

HDSĐ BỘ Ready EHP Screening KIT REAL-TIME PCR

1. Giới thiệu chung

Bộ **Ready EHP Screening KIT** được sử dụng để phát hiện tác nhân gây bệnh **EHP** bằng kỹ thuật Real-time PCR.

Nguyên lý hoạt động

- DNA đặc hiệu trên vi bào tử trùng *Enterocytozoon hepatopenaei* gây bệnh EHP được khuếch đại đặc hiệu bằng primer/probe.
- Tín hiệu huỳnh quang phát ra trong quá trình khuếch đại được ghi nhận theo thời gian thực.
- Giá trị Ct (Cycle threshold) sử dụng để xác định sự có mặt của tác nhân mục tiêu.

2. Thành phần bộ KIT

Thành phần	Mô tả	Bảo quản
Tube Ready EHP Screening KIT	Taq polymerase, dNTPs, primer forward, primer reverse, Probe (FAM)	-20°C
Buffer PCR 1X	Buffer hòa tan các thành phần trong tube Ready EHP Screening KIT	-20°C
Positive control (PC)	Mẫu chứng dương	-20°C
Negative control (NC)	Nước không chứa nuclease	2-8°C

3. Phương pháp tiến hành

3.1. Chuẩn bị trước phản ứng

- Rã đông toàn bộ hóa chất
- Tube Ready EHP Screening KIT ly tâm nhanh 5 giây trước khi sử dụng
- Buffer PCR 1X vortex nhẹ và ly tâm nhanh trước khi sử dụng
- Chuẩn bị:
 - NC (Negative Control)
 - PC (Positive Control) vortex nhẹ và ly tâm nhanh trước khi sử dụng
- Làm việc trong tủ sạch (nếu có) để tránh nhiễm chéo

3.2. Chuẩn bị mix phản ứng

Thành phần	Thể tích hút cho một phản ứng
Tube Ready EHP Screening KIT	1 tube
Buffer PCR 1X	35 μ L
Tổng thể tích (chưa bơm mẫu)	35 μ L

3.3. Bơm mẫu

Loại mẫu	Thể tích
Mẫu thử	5 μ L
Chứng dương (PC)	5 μ L
Chứng âm (NC)	5 μ L

3.4. Chu kỳ nhiệt

Đặt các mẫu đã chuẩn bị vào máy Real-time và cài đặt chu trình nhiệt^(*) như sau:

Bước	Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ
Biến tính ban đầu (Initial Denaturation)	93°C	10 phút	1
Biến tính (Denaturation)	93°C	15 giây	40-45
Bắt cặp (Annealing) và kéo dài (Extension)	66°C	30 giây	

3.5. Khai báo kênh màu

Target	Kênh huỳnh quang
EHP	FAM

4. Phân tích kết quả

4.1. Kiểm tra đối chứng

Đối chứng	Kết quả mong đợi
NC (âm tính)	Không có tín hiệu (Ct không xác định)
PC (dương tính)	Có tín hiệu rõ ràng (Ct trong khoảng <27)

🚩 Nếu đối chứng không đạt → kết quả không hợp lệ

4.2. Diễn giải kết quả mẫu

Ct	Kết luận
$Ct < 35$	Dương tính
$Ct 35 - 37$	Nghi ngờ
$Ct \geq 38$ hoặc không Ct	Âm tính

Lưu ý quan trọng

- Tránh nhiễm chéo giữa các mẫu.
- Luôn có NC và PC trong mỗi lần chạy.
- Không sử dụng hóa chất quá hạn hoặc rã đông nhiều lần.
- Đảm bảo pipet chính xác.