

TCVN 8710-xxx:2025

Xuất bản lần 1

**BỆNH THỦY SẢN – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN xxx: BỆNH DO VI RÚT HERPES Ở BÀO NGƯ**

Aquatic animal disease - Diagnostic procedure -

Part xxx: Herpesvirus disease in Abalone

HÀ NỘI – 2025

Lời nói đầu

TCVN 8710-xxx:2025 được xây dựng trên cơ sở tham khảo *OIE/WOAH, 2022, Chapter 2.4.1. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Infection with abalone herpesvirus*

TCVN 8710-xxx: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 mủ 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-xxx: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 xxx: Bệnh do vi rút Herpes ở bào ngư

Aquatic animal disease – Diagnostic procedure –

Part xxx: Herpesvirus disease in Abalone

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 định quy trình chẩn đoán bệnh do vi rút Herpes ở bào ngư.

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 do vi rút Herpes ở bào ngư.

Là bệnh nhiễm tác nhân Aurivirus haliotidmalaco1, trước đây gọi là Haliotid herpesvirus 1 và abalone herpesvirus (AbHV) thuộc chi Aurivirus và Họ Malacoherpesviridae.

Aurivirus haliotidmalaco1 là tác nhân gây bệnh viêm hạch thần kinh do virus bào ngư (abalone viral ganglioneuritis - AVG)

2.1.2

Abalone Herpesvirus - AbHV

AbHV được quan sát bằng kính hiển vi điện tử. Các hạt AbHV có dạng khối hai mươi mặt với lõi dày đặc electron và đường kính 100–110 nm. Độ dốc đồng vị ly tâm (theo gradient mật độ kali tartrate và Caesium clorua) cho thấy hạt vi rút nổi mật độ 1,17–1,18 g ml⁻¹ (Tan và cộng sự, 2008).

2.2 Các từ viết tắt

- **AbHV:** Abalone Herpesvirus;
- **AVG:** Abalone viral ganglioneuritis;
- **ADN** (Deoxyribonucleic acid): Axit deoxyribonucleic;
- **ARN** (Ribonucleic acid): Axit ribonucleic;
- **PBS** (Phosphate buffered saline): Dung dịch muối đệm phosphat;
- **PCR** (Polymerase Chain Reaction): Phản ứng chuỗi trùng hợp;
- **Real-time PCR** (Real-time Polymerase Chain Reaction):
Phản ứng chuỗi trùng hợp 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), (xem A.2).

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

- 3.2.1 Cặp mồi (primers), gồm mồi xuôi và mồi ngược PCR
- 3.2.2 Cặp mồi (primers), gồm mồi xuôi và mồi ngược, Dò (Probe) real-time PCR
- 3.2.3 Kít tách chiết ADN
- 3.2.4 Kít nhân gen PCR
- 3.2.5 Kít nhân gen real-time PCR
- 3.2.6 Dung dịch đệm TE
- 3.2.7 Thang chuẩn ADN (ladder/ marker)
- 3.2.8 Nước tinh khiết, không có nuclease
- 3.2.9 Thạch agarose
- 3.2.10 Dung dịch đệm TAE hoặc TBE (xem A.1)
- 3.2.11 Chất nhuộm màu, Ví dụ: sybr safe
- 3.2.12 Chất đệm tải mẫu (loading dye 6X)

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

TCVN 8710-xxx:2025

4.1.9 Lọ đựng 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 ADN/ARN

4.2.4 Máy lắc trộn vortex

4.2.5 Bộ điện di, gồm bộ nguồn và bể chạy điện di

4.2.6 Máy đọc sản phẩm PCR

5 Chẩn đoán lâm sàng

5.1 Đặc điểm dịch tễ

– Bệnh *Abalone Herpesvirus* (AbHV) đã được báo cáo ở Úc, Trung Quốc và Đài Loan. So sánh trình tự nucleotide của AbHV VIC và AbHV Đài Loan trên 3 vùng chung đã xác định được điểm tương đồng là 92,4, 96,4 và 96,6%, cho thấy các virus này có chung mức độ trình tự cao sự tương đồng. Các phân tích trình tự bộ gen gần đây đã chỉ ra rằng một số biến thể kiểu gen là hiện diện ở Úc (Cowley và cs, 2011). Các kiểu gen AbHV này có khác nhau về kiểu hình, độc lực vẫn chưa được xác định.

– Loài mẫn cảm AbHV: Blacklip abalone (*Haliotis rubra*), Brownlip abalone (*Haliotis conicopora*), Disc abalone (*Haliotis discus hannai*), Diversicolor or jiukong abalone (*Haliotis diversicolor*), Greenlip abalone (*Haliotis laevigata*), Pink abalone (*Haliotis corrugate*), Tiger abalone (*Haliotis rubra* × *H. laevigata*).

– Cơ quan đích và mô bị nhiễm bệnh: mô thần kinh bao gồm hạch não, hạch màng phổi và hạch má.

– Tỷ lệ tử vong ở mọi lứa tuổi cao, có thể lên tới 90% (Corbeil và cộng sự, 2010). Bào Ngư có dấu hiệu lâm sàng như cong bàn chân có khả năng chết trong vòng 1 ngày sau khi có triệu chứng.

– Bệnh lây truyền chủ yếu theo phương thức truyền ngang trong môi trường nước.

5.2 Triệu chứng lâm sàng và dấu hiệu bệnh tích

– Bào ngư mắc bệnh AbHV có một hoặc nhiều dấu hiệu sau đây:

- Xuất hiện nhiều vỏ rỗng trên nền do bào ngư bị bệnh nặng hoặc chết đã bị động vật khác ăn thịt
- Không có khả năng bám dính vào chất nền
- Bào ngư không có khả năng tự lật lại khi bị lộn ngược.

Dấu hiệu bệnh lý tổng thể là:

- Phần miệng sưng và nhô ra
- Giảm hoạt động của cơ bàn đạp
- Mép chân cong vào trong, lộ ra lớp vỏ sạch, sáng bóng
- Chân co cứng đôi khi bị phồng rộp
- Tiết nhiều dịch nhầy
- Sinh sản bất thường và đầy hơi.

Dấu hiệu bệnh lý vi thể là:

- Viêm và hoại tử mô thần kinh.

6 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

6.1 Lấy mẫu

- Bào ngư giống kích thước từ 2 đến 10 mm: Lấy nguyên con, từ 10 đến 15 con.
- Bào ngư giống kích thước lớn hơn 10 mm: Lấy nguyên con, từ 5 đến 10 con.
- Bào ngư thương phẩm hoặc bào ngư bố mẹ: Lấy nguyên con, từ 1 đến 05 con hoặc lấy mô thần kinh bao gồm hạch não, hạch màng phổi và hạch má

Thu mẫu bào ngư có dấu hiệu bệnh lý, còn sống hoặc mới chết. 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.

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 từ khi lấy mẫu đến 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 được 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 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 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 vỏ, cắt lấy mẫu. Mẫu được chia thành hai phần: một phần cho thực hiện xét nghiệm và một phần lưu trữ.

Cho mẫu (6.1.1) 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 ADN

Sử dụng bộ kit tách chiết (3.2.3) thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

VÍ DỤ: Sử dụng kit tách chiết ADN của Qiagen: DNeasy® Blood & Tissue Kit (250) (Cat No. 69506) (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)¹⁾.

6.5 Phương pháp real-time PCR

6.5.1 Chuẩn bị mồi

Phản ứng real-time PCR phát hiện AbHV sử dụng các cặp mồi đặc hiệu:

AbHV ORF49F1/ AbHV ORF49R1 và đoạn dò AbHV 49Prb1 để phát hiện khung đọc mở ORF49.
AbHV ORF66F1/ AbHV ORF66R1 và đoạn dò AbHV 66Prb1 để phát hiện khung đọc mở ORF66 và
AbHV ORF71F1/ AbHV ORF71R1 và đoạn dò AbHV 71Prb1 để phát hiện khung đọc mở ORF71
(xem phụ lục C, bảng C1).

Mồi và dò được chuẩn bị như sau:

- Mồi và dò 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. Khi hoàn nguyên, nên dùng dung dịch đệm TE (3.2.6) để hoàn nguyên mồi ở nồng độ 100 µM làm gốc. Đối với mồi và dò ở trạng thái dung dịch phải được ly tâm nhanh bằng máy spindown (6.4) trong 30 s để mồi lắng xuống đáy ống trước khi mở và dùng dung dịch đệm TE (5.7) để hoàn nguyên mồi ở nồng độ 100 µM làm gốc.
- Mồi được sử dụng ở nồng độ 20 µM: pha loãng mồi gốc bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.8) (20 µl mồi gốc và 80 µl nước tinh khiết không có nuclease).

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.

- Đoạn dò AbHV sử dụng ở nồng độ 10 μ M: pha loãng đoạn dò bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.8) (10 μ l mỗi gốc và 90 μ l nước tinh khiết không có nuclease).

6.5.2 Tiến hành phản ứng real-time PCR

Kỹ thuật real-time PCR sử dụng một trong 03 cặp mồi AbHV ORF49F1/ AbHV ORF49R1 và AbHV ORF66F1/ AbHV ORF66R1 và AbHV ORF71F1/ AbHV ORF71R1 đã được chuẩn bị (6.2.3.2) sử dụng kit nhân gen (3.2.5) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. (Xem phụ lục C)

VÍ DỤ: Kit nhân gen Quantitect probe PCR Kit (200): Catalogue Number: 204343³⁾

6.5.3 Đọc kết quả

Kết quả của phản ứng real-time PCR được xác định dựa vào chu kỳ ngưỡng (Cycle threshold: Ct).

- Mẫu đối chứng âm phải cho kết quả âm tính
- Mẫu đối chứng dương (có giá trị Ct đã biết trước) phải cho kết quả dương tính và có giá trị Ct ± 2 Ct đã biết trước.

Kết quả phản ứng real-time PCR phát hiện vi rút AbHV:

- Mẫu có giá trị Ct < 37 được xem là dương tính
- Mẫu không có giá trị Ct là âm tính
- Mẫu có giá trị Ct trong khoảng $37 \leq Ct \leq 45$ được xem là nghi ngờ.

Giải thích kết quả

- Mẫu âm tính với phản ứng real-time PCR, kết luận là âm tính với vi rút AbHV
- Mẫu dương tính với phản ứng real-time PCR kết luận mẫu dương tính với vi rút AbHV

CHÚ Ý:

- Những mẫu nghi ngờ, cần được thực hiện lại xét nghiệm hoặc sử dụng phương pháp xét nghiệm tương đương khác để khẳng định kết quả.
- Phản ứng real-time 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 PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

6.6 Phương pháp PCR

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 của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

6.6.1 Chuẩn bị mẫu

Phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu AbHV-16/ AbHV-17 (3.2.1) để phát hiện vi rút AbHV.

Trình tự cặp mồi (xem phụ lục D, Bảng D1).

Mẫu được chuẩn bị như sau:

- Mẫu ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.1.5) trong 30 s để mẫu lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Dùng dung dịch đệm TE (3.2.6) để hoàn nguyên mẫu ở nồng độ 100 µM làm gốc.
- Mẫu được sử dụng ở nồng độ 20 µM: Pha loãng mẫu gốc bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.6) (20 µl mẫu gốc và 80 µl nước tinh khiết không có nuclease).

6.6.2 Tiến hành phản ứng PCR

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy nhân gen (4.1.1) theo phương pháp PCR sử dụng cặp mồi AbHV-16/ AbHV-17 (phát hiện AbHV) sử dụng kit nhân gen (3.2.4) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Xem phụ lục D).

6.6.3 Chạy điện di

Hút 2 µl chất đệm tải mẫu (Loading dye 6X) (3.2.12) vào 8 µl 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 (3.2.7) để dự đoán kích thước sản phẩm khuếch đại. Hút 10 µl thang chuẩn ADN (3.2.7) vào một giếng trên bản thạch.

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

6.6.4 Đọc kết quả

Sau khi điện di, đọc kết quả trên máy đọc sản phẩm PCR (4.1.8).

Điều kiện của phản ứng được công nhận khi:

- Đối chứng âm có kết quả âm tính (không có sản phẩm khuếch đại);
- Đối chứng dương có kết quả dương tính được thể hiện bằng vạch sáng rõ, có kích thước đã biết.

Với điều kiện phản ứng trên

Mẫu xét nghiệm âm tính với AbHV khi:

- Tại giếng của mẫu thử không xuất hiện vạch sáng (không có sản phẩm khuếch đại);
- Thang chuẩn ADN sáng và chia vạch rõ ràng.

Mẫu xét nghiệm dương tính với AbHV khi:

- Tại giếng của mẫu thử có sản phẩm khuếch đại có kích thước 522bp đến 588bp.
- Thang chuẩn ADN sáng và chia vạch rõ ràng.

7 Kết luận

Bào ngư được xác định mắc bệnh do AbHV (*Abalone Herpesvirus*) khi có những đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đặc trưng của bệnh và:

- Có kết quả dương tính với AbHV bằng phương pháp realtime PCR hoặc
- Có kết quả dương tính với AbHV bằng phương pháp 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) 1 X

A.1.2 Chuẩn bị

Lấy 100 ml dung dịch TAE (TBE) 10 X 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 phosphat dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2,9 g
– Kali dihydro phosphat (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 natri hydroxit 1 N hoặc dung dịch axit clohydric 1 N. Hấp vô trùng ở 121 °C trong 30 min.

Phụ lục B

(Tham khảo)

Quy trình tách chiết ADN

CẢNH BÁO: Việc tách chiết ADN 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. Quy trình tách chiết ADN sử dụng kit tách chiết DNeasy® Blood & Tissue Kit (250) (Cat No. 69506):

- Chuyển 30 mg bệnh phẩm vào ống eppendorf, thêm 180 µl dung dịch ATL, thêm 20 µl protease K vào, lắc đều bằng máy lắc trộn vortex (4.2.4);
- Ủ ở 56 °C qua đêm cho đến khi hoàn toàn đồng nhất (thỉnh thoảng lắc bằng máy lắc trộn vortex trong quá trình ủ). Lắc đều bằng máy lắc trộn vortex;
- Thêm 200 µl dung dịch AL (Lysis buffer). Lắc đều bằng máy lắc trộn vortex;
- Ủ ấm ở 56 °C trong 10 min;
- Thêm 200 µl ethanol (từ 96 % đến tuyệt đối) vào ống eppendorf. Lắc đều bằng máy lắc trộn vortex;
- Hút huyền dịch trong ống eppendorf, chuyển sang cột lọc có ống thu ở dưới;
- Ly tâm bằng máy ly tâm (4.1.6) với gia tốc 6 000 g trong 1 min ở nhiệt độ phòng;
- Thay ống thu ở dưới cột lọc;
- Thêm 500 µl dung dịch AW1 (Wash buffer 1) vào cột lọc có ống thu ở dưới;
- Ly tâm bằng máy ly tâm (4.1.6) với gia tốc 6 000 g trong 1 min ở nhiệt độ phòng;
- Thay ống thu ở dưới cột lọc;
- Thêm 500 µl dung dịch AW2 (Wash buffer 2) vào cột lọc có ống thu ở dưới;
- Ly tâm bằng máy ly tâm với gia tốc 20 000 g trong 3 min ở nhiệt độ phòng;
- Chuyển cột lọc sang ống eppendorf 1,5 ml;
- Nhỏ 200 µl dung dịch AE (Elution buffer) vào cột ly tâm và giữ ở nhiệt độ phòng 1 min;
- Ly tâm bằng máy ly tâm với gia tốc 6 000 g trong 1 min;
- Chuyển ADN đã thu được sang ống eppendorf 1,5 ml khác;
- Bảo quản mẫu ADN ở 2 đến 8 °C trong vài tuần và bảo quản ở âm 20 °C đến âm 80 °C trong thời gian lâu hơn.

CHÚ Ý: Mẫu đối chứng âm và mẫu đối chứng dương đều được tách chiết ADN trong cùng thời điểm với mẫu xét nghiệm.

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 eppendorf.
- Cho 100 µl/mẫu vào ống eppendorf chứa dung đệm.
- Lắc bằng máy 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 eppendorf mới.

CHÚ Ý: Mẫu đối chứng âm và mẫu đối chứng dương đều được tách chiết ADN trong cùng thời điểm với mẫu cần phát hiện vì rút gây bệnh do RSIV ở cá biển

Phụ lục C
(Quy định)

Phương pháp real-time PCR phát hiện AbHV

C.1 Trình tự cặp mồi

Bảng C.1 – Trình tự cặp mồi/dò^[2]

TT	Tên	Trình tự
1	Mồi AbHV ORF49F1	5'- AAC CCA CAC CCA ATT TTT GA -3'
	Mồi AbHV ORF49R1	5'- CCC AAG GCA AGT TTG TTG TT -3'
	Đoạn dò AbHV 49Prb1	5'- 6FAM CCG CTT TCA ATC TGA TCC GTG G TAMRA -3'
2	Mồi AbHV ORF66F1	5'- TCC CGG ACA CCA GTA AGA AC -3'
	Mồi AbHV ORF66R1	5'- CAA GGC TGC TAT GCG TAT GA -3'
	Đoạn dò AbHV66Prb1	5'- 6FAM TGG CCG TCG AGA TGT CCA TG TAMRA -3'
3	Mồi AbHV ORF77F1	5'- CAA CCA CTT GTT CGG GTT CT -3'
	Mồi AbHV ORF77R1	5'- CAG GGT GAT TAA TGC GGA GT -3'
	Đoạn dò AbHV 77Prb1	5'- 6FAM TCC GTA CGC GGG ATC TTC GT TAMRA -3'

C.2 Thực hiện phản ứng real-time PCR

Kỹ thuật real-time PCR sử dụng 03 cặp mồi dò bao gồm:

Chuẩn bị dung dịch cho phản ứng sử dụng một trong 03 cặp mồi AbHV ORF49F1/ AbHV ORF49R1 và AbHV ORF66F1/ AbHV ORF66R1 và AbHV ORF71F1/ AbHV ORF71R1 đã được chuẩn bị (3.2.1) và kit nhân gen (3.2.4) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

VÍ DỤ: theo kit nhân gen QuantiTect Probe RT-PCR kit, Cat.No: 204343⁵⁾ và hướng dẫn của nhà sản xuất (3.2.1)

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

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

Bảng C.2 - Thành phần phản ứng real-time PCR**+ Khung đọc mở ORF49**

STT	Thành phần	Nồng độ (μM)	Thể tích cho 1 phản ứng (μl)
1	Nước không có RNA/DNA		5,5
2	Dung dịch SuperMix 2X		12,5
3	Mồi AbHV ORF49F1	20	0,5
4	Mồi AbHV ORF49R1	20	0,5
5	Đoạn dò AbHV 49Prb1	10	1
Tổng thể tích dung dịch đệm thực hiện phản ứng			20
6	Mẫu DNA		5
Tổng thể tích dung dịch thực hiện phản ứng			25

+ Khung đọc mở ORF66

STT	Thành phần	Nồng độ (μM)	Thể tích cho 1 phản ứng (μl)
1	Nước không có RNA/DNA		5,5
2	Dung dịch SuperMix 2X		12,5
3	Mồi AbHV ORF66F1	20	0,5
4	Mồi AbHV ORF66R1	20	0,5
5	Đoạn dò AbHV 66Prb1	6	1
Tổng thể tích dung dịch đệm thực hiện phản ứng			20
6	Mẫu DNA		5
Tổng thể tích dung dịch thực hiện phản ứng			25

+ Khung đọc mở ORF77

STT	Thành phần	Nồng độ (μM)	Thể tích cho 1 phản ứng (μl)
1	Nước không có RNA/DNA		5,5
2	Dung dịch SuperMix 2X		12,5
3	Mồi AbHV ORF77F1	20	0,5
4	Mồi AbHV ORF77R1	20	0,5

5	Đoạn dò AbHV 77Prb1	6	1
Tổng thể tích dung dịch đệm thực hiện phản ứng			20
6	Mẫu DNA		5
Tổng thể tích dung dịch thực hiện phản ứng			25

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

Mẫu đối chứng dương: Cho 5 µl mẫu ADN 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 PCR bằng máy nhân gen (4.2.1) đã cài đặt chu trình nhiệt (xem Bảng C.3).

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

Nhiệt độ, (°C)	Thời gian	Số chu kỳ (vòng)
50	02 min	01
94	15 min	01
95	15 s	45
60 (*)	60 s	

Phụ lục D

(Quy định)

Phương pháp PCR phát hiện AbHV

D.1 Trình tự cặp mồi

Bảng D.1 – Trình tự cặp mồi ^[3]

Cặp mồi	Trình tự mồi từ đầu 5' tới 3'	Sản phẩm (bp)
Mồi AbHV-16	5'-GGC-TCG-TTC-GGT-CGT-AGA-ATG-3'	522bp đến 588bp
Mồi AbHV-17	5'-TCA-GCG-TGT-ACA-GAT-CCA-TGT-C-3'	

D.2 Thực hiện phản ứng PCR

Thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi AbHV-16/ AbHV-17

Chuẩn bị dung dịch cho phản ứng sử dụng cặp mồi AbHV-16/ AbHV-17 đã được chuẩn bị (3.2.2) và kit nhân gen (3.2.4) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

VÍ DỤ: Kit Thermo Scienetific Dream Taq PCR Master Mix (2X), Cat. No: K 1071³⁾ và hướng dẫn của nhà sản xuất (3.2.1)

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

Bảng D.2 – Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Nồng độ (µM)	Thể tích cho 1 phản ứng (µl)
Nước không có ARN/DNA		6,5
Dung dịch 2x Reaction Mix		12,5
Mồi AbHV-16	25	0,5
Mồi AbHV-17	25	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 ADN 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 PCR bằng máy nhân gen (4.2.1) đã cài đặt chu trình nhiệt (xem Bảng D.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

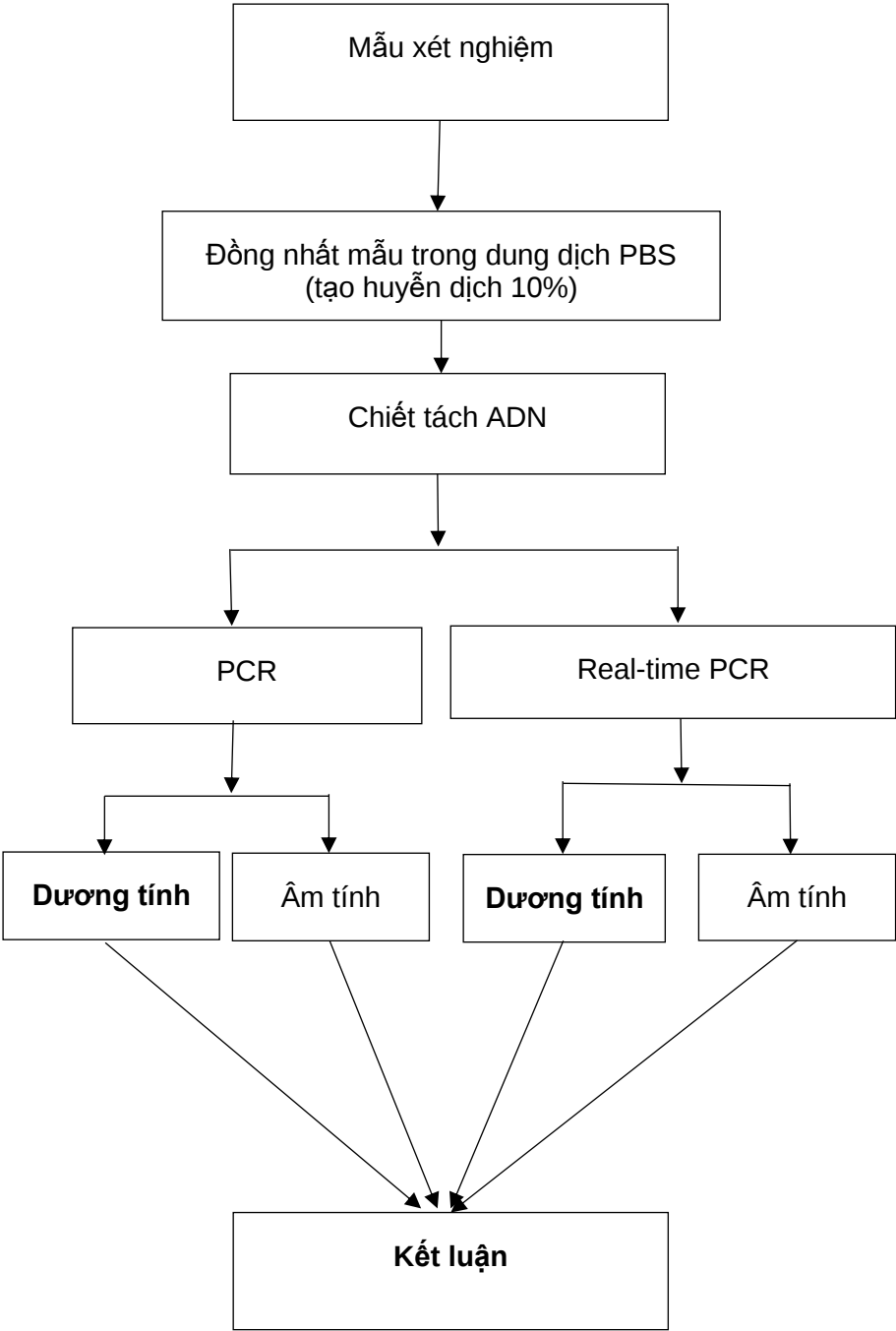
Bảng D.3 – Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ (vòng)
95	02 min	1
95	30 s	30
58	30 s	
72	60 s	
72	10 min	1

CHÚ Ý:

- + Phản ứng 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 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 AbHV



Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Abalone viral ganglioneuritis (AVG), Australian Government, Department of Agriculture.
 - [2] CHANG P.H., KUO S.T., LAI S.H., YANG H.S., TING Y.Y., HSU C.L. & CHEN H.C. (2005). Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Halitotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, 65, 23–27
 - [3] WOA, 2023, chapter 1.1.6 Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases, *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*.
 - [4] OIE/WOAH (2024) *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal*, Chapter 2.4.1. Infection with abalone herpesvirus
 - [5] TAN J., LANCASTER M., HYATT A., VAN DRIEL R., WONG F. & WARNER S. (2008). Purification of a herpes-like virus from abalone (*Halotis* spp.) with ganglioneuritis and detection by transmission electron microscopy. *J. Virol. Methods*, 149, 338–341
-