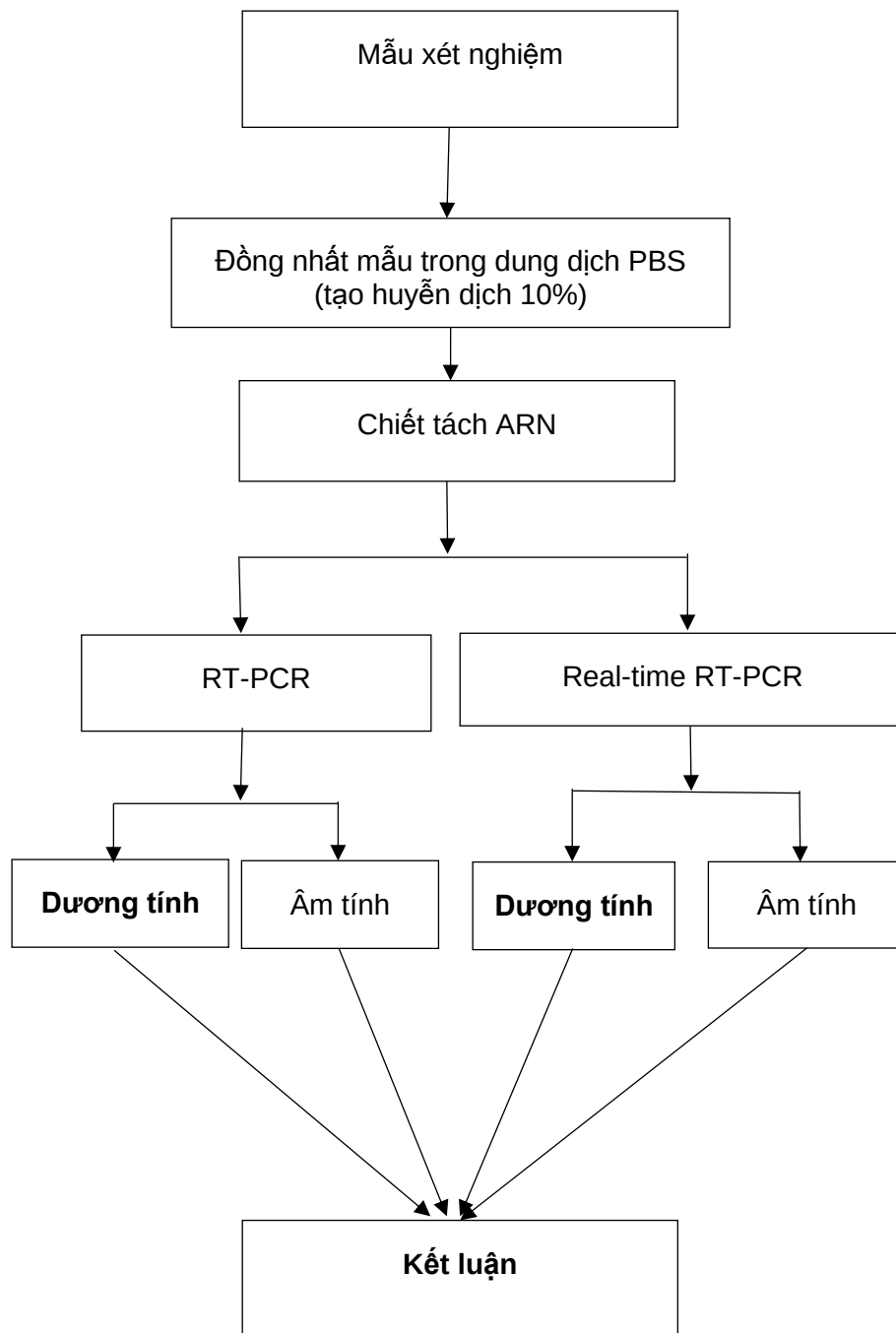
CHÚ Ý:

+ Phản ứng real-time RT - PCR phải bao gồm: mẫu kiểm tra, mẫu kiểm chứng dương (mẫu chiết tách và mẫu chạy nhân gen) và mẫu kiểm chứng âm (mẫu chiết tách và mẫu chạy nhân gen);

+ Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng real-time RT - PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng;

+ Tùy theo kit sử dụng mà thành phần hỗn hợp phản ứng có thể khác nhau, việc thực hiện chuẩn bị hỗn hợp phản ứng nên tuân thủ theo hướng dẫn của kit được sử dụng.

Phụ lục E
(Quy định)
Sơ đồ xét nghiệm vi rút VHS



Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] CSIRO Animal, Food and Health Sciences (CAFHS) Australian Animal Health Laboratory (AAHL) Quality Assurance (QA) Manual Methods AFDL In-House Tests For Emergency Disease Diagnosis And Test Protocols Under Development – Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus. Real-time PCR; OIE Jonstrup VHSV RT-qPCR Worksheet.
- [2] HAWLEY L.M. & GARVER K.A. (2008). Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. *Dis. Aquat. Org.*, 82, 171–178.
- [3] Garver K.A., Hawley L.M., McClure C.A., Schroeder T., Aldous S., Doig F., Snow M., Edes S., Baynes C. & Richard J. (2011). Development and validation of a reverse transcription quantitative PCR for universal detection of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.*, 95, 97–112.
- [4] Kim H.J., Cuenca A. & Olesen N.J. (2018). Validation of a novel one-step reverse transcription polymerase chain reaction method for detecting viral haemorrhagic septicaemia virus. *Aquaculture*, 492, 170–183.
- [5] Jonstrup S.P., Kahns S., Skall H.F., Boutrup T.S. & Olesen N.J. (2013). Development and validation of a novel Taqman based real time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Fish Dis.*, 36, 9–23.
- [6] OIE/WOAH, 2021, Chapter 2.3.10 Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal Infection with viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV).
- [7] Parry L. & Dixon P.F. (1997). Stability of nine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates in seawater. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 17, 31–36
- [8] WALKER P.J., BENMANSOUR A., DIETZGEN R. ET AL. (2000). Family Rhabdoviridae. In: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. et al., eds. 563–583.
- [9] WOAH, 2023, chapter 1.1.6 Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases, *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*.
- [10] TCCS 03: 2023/CD-TS Quy trình chẩn đoán, xét nghiệm - Bệnh nhiễm trùng xuất huyết ở cá (viral haemorrhagic septicaemia virus - VHSV).