

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8710-7 : 2012

Xuất bản lần 1

**BỆNH THỦY SẢN – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 7: BỆNH XUẤT HUYẾT MÙA XUÂN Ở CÁ CHÉP**

*Aquatic animal disease - Diagnostic procedure -
Part 7: Spring viraemia of carp disease*

HÀ NỘI - 2012

Lời nói đầu

TCVN 8710-7:2012 do Cục Thú y biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định. Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bệnh thủy sản – Quy trình chẩn đoán – Phần 7: Bệnh xuất huyết mùa xuân ở cá chép

Aquatic animal disease – Diagnostic procedure –

Part 7: Spring viraemia of carp disease

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 xuất huyết mùa xuân do vi rút ở cá chép.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

Bệnh xuất huyết mùa xuân ở cá chép (Spring viraemia of carp disease)

SVC

Bệnh truyền nhiễm nguy hiểm gây ra bởi vi rút *Rhabdovirus carpio* thuộc họ Rhabdoviridae có vật chất di truyền là RNA mạch đơn (-RNA), thể vi rút dạng hình que, chiều dài 90 nm đến 180 nm, rộng 60 nm đến 90 nm, bộ gen chứa khoảng 11019 nucleotide mã hóa năm loại protein: nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G) và prerin mã hóa enzym RNA polymerase (L).

3 Phương pháp chẩn đoán

3.1 Chẩn đoán lâm sàng

3.1.1 Dịch tễ học

Hầu hết các loài thuộc họ cá chép đều cảm nhiễm với vi rút SVC: cá chép (*Cyprinus carpio carpio*), cá koi (*Cyprinus carpio koi*), cá giếc (*Carassius carassius*), cá mè trắng (*Hypophthalmichthys molitrix*), cá tầu vàng (*Carassius auratus*), cá tenca (*Tinca tinca*), cá mè (*Aristichthys nobilis*), cá trắm cỏ (*Ctenopharyngodon idella*).

Ngoài ra đã phân lập được vi rút gây bệnh SVC từ cá các loài cá khác: cá nheo châu Âu (*Silurus glanis*) và cá hồi sông (*Oncorhynchus mykiss*).

Hầu hết ở các giai đoạn của cá đều có thể bị nhiễm vi rút. Giai đoạn dễ cảm nhiễm nhất với vi rút là cá giống và cá nuôi dưới 1 năm.

Vi rút có thể tồn tại bên ngoài vật chủ 5 tuần ở nước sông tại 10 °C, hơn 6 tuần ở ao nuôi tại 4 °C và 4 tuần tại 10 °C.

Vi rút gây bệnh SVC lây truyền theo trực tiếp thông qua nguồn nước nhiễm vi rút, hoặc từ cá bệnh sang cá khỏe qua chất thải, các dịch sinh sản, qua da hoặc qua các vật trung gian như các loài chim ăn cá, rận ở cá chép (*Argulus foliaceus*) hay đĩa (*Piscicola geometra*) có mang vi rút. Sự lây truyền theo trực tiếp chưa thể xác định mặc dù đã có công bố phân lập được vi rút SVC từ dịch tử cung của cá chép.

Tại Việt Nam, bệnh SVC thường xuất hiện vào cuối đông và đầu mùa xuân, nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển của bệnh là 11 °C đến 17 °C, bệnh hiếm khi xuất hiện ở nhiệt độ dưới 10 °C và tỷ lệ chết cụ thể ở cá trưởng thành giảm khi nhiệt độ lên đến 22 °C. Tỷ lệ chết từ 40 % đến 70 %.

Sự bùng phát bệnh có liên quan lớn đến nhiệt độ, nước, độ tuổi, tình trạng của cá, mật độ nuôi đặc biệt là yếu tố stress của cá.

3.1.2 Triệu chứng lâm sàng

Dấu hiệu bệnh lý đầu tiên là cá bơi ở tầng mặt, mất thăng bằng bơi không định hướng sau đó chết chìm xuống đáy.

Mang và da xuất huyết có thể xuất huyết cả ở mắt. Da có màu tối, những chỗ viêm có nhiều chất nhầy, mắt lồi nhẹ, mang nhợt nhạt, các tơ mang dính kết lại. Máu loãng chảy ra từ hậu môn.

Quan sát cơ quan nội tạng thấy: bụng trương to, trong xoang bụng xuất huyết có dấu hiệu tích nước (phù), bóng hơi xuất huyết và teo dần một ngăn, lá lách sưng to, tim, gan, thận, ruột xuất huyết, xoang bụng có chứa nhiều dịch nhờn.

Trong trường hợp cấp tính, cá không thể hiện dấu hiệu bệnh lý, bệnh xảy ra đột ngột. Tỷ lệ chết cao.

3.2 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm (Phương pháp RT-PCR)

3.2.1 Nguyên tắc

Phương pháp PCR (polymerase chain reaction) dựa trên hoạt động của DNA polymerase tổng hợp nên mạch mới từ mạch khuôn, có sự tham gia của mỗi bốn loại nucleotit gồm adenin (dATP), thymin (dTTP), guanin (dGTP), cytosin (dCTP), dùng để khuếch đại đoạn DNA đích thông qua các chu trình nhiệt. Để thực hiện phản ứng khuếch đại DNA đích cần có 3 quá trình: biến tính, bắt cặp và kéo dài mạch tổng hợp mạch mới.

RT-PCR là phương pháp PCR mà nucleic axit đích là RNA. Để có thể thực hiện được PCR này thì trước hết RNA đích phải được phiên mã ngược (RT- reverse transcription) thành cDNA bằng mỗi đặc hiệu cho phản ứng này.

Giai đoạn phiên mã ngược RT, enzym được sử dụng là Reverse Transcriptase. Đây là một loại enzym không chịu nhiệt, sử dụng mạch RNA là mạch khuôn để tổng hợp nên sợi DNA bổ sung (cDNA) có sự tham gia của mỗi dNTP và dung dịch đệm cho phản ứng.

Có hai phương pháp thực hiện RT-PCR, đó là RT-PCR một bước và RT-PCR hai bước. Trong quy trình này, phương pháp RT-PCR hai bước được thực hiện để khuếch đại RNA đích.

3.2.2 Thuốc thử và vật liệu thử

- Trizol;
- Cloroform;
- Isopropanol;
- Etanol 75 % và 95 %;
- Dung dịch TBE 1X

Chuẩn bị dung dịch đệm TBE đậm đặc 10 lần (Tris - axit boric - EDTA 10X): hòa tan 108 g Tris và 55 g axit boric trong 600 ml nước, thêm 40 mL EDTA 0,5 M và thêm nước cho đủ 1 lít. Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Khi sử dụng, thêm 900 ml nước vào 100 ml dung dịch TBE gốc (10X) thành dung dịch TBE 1X.

- Dung dịch EDTA (etylen diamin tetra axetic) 0,5 M

Hòa tan 93,05 g EDTA trong 350 ml nước, chỉnh đến pH 8,0 bằng dung dịch NaOH 4 M. Thêm nước cho đủ 500 ml. Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

TCVN 8710-7:2012

- Dung dịch DEPC

Dung dịch di-ethylpyrocacbonat 0,1 % thể tích, lắc trộn đều khoảng 10 min. Sau đó để qua đêm trong bình kín, nới lỏng nắp và hấp khử trùng ở 121 °C trong 15 min, bảo quản ở nhiệt độ –20 °C.

- Dung dịch TE (Tris - EDTA)

Chuẩn bị dung dịch chứa Tris [tris (hydroxymetyl) aminometan] 10 mM và EDTA 1 mM, dùng HCl để chỉnh đến pH 7,6.

- AMV RT (Reverse Transcriptase);

- Hỗn hợp phản ứng RT-PCR;

- Dung dịch đệm tải mẫu DNA đậm đặc 6 lần (loading dye 6X)

- Thang chuẩn DNA (DNA marker) gồm có các thang 100 bp; 200 bp; 300bp; 400 bp; 500 bp; 1000 bp; 1500 bp.

- Etidi bromua (EtBr);

CẢNH BÁO AN TOÀN: Etidi bromua là chất độc hại, tránh tiếp xúc và tránh hít phải hơi từ dung dịch còn nóng có chứa EtBr, sử dụng găng tay và mặc áo bảo hộ lao động trong suốt thời gian tiếp xúc với EtBr.

- Gel agarose.

3.2.3 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm chẩn đoán bệnh và cụ thể như sau:

- Tủ lạnh.
- Tủ lạnh âm sâu, có thể hoạt động ở nhiệt độ –20 °C;
- Máy li tâm, có thể hoạt động với gia tốc 13 000 g;
- Nồi cách thủy hay block nhiệt khô, có thể hoạt động ở nhiệt độ 95 °C;
- Máy lắc trộn vortex;
- Cân phân tích có thể cân chính xác đến 0,1 mg;
- Micropipet đơn kênh có dải từ 0,5 µl đến 10 µl, từ 2 µl đến 20 µl, từ 10 µl đến 100 µl, từ 100 µl đến 1000 µl;

- Giá Eppendorf có kích thước 0,2 ml và 1,5 ml;
- Máy luân nhiệt (máy PCR);
- Bếp điện hoặc lò vi sóng;
- Ống đông, dung tích 100 ml; 500 ml; 1000 ml;
- Bình nón chịu nhiệt, dung tích 250 ml;
- Bộ điện di gồm bộ nguồn và máng chạy điện di;
- Buồng đổ gel;
- Bàn đọc gel (UV);
- Giấy parafin.

3.2.4 Lấy mẫu

Chọn những cá thể có dấu hiệu bệnh lý như mô tả ở trên.

Cá bột: lấy cả con (20 con).

Cá giống: từ 1 con đến 5 con, lấy thận, lấy phần trước của đầu (20 con).

Cá lớn: lấy gan, thận, não (5 con)

Lượng mẫu lấy để tách chiết RNA khoảng 20 mg, có thể dùng cá còn sống, tiến hành làm ngay hoặc mẫu cố định trong etanol 95 %.

3.2.5 Cách tiến hành

3.2.5.1 Tách chiết RNA

CHÚ THÍCH: Có nhiều quy trình tách chiết RNA từ mô động vật theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hiện nay có rất nhiều các thuốc thử và bộ kit thương mại hữu ích cho việc tách chiết RNA...). Người sử dụng có thể lựa chọn bộ kit thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phương pháp tách chiết RNA bằng trizol:

Cho 20 mg mẫu vào ống Eppendorf 1,5 ml. Nếu mẫu được cố định trong etanol 95 %, cần làm khô etanol bằng cách đổ etanol và dốc ngược trên tờ giấy lọc, để khô tự nhiên.

Cho vào ống Eppendorf có chứa mẫu khoảng 100 µl đến 200 µl dung dịch trizol (lượng mẫu không quá 10 % trizol).

TCVN 8710-7:2012

Nghiền nhỏ và mịn bằng chày nghiền, sau đó thêm vào khoảng 550 µl đến 650 µl dung dịch trizol và nghiền tiếp đến khi nhuyễn. Giữ ở nhiệt độ phòng đến 5 min.

Ly tâm 12000 g trong thời gian 10 min, sau đó chuyển dịch trong sang ống Eppendorf mới, nhỏ thêm 150 µl cloroform. Lắc cẩn thận bằng tay trong 15 s.

Ủ 15 °C đến 30 °C từ 2 min đến 3 min.

Ly tâm 12000 g từ 2 °C đến 8 °C trong 15 min, sau đó chuyển phần trong phía trên sang ống Eppendorf 1,5 ml mới.

Thêm 375 µl dung dịch isopropanol, ủ ở 15 °C đến 30 °C trong 10 min.

Ly tâm 12000 g tại 4 °C trong 10 min, sau đó rút bỏ isopropanol.

Rửa phần viên bằng 750 µl etanol 75 %.

Trộn đều bằng máy vortex và ly tâm ở 7500 g trong 5 min ở 4 °C, sau đó rút bỏ etanol. Làm khô phần viên.

Hòa tan RNA bằng nước tinh khiết hoặc DEPC (diethyl pyrocarbonat) với lượng khoảng từ 50 µl đến 100 µl tùy thuộc vào lượng RNA tách chiết được.

CẢNH BÁO: Việc tách chiết RNA 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 hòa chất này. Luôn luôn đeo gang tay, khẩu trang, mặc quần áo bảo hộ khi thực hiện các thao tác này.

3.2.5.2 Tiến hành phản ứng PCR

3.2.5.2.1 Cặp mồi sử dụng trong phản ứng RT-PCR

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy luân nhiệt theo phương pháp RT-PCR hai bước khuếch đại đoạn gen đặc hiệu mã hóa cho glycoprotein của vi rút SVC sử dụng cặp mồi SVC R2/SVC F1 và cặp mồi SVC F1/SVC R4 (xem Bảng 1).

Bảng 1 – Trình tự các cặp mồi

Mồi	Trình tự nucleotit
SVC F1	5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR-RTC-3'
SVC R2	5'-AGA-TGG-TAT-GGA-CCC-CAA-TAC-ATH-CAN-CAY-3'
SVC R4	5'-CTG-GGG-TTT-CCN-CCT-CAA-AGY-TGY-3'

Chuẩn bị môi:

- Môi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm ngắn để môi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Lần đầu tiên nên dùng đệm TE để hoàn nguyên môi ở nồng độ 200 pmol/μl làm gốc.
- Môi được sử dụng ở nồng độ 20 pmol/μl: pha loãng môi gốc bằng nước không có nuclease (10 μl môi gốc và 90 μl nước).

3.2.5.2.2 Chuẩn bị phản ứng

Tùy theo điều kiện phòng thí nghiệm chọn lựa hỗn hợp Mix phản ứng cho phù hợp và sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Hỗn hợp phản ứng giai đoạn phiên mã ngược, bước 1 và bước 2 được chuẩn bị trong 1 ống Eppendorf dựa trên tổng số mẫu cần chẩn đoán, cộng thêm một mẫu đối chứng dương và một mẫu đối chứng âm, trộn chung vào một ống Eppendorf.

3.2.5.2.3 Tiến hành phản ứng RT-PCR bước 1

Giai đoạn phiên mã ngược (tạo cDNA)

Giai đoạn phiên mã ngược được thực hiện trong 1 h ở 37 °C. Thể tích hỗn hợp phản ứng 20 μl có thành phần dung dịch đệm như sau: 1 X dung dịch M-MLV RT buffer hai bước (Two-Step MMLV RT-PCR Kit) bao gồm (Tris 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, KCl 10 mM, DTT 10 mM, MgCl₂ 3 mM) và mỗi dNTP có nồng độ 1 mM, mỗi R2 có nồng độ 1 μM, 20 đơn vị enzym M-MLV reverse transcriptase và 2,5 μl RNA mạch khuôn được tách chiết ở trên.

Ví dụ về hỗn hợp phản ứng sử dụng Two-Step MMLV RT-PCR Kit của hãng AllianceBio, xem Bảng 2:

Bảng 2 – Hỗn hợp phản ứng giai đoạn phiên mã ngược sử dụng kit Two-Step MMLV RT-PCR

Thành phần	Thể tích cho 1 mẫu, μl	Nồng độ cuối cùng
10X First Strand Buffer	2	1 X
MMLV RT (100 U/μl)	0,2	20 U
Mỗi R2 (20 μM)	5	5 μM
dNTP (12,5 mM)	1,6	1 mM
RNA mạch khuôn	2,5	
Nước	8,7	

Sản phẩm cDNA tổng hợp được sử dụng cho phản ứng RT-PCR.

Phản ứng RT-PCR (bước 1)

Hỗn hợp phản ứng RT-PCR: hỗn hợp dung dịch đệm RT-PCR bao gồm (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 9,0 và Triton X-100 0,1 %); $MgCl_2$ 2,5 mM, mỗi dNTP có nồng độ 200 μ M, 25 pmol mỗi R2, F1 có nồng độ 1 μ M, 0,625 U Taq DNA polymerase, 2,5 μ l sản phẩm cDNA ở trên và nước sao cho đủ thể tích 25 μ l hỗn hợp phản ứng.

Có thể sử dụng thành phần thuốc thử riêng lẻ hay sử dụng hỗn hợp phản ứng thương mại sao cho đảm bảo nồng độ cuối cùng của các thành phần như trên, ví dụ sử dụng hỗn hợp phản ứng Go Taq Green Master Mix của Promega, 2X có thành phần 2X green Go Taq Reaction Buffer (pH 8,5); dNTP 400 μ M; $MgCl_2$ 3 mM; Taq DNA polymerase, và chất đệm tải mẫu (yellow dye và blue dye) nên khi chạy gel không cần thêm chất đệm tải mẫu (loading dye).

Ví dụ về hỗn hợp phản ứng RT-PCR bước 1, sử dụng hỗn hợp phản ứng Go Taq Green Master Mix của Promega, 2X như trong Bảng 3.

Bảng 3 – Ví dụ hỗn hợp phản ứng RT-PCR bước 1

Thành phần	Thể tích cho 1 mẫu, μ l	Nồng độ cuối cùng
Promega Gotag Green Master Mix, 2X	12.5	1 X
Mỗi F1 (20 μ M)	1,25	1 μ M
Mỗi R2 (20 μ M)	1,25	1 μ M
Nước	7,5	
Sản phẩm cDNA	2.5	

Sau khi pha hỗn hợp cho mỗi phản ứng đặt vào máy luân nhiệt.

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR bước 1 được nêu trong Bảng 4.

Bảng 4 – Chu trình nhiệt của phản ứng RT-PCR bước 1

Bước	Nhiệt độ/thời gian	Số chu kỳ
Biến tính	95 °C/1 min	30
Bắt cặp	55 °C/1 min	
Tổng hợp	72 °C/1 min	
Kéo dài mạch	72 °C/10 min	
Giữ ổn định	4 °C	Giữ ổn định

3.2.5.2.4 Tiến hành phản ứng RT-PCR bước 2

Thêm 2,5 µl mạch khuôn (sản phẩm bước 1) vào ống PCR chứa sẵn 22,5 µl hỗn hợp phản ứng thành phần gồm như sau: 1 × PCR (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 9 và Triton X-100 nồng độ 0,1 %); MgCl₂ 2,5 mM, mỗi dNTP có nồng độ 200 µM, mỗi R4 nồng độ 1 µM, mỗi F1 nồng độ 1 µM, 0,625 U Taq DNA polymerase) để được hỗn hợp PCR với tổng thể tích 25 µl.

Có thể sử dụng thành phần hóa chất riêng lẻ hay sử dụng hỗn hợp phản ứng thương mại vẫn đảm bảo nồng độ cuối cùng của các thành phần như trên sử dụng cặp mỗi SVC R2 và SVC F1. Ví dụ hỗn hợp phản ứng sử dụng hỗn hợp phản ứng Go Taq Green Master Mix của Promega, 2X có thành phần 2X green Go Taq Reaction Buffer (pH 8,5); 400 µM mỗi dNTP; MgCl₂ 3 mM, Taq DNA polymerase và chất đệm tải mẫu (yellow dye và blue dye) nên khi chạy gel không cần thêm chất đệm tải mẫu (loading dye).

Ví dụ về hỗn hợp phản ứng bước 2, sử dụng hỗn hợp phản ứng Go Taq Green Master Mix của Promega 2X như trong Bảng 5.

Bảng 5 – Hỗn hợp phản ứng RT-PCR bước 2

Thành phần	Thể tích cho 1 mẫu, µl	Nồng độ cuối cùng
Promega Go Taq Green Master Mix, 2X	12,5	1 X
Mỗi R4 (20 µM)	1,25	1 µM
Mỗi F1 (20 µM)	1,25	1 µM
Sản phẩm PCR bước 1	2,5	
Nước	7,5	

Sau khi pha hỗn hợp cho mỗi phản ứng đặt vào máy luân nhiệt. Chu trình nhiệt của phản ứng RT-PCR bước 2 được nêu trong Bảng 6.

Bảng 6 – Chu trình nhiệt của phản ứng PCR bước 2

Bước	Nhiệt độ/thời gian	Số chu kỳ
Biến tính	95 °C/1 min	30
Bắt cặp	55 °C/1 min	
Tổng hợp	72 °C/1 min	
Kéo dài mạch	72 °C/10 min	
Giữ ổn định	4 °C	Giữ ổn định

CHÚ Ý: 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.

CẢNH BÁO: Do bản chất của RNA là rất dễ bị phân huỷ trong môi trường cũng như enzym RNAase tiết ra từ các vi sinh vật, môi trường chai, lọ, thiết bị, dụng cụ và dung dịch. Enzym RNAase rất bền, khó bị phân huỷ bởi nhiệt độ. Vì vậy, tất cả mọi dụng cụ, thiết bị, thuốc thử dùng trong RT-PCR phải tuyệt đối vô trùng.

3.2.5.3 Chạy điện di

3.2.5.3.1 Chuẩn bị bản gel

Pha thạch nồng độ từ 1,5 % đến 2 % agarose bằng dung dịch đệm TBE 1X hoặc TAE 1X vào bình nón 250 ml, lắc cho tan.

Sau đó cho vào lò vi sóng đun đến sôi, đợi đến khi nhiệt độ giảm xuống khoảng 40 °C đến 50 °C, cho vào 5 µl etidi bromua/100 ml. Lắc nhẹ tránh tạo bọt để etidi bromua tan đều.

Chuẩn bị khuôn đổ thạch, đặt lược vào khuôn, rồi đổ thạch vào khuôn.

Tiến hành đổ vào bản gel (chú ý không nên đổ bản gel dày quá 0,8 cm).

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

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

3.2.5.3.2 Điện di

Hút 10 µl sản phẩm RT-PCR nhỏ vào một giếng trên bản gel.

Khi thực hiện điện di, chạy kèm theo DNA marker để dự đoán kích thước sản phẩm khuếch đại. Hút 10 µl thang DNA vào một giếng trên bản gel.

Điện di ở hiệu điện thế 100 V đến 150 V (quan sát thấy bóng khí nổi lên từ hai phía điện cực của máy điện di sau khi nối điện). Khi quan sát thấy màu xanh đậm của thuốc nhuộm cách giếng khoảng 2/3 chiều dài bảng thạch agarose, dừng quá trình điện di.

CHÚ Ý: Trong trường hợp Master Mix không có sẵn đệm tải mẫu thì khi tiến hành điện di nhỏ 2 µl đệm tải mẫu 6X lên giấy parafin, hút 10 µl sản phẩm PCR ra, nhỏ vào và trộn đều, sau đó lấy khoảng 10 µl nhỏ vào một giếng trên bản gel.

3.2.5.4 Đọc kết quả

Sau khi điện di xong, đọc kết quả trên bàn đọc UV, đọc kết quả với tia UV bước sóng 302 nm.

Đối chiếu các vạch sáng của mẫu với các vạch sáng từ thang DNA, mẫu đối chứng dương tính và mẫu đối chứng âm tính để đưa ra kết luận.

Bảng 7 – Kết quả điện di

Giếng	Vạch 714 bp	Vạch 606 bp	Kết quả
Thang DNA	Phân vạch rõ ràng và sáng theo kích thước sử dụng		Điện di tốt
Mẫu đối chứng dương	Có	Có	Hỗn hợp phản ứng RT-PCR tốt
	Không	Có	Đạt yêu cầu
	Không	Không	Mẫu đối chứng dương tính hỏng, enzym hỏng
	Có	Không	Không đạt yêu cầu
Mẫu đối chứng âm tính	Không	Không	Không ngoại nhiễm
	Có	Có	Bị ngoại nhiễm
	Có	Không	
	Không	Có	
Mẫu	Có	Có	Dương tính với SVC
	Không	Có	Dương tính với SVC
	Không	Không	Âm tính với SVC
	Có	Không	Không chấp nhận kết quả. Phân tích lại mẫu

Kết quả mẫu thử dương tính khi: Xuất hiện vạch sáng có kích thước bằng kích thước giống mẫu đối chứng dương có kích thước 606 bp, thang DNA phân vạch rõ ràng, mẫu đối chứng âm không có vạch sáng.

Kết quả mẫu thử âm tính khi: Không có vạch sáng kích thước 606 bp. Không có vạch sáng của mẫu đối chứng âm tính, có vạch sáng mẫu đối chứng dương tính. Thang DNA phân vạch rõ ràng.

4 Báo cáo kết quả chẩn đoán

Cá được xác định bị nhiễm bệnh SVC khi có đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng của bệnh và kết quả phản ứng RT-PCR phát hiện vi rút dương tính.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Alikin Y.S., Shchelkunov I.S., Shchelkunova T.I., Kupinskaya O.A., Masysheva V.I., Klimenko V.P. & Fadina V.A. 1996. *Prophylactic treatment of viral diseases in fish using native RNA linked to soluble and corpuscular carriers*. J. Fish Biol., **49**, 195–205.
 - [2] Bùi Quang Tề và cộng sự. 2008., *Bệnh học thủy sản*.
 - [3] Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals. 2010.
 - [4] Magdy K.Soliman, Mohammed M. Aboeisa, Safinaz G. Mohamed, Walid D. Saleh. 2008. *First record of isolation and identification of Spring of carp virus from Oreochromis niloticus in Egypt*, 1294-1300.
 - [5] Stone D.M., Ahne W., Denham K.D., Dixon P.F., Liu C.T.Y., Sheppard A.M., Taylor G.R. & Way K. 2003. *Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups*. Dis. Aquat. Org., **53**, 203-210.
 - [6] Békési I. & Csontos L. (1985). *Isolation of spring viraemia of carp virus from asymptomatic broodstock carp, Cyprinus carpio L.* J. Fish Dis., **8**, 471–472
-