

TCVN 8710-XX:2025

Xuất bản lần 1

**BỆNH THỦY SẢN – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN xxx: BỆNH TUYẾN TỤY DO SAV Ở CÁ HỒI**

*Aquatic Animal Disease - Diagnostic procedure -
Part XXX: Pancreas disease by SAV in salmon*

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 2.3.8. *Infection with salmonid alphavirus*

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-XX: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 tuyến tụy do SAV ở cá hồi

Aquatic animal disease – Diagnostic procedure –

Part x: Pancreas disease by SAV in salmon

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 tuyến tụy do SAV ở cá hồi.

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 tuyến tụy do SAV ở cá hồi (*Pancreas disease by SAV in salmon*)

Bệnh truyền nhiễm nguy hiểm do vi rút *Salmonid alphavirus* (SAV) đối với các loài cá Hồi.

2.1.2

Vi rút SAV (*Salmonid alphavirus*)

Vi rút SAV thuộc giống *Alphavirus*, họ *Togaviridae*, là vi rút hình cầu, có vỏ bọc với vật chất di truyền là RNA mạch đơn (ssRNA), vi rút có đường kính khoảng 60-70 nm. Bộ gen có khoảng 12 kb, mã hóa 8 loại protein gồm 4 capsid Glycoprotein (E1, E2, E3 và 6K), 04 protein phi cấu trúc (nsP1-4).

SAV được chia thành 6 kiểu gen từ SAV1 đến SAV6 chỉ dựa trên trình tự trình tự axit nucleic của protein E2 và nsP3.

2.2 Các từ viết tắt

- **SAV:** Salmonid alphavirus;
- **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 etylenđiamintetraaxetic;
- **TBE** (Tris-borate-EDTA): Tris-borat-axit etylenđiamintetraaxetic;
- **TE** (Tris-EDTA): Tris-axit etylenđiamintetraaxetic;
- **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
- 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

Bệnh xảy ra ở một số loài cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar*, *Salvelinus alpinus*) hoặc cá bơn (*Limanda limanda*) ở mọi lứa tuổi. Tùy thuộc vào loài cá bị cảm nhiễm với vi rút SAV, điều kiện môi trường, phương thức chăn nuôi, chủng vi rút gây bệnh mà tỉ lệ chết có thể khác nhau. Tỷ lệ chết tích lũy có thể lên tới hơn 50 %. Thời gian ổ dịch có thể kéo dài từ 01 tuần tới 32 tuần.

Cá có thể nhiễm vi rút ở nhiều giai đoạn phát triển khác nhau, từ giai đoạn trứng tới giai đoạn trưởng thành. Cá sống sót sau đợt bùng phát dịch có thể trở thành vật mang vi rút lâu dài nên cá hồi Đại Tây Dương và cá hồi vân nuôi có thể được coi là ổ chứa chính của SAV. Cá mang vi rút mà không biểu hiện triệu chứng lâm sàng.

Bệnh chủ yếu lây lan theo chiều ngang từ cá thể bị bệnh sang cá thể khỏe, nguy cơ lây truyền SAV theo chiều dọc không đáng kể.

Một số nước thuộc Châu Âu, Bắc Mỹ và Nam Mỹ đã phát hiện bệnh SAV.

Vi rút SAV mang kiểu gen SAV1 và SAV2 được phát hiện gây bệnh ở cá nước ngọt và cá biển, trong đó SAV3, SAV4, SAV5, SAV6 chỉ mới được báo cáo phát hiện ở cá biển.

Nhiễm SAV gây ra bệnh tuyến tụy (PD) hoặc bệnh ngủ (SD) ở cá hồi Đại Tây Dương (*Salmo salar* L.), cá hồi đốm (*Limanda limanda*), cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*) và cá hồi Bắc Cực (*Salvelinus*).

Nhiệt độ 20 °C vi rút không được phát hiện sau 35 ngày, nhiệt độ 4 °C vi rút vẫn tồn tại 65 ngày. Thời gian bán huỷ của SAV trong huyết thanh ở 4 °C dài hơn 7 lần so với ở 20 °C.

Tỷ lệ nhiễm SAV khác nhau, trong thời gian bùng phát dịch tỷ lệ lưu hành chiếm 70 % đến 100% ở các địa điểm nuôi cá hồi Đại Tây Dương

Tỷ lệ chết do nhiễm SAV thay đổi theo kiểu gen, mùa, năm, tỷ lệ chết tích lũy có thể lên tới 50% trong trường hợp nặng

Giai đoạn bùng phát bệnh cơ quan chứa nhiều SAV nhất là tim, sau khi dịch bệnh bùng phát mang và mô tim, thận giữa vẫn được phát hiện trong nhiều tháng sau khi phát hiện ban đầu bằng phương pháp Realtime RT PCR.

Huyết thanh cá cũng thích hợp để phát hiện SAV bằng phương pháp Realtime RT PCR và nuôi cấy tế bào để cảnh báo sớm bùng phát dịch.

Các cơ quan như mang, tim, manh tràng có gắn mô tụy, gan, thận, lá lách thích hợp để kiểm tra SAV bằng mô bệnh học

5.2 Triệu chứng và bệnh tích

- Triệu chứng lâm sàng:

Cá có biểu hiện giảm ăn, bỏ ăn đột ngột từ 1 đến 2 tuần trước khi phát hiện tỷ lệ chết tăng cao

Cá nhiễm bệnh có biểu hiện bơi lơ dờ trên mặt nước. Một vài trường hợp cá yếu ớt có thể thấy ở dưới đáy bể hoặc trong lồng lưới (cá ngủ). Số lượng phân tăng lên. Sau giai đoạn bùng phát bệnh cá có hình thái mảnh mai (mỏng), dài, cơ thể ốm yếu, còi cọc.

- Cá bị nhiễm bệnh có bệnh tích: ruột có dịch nhầy màu vàng, vùng tụy có biểu hiện xung huyết hoặc xuất huyết, tích nước xoang bụng. Một số trường hợp tim có biểu hiện nhợt nhạt hoặc bị vỡ.

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 tim, thận giữa, mang, huyết thanh của từ 3 con đến 5 con.
- Cá bố mẹ: Lấy nguyên con 1 con/mẫu hoặc hoặc lấy tim, thận giữa, mang, huyết thanh 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 nên lấy mẫu tim và thận giữa để phát hiện SAV bằng phương pháp sinh học phân tử.

Đối với cá đã được tiêm phòng vaccin nên lấy mẫu tim và không nên lấy mẫu thận giữa, lá lách hoặc các cơ quan nội tạng khác vì việc mở khoang bụng có thể gây nhiễm RNA/DNA vi rút từ vaccin.

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, thận, lách, vây ngực, vây đuôi, mô cơ). 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 mẫu

Phương pháp RT-PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu E2F / E2R (3.2.2) để phát hiện vi rút gây bệnh tuyến tụy ở cá hồi.

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

Mẫu được chuẩn bị như sau:

- Mẫu ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy ly tâm (4.1.6) trong 30 s để mẫu lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Dùng dung dịch đệm TE (3.2.12) 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 (3.2.13) (20 µl mẫu gốc và 80 µl 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 tuyến tụy ở cá hồi sử dụng cặp mồi E2F / E2R (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 µl 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 lược; không nên đổ bản thạch dày quá 0,8 cm.

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

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.

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 µl chất đệm tải mẫu (Loading dye 6X) (3.2.10) 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 (3.2.11) 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 516 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 516 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 tuyến tụy ở cá hồi sử dụng cặp mồi QnsP1F / Mồi QnsP1R và đoạn dò QnsP1 probe (3.2.1). Trình tự cặp mồi được nêu trong bảng trình tự cặp mồi (xem phụ lục D, Bảng D1).

Mỗi được chuẩn bị như sau:

- Mỗi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy ly tâm (4.1.6) trong 30 s để mỗi 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 mỗi ở nồng độ 100 μ M làm gốc.
- Mỗi được sử dụng ở nồng độ 25 μ M: pha loãng mỗi gốc bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.13) (25 μ l mỗi gốc và 75 μ l nước tinh khiết không có nuclease).
- Đoạn dò QnsP1 probe sử dụng nồng độ 10 μ M: pha loãng đoạn dò bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.13) (10 μ l mỗi gốc và 90 μ l nước tinh khiết không có nuclease)

6.6.2 Tiến hành phản ứng real-time RT - PCR

Kỹ thuật real-time RT- PCR sử dụng cặp mỗi QnsP1F / Mỗi QnsP1R và đoạn dò QnsP1 probe đã được chuẩn bị (6.1.6.2), sử dụng kit nhân gen real-time RT-PCR (3.2.5) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Xem phụ lục D).

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

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 $35 \leq Ct \leq 40$ 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;

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.

- 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

Cá được xác định mắc bệnh tuyến tụy do SAV khi có những đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đặc trưng của bệnh và:

- Có kết quả dương tính với SAV bằng phương pháp RT- PCR hoặc
- Có kết quả dương tính với SAV 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

- Huyền 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.

- 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 Kit

B.2.1 Vật liệu: Bộ kit chiết tách TACO RNA/DNA extraction Kit (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 SAV gây bệnh tuyến tụy ở cá hồi

C.1 Trình tự cặp mồi

Bảng C.1 – Trình tự cặp mồi ^[1]

Cặp mồi	Trình tự mồi từ đầu 5' tới 3'	Sản phẩm (bp)
Mồi E2F	5'-CCG-TTG-CGG-CCA-CAC-TGG-ATG-3'	516 bp
Mồi E2R	5'-CCT-CAT-AGG-TGA-TCG-ACG-GCA-G-3'	

C.2 Thực hiện phản ứng RT - PCR

Thực hiện phản ứng RT - PCR sử dụng cặp mồi E2F/ E2R

Chuẩn bị dung dịch cho phản ứng sử dụng cặp mồi E2F/ E2R 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/DNA		6
Dung dịch 2x Reaction Mix		12,5
Mồi E2F	20	0,5
Mồi E2R	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	2 min	1
94	15 s	40
55	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 SAV gây bệnh tuyến tụy ở cá hồi

D.1 Trình tự cặp mồi

Bảng D.1 – Trình tự cặp mồi ^[2]

TT	Cặp mồi	Trình tự mồi từ đầu 5' tới 3'
1	Mồi QnsP1F	CCG-GCC-CTG-AAC-CAG-TT
2	Mồi QnsP1R	GTA-GCC-AAG-TGG-GAG-AAA-GCT
3	Đoạn dò QnsP1probe	FAM-CTG-GCC-ACC-ACT-TCG-A-MGB

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 cặp mồi QnsP1F / QnsP1R, đoạn dò QnsP1probe 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
2	Dung dịch 2X reaction mix		12,5
3	Mồi QnsP1F	25	0,5
4	Mồi QnsP1R	25	0,5
5	Đoạn dò QnsP1probe	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 SAV chuẩn.

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.

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.

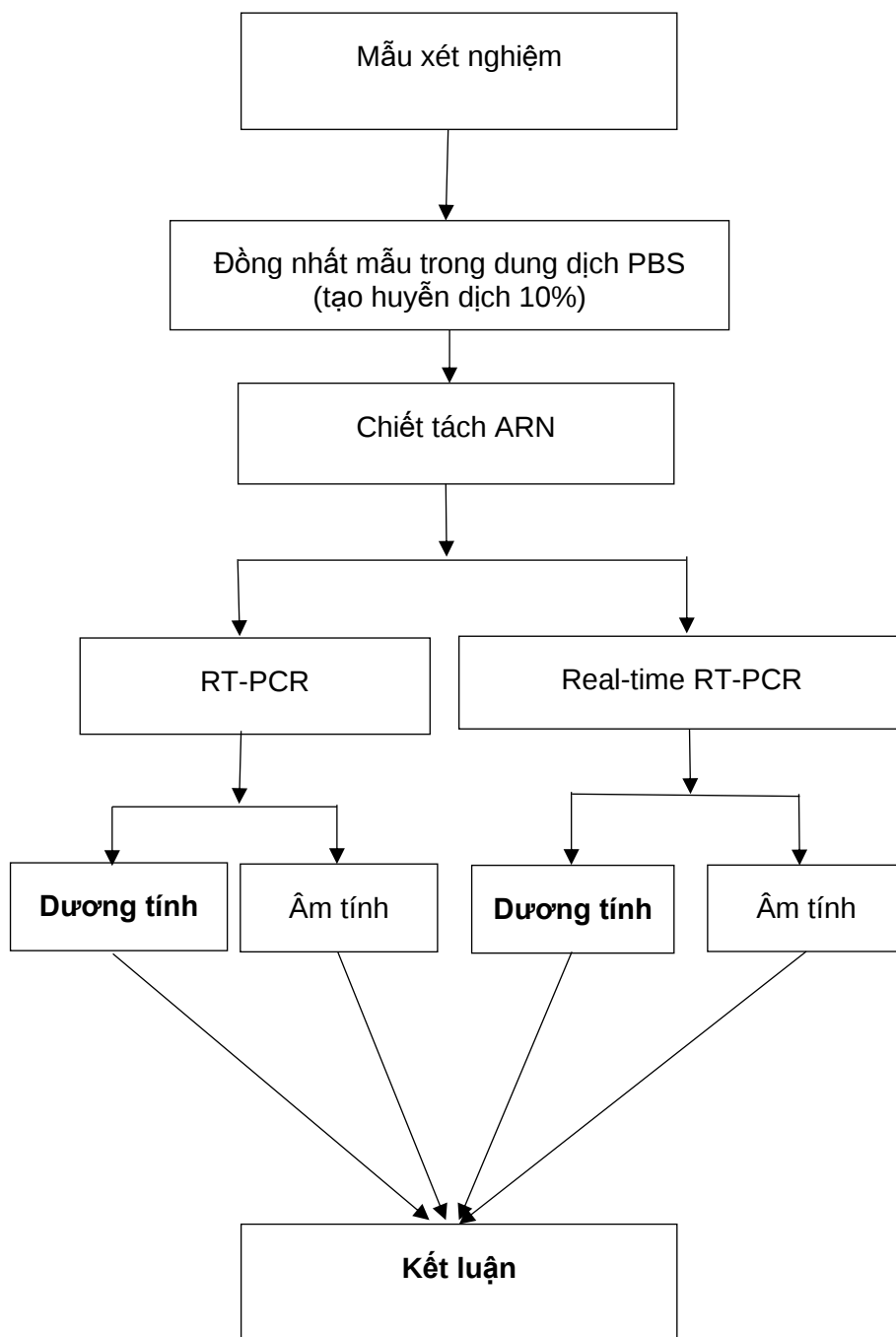
Bảng D.3 – Chu trình nhiệt của phản ứng real-time RT – PCR

Nhiệt độ, °C	Thời gian	Số chu kỳ (vòng)
50	10 min	01
95	01 min	01
95	10 s	40
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 SAV



Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Fringuelli, E., Rowley, H. M., Wilson, J. C., Hunter, R., Rodger, H., & Graham, D. A. (2008). *Phylogenetic analyses and molecular epidemiology of European salmonid alphaviruses (SAV) based on partial E2 and nsP3 gene nucleotide sequences*. Journal of Fish Diseases, 31(11), 811–823.
 - [2] Hodneland K. & Endresen C. (2006). Sensitive and specific detection of salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan). J. Virol. Methods, 131, 184–192.
 - [3] Jansen M.D., Guarracino M., Carson M., Modahl I., Taksdal T., Sindre H., Brun E. & Tavoranpanich S. (2019). Field evaluation of diagnostic test sensitivity and specificity for Salmonid alphavirus (SAV) infection and pancreas disease (PD) in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway using Bayesian latent class analysis. Frontiers Vet. Sci., doi: 10.3389/fvets.2019.00419.
 - [4] Jansen M.D., Taksdal T., Wasmuth M.A., Gjerset B., Brun E., Olsen A.B., Breck O. & Sandberg M. (2010a). Salmonid alphavirus (SAV) and pancreas disease (PD) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in freshwater and seawater sites in Norway from 2006 to 2008. J. Fish Dis., 33, 391–402.
 - [5] Graham D.A., Frost P., Mclaughlin K., Rowley H.M., Gabestad I., Gordon A. & Mcloughlin M.F. (2011). A comparative study of marine salmonid alphavirus subtypes 1–6 using an experimental cohabitation challenge model. J. Fish Dis., 34, 273–286.
 - [6] Kristoffersen A.B., Viljugrein H., Kongtorp R.T., Brun E. & Jansen P.A. (2009). Risk factors for pancreas disease (PD) outbreaks in farmed Atlantic salmon and rainbow trout in Norway during 2003–2007. Prev. Vet. Med., 90, 127–136.
 - [7] WOA, 2023, chapter 1.1.6 Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases, Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.
 - [8] TCCS 14: 2022/TY-TS Bệnh thủy sản – Quy trình chẩn đoán, xét nghiệm – Bệnh tuyến tụy do Salmonid Alphavirus (SAV).
-