

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8710-13:2015

Xuất bản lần 1

**BỆNH THỦY SẢN - QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN -
PHẦN 13: BỆNH GAN TỤY DO PARVOVIRUS Ở TÔM**

*Aquatic animal disease - Diagnostic procedure -
Part 13: Hepatopancreatic parvovirus disease in shrimp*

HÀ NỘI - 2015

Lời nói đầu

TCVN 8710-13:2015 được xây dựng trên cơ sở tham khảo OIE (2007), *Manual of diagnostic tests for aquatic animals Hepatopancreatic parvovirus disease*

TCVN 8710-13:2015 do Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương - 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.

Bộ **TCVN 8710 Bệnh thủy sản** - quy trình chẩn đoán gồm 15 phần:

- TCVN 8710-01 : 2011, *phần 1: Bệnh Còi do vi rút ở tôm;*
- TCVN 8710-02 : 2011, *phần 2: Bệnh Hoại tử thần kinh ở cá biển;*
- TCVN 8710-03 : 2011, *phần 3: Bệnh Đốm trắng ở tôm;*
- TCVN 8710-04 : 2011, *phần 4: Bệnh Đầu vàng ở tôm;*
- TCVN 8710-05 : 2011, *phần 5: Bệnh Taura ở tôm He;*
- TCVN 8710-06 : 2012, *phần 6: Bệnh do Koi herpesvirus ở cá chép;*
- TCVN 8710-07 : 2012, *phần 7: Bệnh xuất huyết mùa xuân ở cá chép;*
- TCVN 8710-08 : 2012, *phần 8: Bệnh hoại tử cơ ở tôm;*
- TCVN 8710-09 : 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 : 2015, *phần 12: Bệnh do 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 ở cá.*

Bệnh thủy sản - Quy trình chẩn đoán - Phần 13: Bệnh gan tụy do *Parvovirus* ở tôm

Aquatic animal diseases - Diagnostic procedure -

Part 13: Hepatopancreatic parvovirus disease in shrimp

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 gan tụy do *Parvovirus* (HPV) ở tôm.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1

Bệnh gan tụy do *Parvovirus* ở tôm (*Hepatopancreatic parvovirus disease*).

Bệnh do vi rút thuộc nhóm *Parvovirus* ký sinh trong nhân tế bào gan tụy và biểu bì ruột trước của tôm, làm nhân sưng to và gây hoại tử tế bào vật chủ.

CHÚ THÍCH: Tác nhân gây bệnh gan tụy ở tôm là vi rút thuộc nhóm *Parvovirus*, cấu trúc axit nhân là ADN, là vi rút có kích thước nhỏ, hình cầu, đường kính từ 22 nm đến 24 nm. Cấu trúc không có màng bao, có 20 mặt, không có thể ẩn (occlusion body), có thể vùi (inclusion body).

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.

TCVN 8710-13 : 2015

3.1 Thuốc thử và vật liệu thử dùng chung

3.1.1 Etanol 70 % (thể tích), 90 % (thể tích) và etanol tuyệt đối.

3.2 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phương pháp chẩn đoán bằng PCR.

3.2.1 Cặp mồi (primers) gồm mồi xuôi và mồi ngược.

3.2.2 Agarose.

3.2.3 Dung dịch đệm TAE (Tris-borate – EDTA) hoặc TBE (Tris-acetate – EDTA) (xem A.1).

3.2.4 Chất nhuộm màu, ví dụ: Sybr safe.

3.2.5 Chất đệm tải mẫu (Loading dye 6X).

3.2.6 Dung dịch đệm TE (Tris-EDTA).

3.2.7 Thang chuẩn ADN (Marker).

3.2.8 Nước tinh khiết, không có nuclease.

3.2.9 Kit nhân gen (PCR Master Mix Kit).

3.2.10 Kit tách chiết ADN (acid deoxyribo nucleic), protein K.

3.3 Thuốc thử và vật liệu dùng cho phương pháp kiểm tra bệnh tích vi thể bằng parafin.

3.3.1 Formalin 10 %, được chuẩn bị từ dung dịch formaldehyde 38 % và dung dịch muối đệm phosphat (PBS) (tỷ lệ thể tích 1 : 9).

3.3.2 Xylen.

3.3.3 Dung dịch Davidson (xem A.2).

3.3.4 Thuốc nhuộm Haematoxylin (xem A.3).

3.3.5 Thuốc nhuộm Eosin (xem A.4).

3.3.6 Parafin, có độ nóng chảy từ 56 °C đến 60 °C.

3.3.7 Keo dán lamen.

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 cho phương pháp chẩn đoán bằng PCR.

4.1.1 Máy nhân gen (PCR).

4.1.2 Máy ly tâm, có thể ly tâm với gia tốc 6 000 g và 20 000 g

4.1.3 Máy lắc trộn vortex.

4.1.4 Máy spindown.

4.1.5 Bộ điện di, gồm bộ nguồn và bể chạy điện di.

4.1.6 Máy đọc gel.

4.2 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp kiểm tra bệnh tích vi thể bằng parafin.

4.2.1 Khuôn nhựa, loại chuyên dụng cho làm tiêu bản vi thể.

4.2.2 Máy xử lý mẫu mô tự động.

4.2.3 Nồi đun parafin, có thể duy trì nhiệt độ từ 56 °C đến 65 °C.

4.2.4 Khay sắt, loại chuyên dụng cho làm tiêu bản vi thể.

4.2.5 Máy làm lạnh tiêu bản, có thể duy trì nhiệt độ từ âm 10 °C đến 4 °C.

4.2.6 Máy cắt tiêu bản, cắt ở độ mỏng từ 3 µm đến 5 µm.

4.2.7 Nồi đun tiêu bản, có thể duy trì nhiệt độ từ 35 °C đến 65 °C.

4.2.8 Phiến kính, vô trùng.

4.2.9 Lamen, vô trùng.

4.2.10 Kính hiển vi quang học, vật kính 10 X, 20X, 40 X và 100 X.

5 Chẩn đoán lâm sàng

5.1 Đặc điểm dịch tễ.

Bệnh gan tụy do HPV gây ra cho tôm nuôi và tôm tự nhiên có thể xảy ra quanh năm ở khắp các vùng nuôi tôm.

TCVN 8710-13 : 2015

CHU THÍCH: Bệnh gan tụy do HPV thường xảy ra ở các nước như: China, Korea, Taiwan, Thailand, Singapore, Malaysia, Indonesia, the Philippines, Australia, Kenya, Madagascar, Israel, Kuwait, Mexico, Honduras, El Salvador, Colombia, Ecuador, Peru, and Brazil.

Tôm nhiễm bệnh ở giai đoạn ấu trùng và tôm giống với tỷ lệ nhiễm cao.

Tỷ lệ chết từ 50 % đến 100 % số tôm trong ao nuôi.

Bệnh gan tụy do HPV lây truyền chủ yếu theo trục dọc từ tôm bố mẹ sang đàn con, một số ít lây nhiễm theo trục ngang từ con này sang con khác.

5.2 Triệu chứng lâm sàng.

Tôm nhiễm bệnh gan tụy do HPV thường không có dấu hiệu đặc thù, bỏ ăn hoặc ít ăn, sinh trưởng chậm, hoạt động yếu và dễ bị nhiễm các sinh vật cơ hội bám trên mang, vỏ và các phần phụ, hệ cơ bụng đục mờ;

Bệnh thường xảy ra với tôm nuôi thương phẩm (từ tháng thứ 3 đến tháng thứ 4).

Tôm nhiễm bệnh có dấu hiệu bỏ ăn, hoạt động chậm chạp, thải phân trắng và chết rải rác.

5.3 Bệnh tích.

Gan tụy của tôm nhiễm HPV bị teo lại hoặc hoại tử và có màu trắng nhợt.

6 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

6.1 Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction).

6.1.1 Lấy mẫu.

- Thu mẫu tôm có dấu hiệu bệnh lý, còn sống hoặc vừa mới chết.
- Bệnh phẩm: Tôm nguyên con hoặc khối gan tụy.
- Số lượng tôm trên mỗi mẫu phụ thuộc vào kích cỡ của tôm:
 - + Tôm giống: lấy từ 5 con/mẫu đến 10 con/mẫu;
 - + Tôm trưởng thành, tôm bố mẹ: lấy từ 3 con/mẫu đến 5 con/mẫu.
- Lấy mẫu mỗi loại bệnh phẩm, cho vào từng lọ hay túi nilon vô trùng riêng biệt, đậy kín, thao tác lấy mẫu, dụng cụ đựng mẫu và tiếp xúc với mẫu phải đảm bảo vô trùng.

6.1.2 Bảo quản mẫu.

Trong quá trình vận chuyển, mẫu được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C không quá 24 h hoặc bảo quản trong etanol tuyệt đối (3.1.1).

Mẫu chuyển đến phòng thí nghiệm nếu chưa phân tích ngay phải được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C đến âm 80 °C hoặc trong etanol tuyệt đối (3.1.1).

6.1.3 Chuẩn bị mẫu.

Bệnh phẩm: tôm giống và hậu ấu trùng sử dụng nguyên con,

Bệnh phẩm: tôm bố mẹ, tôm thương phẩm dùng phanh, kéo vỏ trùng cắt lấy một phần khối gan tụy.

Lượng mẫu cần chuẩn bị: khoảng 30 mg.

6.1.4 Cách tiến hành.

6.1.4.1 Tách chiết ADN.

Sử dụng bộ kit thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

VÍ DỤ: Sử dụng quy trình tách chiết ADN bằng protein K và kit tách chiết bằng cột lọc của Qiagen (xem Phụ lục B)¹⁾.

6.1.4.2 Chuẩn bị mẫu.

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy nhân gen (4.1.1) theo phương pháp PCR khuếch đại đoạn gen đặc hiệu của bệnh hoại tử gan tụy sử dụng cặp mồi H441F/ H441R) (3.2.1). Trình tự cặp mồi được nêu trong bảng 1.

Bảng 1 : Trình tự cặp mồi

Mồi	Trình tự cặp mồi
H441F	5'-GCATTACAAGAGCCAAGCAG-3'
H441R	5'-ACACTCAGCCTCTACCTTGT- 3'

Cặp mồi H441F/ H441R dùng để khuếch đại đoạn của gen HPV có kích thước 441 bp.

Mồi được chuẩn bị như sau:

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.

Chuẩn bị môi gố:

- Môi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.1.4) ở gia tốc 6 000g trong 30 s để môi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Khi hoàn nguyên, nên dùng đệm TE (3.2.6) để hoàn nguyên môi ở nồng độ 200 μ M làm môi gố

Quan ở môi sử dụng

- Môi sử dụng ở nồng độ 20 μ M: pha loãng môi gố bằng nước (3.2.8) (10 μ l môi gố và 90 μ l nước).

6.1.4.3 Tiến hành phản ứng PCR.

Sử dụng cặp môi đã chuẩn bị (6.1.4.2) sử dụng kit nhân gen (3.2.9) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví DỤ: Sử dụng kit nhân gen của Thermo Scientific Dream Tag PCR Master Mix (2X) (Lot: 00316656) ²⁾

Thành phần cho 1 phản ứng được nêu trong bảng 2

Bảng 2: Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích
Taq PCR Master Mix Kit	12,5 μ l
Môi xuôi 20 μ M	1 μ l
Môi ngược 20 μ M	1 μ l
Nước không có nuclease	8 μ l
Tổng thể tích	22,5 μ l

Chuyển 22,5 μ l hỗn hợp nhân gen vào mỗi ống phản ứng:

- Mẫu kiểm chứng dương: Cho 2,5 μ l mẫu ADN đã được giám định hoặc sử dụng các chủng *Aphanomyces invadans* chuẩn vào ống phản ứng;
- Mẫu kiểm chứng âm: Cho 2,5 μ l nước (3.2.8) vào ống phản ứng;
- Mẫu thử: Cho 2,5 μ l mẫu ADN kiểm tra vào ống phản ứng.

²⁾ 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.

Tiến hành phản ứng PCR bằng máy nhân gen (4.1.1) đã cài đặt chu trình nhiệt và được nêu trong bảng 3.

Bảng 3 : Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
95 °C	5 min	1
95 °C	1 min	35
60 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	1

CHÚ THÍCH:

- Phản ứng PCR phải bao gồm: mẫu thử, mẫu kiểm chứng dương và mẫu kiểm chứng âm;
- Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

6.1.4.4 Điện di.

6.1.4.4.1 Chuẩn bị bản gel.

Pha thạch với nồng độ agarose (3.2.2) từ 1,5 % đến 2 % bằng dung dịch đệm TBE 1X hoặc TAE 1X (3.2.3) 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 (3.2.4) cho 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;

Chuyển bản gel vào bể điện di (4.1.5), đổ dung dịch đệm (3.2.3) cùng loại với dung dịch pha thạch 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 ADN gel stain³⁾) và sử dụng theo quy định của nhà sản xuất.

6.1.4.4.2 Chạy điện di.

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.

TCVN 8710-13 : 2015

Hút 2 µl chất đệm tải mẫu (3.2.5) vào 8 µl sản phẩm PCR trộn đều và cho vào các giếng trên bản thạch.

Thực hiện điện di trong bộ điện di (4.1.5), 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.

6.1.4.5 Đọc kết quả.

Sau khi điện di, đọc kết quả trên máy đọc gel (4.1.6) theo bảng 4.

Bảng 4 : Kết quả điện di

Giếng	Sản phẩm có kích thước 441 bp	Kết quả
Thang chuẩn	Sáng và chia vạch rõ ràng	Điện di tốt
Mẫu kiểm chứng dương tính	Có	Hỗn hợp phản ứng PCR tốt
	Không	Mẫu kiểm chứng dương tính hỏng hoặc enzym hỏng
Mẫu kiểm chứng âm tính	Không	Không bị tạp nhiễm
	Có	Bị tạp nhiễm
Mẫu thử	Có	Dương tính với HPV
	Không	Âm tính với HPV

Đánh giá kết quả:

- Kết quả mẫu thử dương tính khi: tại giếng mẫu thử xuất hiện vạch sáng có kích thước 441 bp, thang chuẩn ADN phân vạch rõ ràng, mẫu kiểm chứng dương có kích thước 441 bp, mẫu kiểm chứng âm không có vạch sáng.
- Kết quả mẫu thử âm tính khi: tại giếng mẫu thử không có vạch sáng, thang chuẩn ADN phân vạch rõ ràng, mẫu kiểm chứng dương tính có vạch sáng 441 bp, mẫu kiểm chứng âm tính không có vạch sáng.

6.2 Phương pháp kiểm tra bệnh tích vi thể bằng phương pháp parafin.

6.2.1 Lấy mẫu.

Xem 6.1.1.

6.2.2 Bảo quản mẫu.

– Mẫu bệnh phẩm được đảm bảo ngập trong Davidson (3.3.3) đảm bảo thể tích mẫu bệnh phẩm và Davidson (3.3.3) đạt tỷ lệ khoảng 1 : 10 tránh đổ vỡ; rơi vãi Davidson (3.3.3) ra ngoài môi trường; khi gửi mẫu đến phòng thí nghiệm, bao gói lọ chứa mẫu bằng túi nilon, miệng túi được dán kín. Trong phòng thí nghiệm, nếu chưa xét nghiệm ngay, mẫu phải được bổ sung Davidson (3.3.3) hoặc thay mới bằng formalin (3.3.1), đảm bảo thể tích mẫu bệnh phẩm và formalin (3.3.1) đạt tỷ lệ khoảng 1 : 10.

6.2.3 Chuẩn bị mẫu.

Đối với tôm giống và hậu ấu trùng lấy nguyên con:

Đối với tôm bố mẹ hoặc tôm thương phẩm cắt toàn bộ phần giáp đầu ngực (< 1 cm³);

Mẫu bệnh phẩm cố định trong Davidson (3.3.3) khoảng từ 24 h đến 72 h tùy thuộc vào kích thước mẫu;

Mẫu bệnh phẩm được chuyển sang cố định trong formalin 10 % (3.3.1) không quá 24 h.

Mẫu bệnh phẩm cố định trong formalin 10% ra, cắt miếng nhỏ dày khoảng 1 mm, dài khoảng 1 cm cho vào khuôn nhựa (4.2.1).

6.2.4 Cách tiến hành.

6.2.4.1 Đúc khuôn.

- Đặt khuôn nhựa (4.2.1) rửa dưới vòi nước chảy, thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc etanol 70 % (thể tích) (3.1.1), thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc etanol 90 % (thể tích) (3.1.1), thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc etanol tuyệt đối (3.1.1) lần thứ 1, thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc etanol tuyệt đối (3.1.1) lần thứ 2, thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc xylene (3.3.2) lần thứ 1, thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc xylene (3.3.2) lần thứ 2, thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc parafin (3.3.6) lần thứ nhất trong thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc parafin (3.3.6) lần thứ hai, thời gian từ 2 h đến 3 h;

CHÚ THÍCH: Tất cả các thao tác trên có thể được thực hiện trong máy xử lý mẫu mô tự động (4.2.2).

TCVN 8710-13 : 2015

– Đúc khuôn rót parafin (3.3.6) nóng chảy từ nồi đun parafin (4.2.3) vào khay sắt (4.2.4) gắp bệnh phẩm từ khuôn nhựa đặt vào khay sắt (4.2.4), đặt khuôn nhựa (4.2.1) lên trên. Để nguội, tách lấy khối parafin.

6.2.4.2 Cắt tiêu bản.

- Cắt gọt khối parafin (6.2.4.1) cho bằng phẳng, đặt trên mặt máy làm lạnh tiêu bản (4.2.5).
- Đặt khối parafin lên máy cắt tiêu bản (4.2.6) sao cho mặt khối parafin song song với mép lưỡi dao cắt bỏ những lát đầu đến khi lát cắt có đủ các bệnh phẩm, điều chỉnh độ dày của lát cắt từ 3 μm đến 5 μm , cắt một vài lát;
- Chọn lát cắt phẳng thả vào nồi đun tiêu bản (4.2.7) với nhiệt độ nước từ 35 °C đến 40 °C.

Dùng phiến kính (4.2.8) vớt dán lát cắt. Dựng nghiêng tiêu bản và để khô.

6.2.4.3 Nhuộm tiêu bản

- Ngâm tiêu bản (6.2.4.2) vào cốc xylene (3.3.2) 3 lần, thời gian mỗi lần từ 3 min đến 5 min;
- Ngâm tiêu bản vào cốc etanol tuyệt đối (3.1.1) 2 lần, thời gian mỗi lần từ 3 min đến 5 min;
- Ngâm tiêu bản vào cốc etanol 90 % (thể tích) (3.1.1), thời gian từ 3 min đến 5 min;
- Ngâm tiêu bản vào cốc etanol 70 % (thể tích) (3.1.1), thời gian từ 3 min đến 5 min;
- Rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy, thời gian từ 3 min đến 5 min;
- Ngâm tiêu bản vào cốc thuốc nhuộm haematoxylin (3.3.4), thời gian từ 3 min đến 5 min;
- Rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy, thời gian từ 3 min đến 5 min;
- Ngâm tiêu bản vào cốc thuốc nhuộm eosin (3.3.5), thời gian từ 60 s đến 90 s;
- Rửa dưới vòi nước chảy, thời gian từ 3 min đến 5 min;;
- Loại bỏ nước còn bám trên tiêu bản bằng cách ngâm tiêu bản vào cốc etanol 90 % (thể tích) (3.1.1) trong thời gian từ 3 s đến 5 s, sau đó ngâm tiêu bản vào cốc etanol tuyệt đối (3.1.1) 3 lần, thời gian mỗi lần từ 3 s đến 5 s; chuyển tiêu bản ngâm trong cốc xylene (3.3.2) 2 lần, thời gian mỗi lần từ 2 min đến 3 min; gắn lamên (4.2.9) vào tiêu bản bằng keo dán lamên (3.3.7). Để khô, soi tiêu bản dưới kính hiển vi quang học (4.2.10).

6.2.5 Đọc kết quả.

Mẫu dương tính khi có dấu hiệu mô học đặc trưng của HPV được thể hiện dưới dạng 1 thể vùi trong nhân tế bào phình to. Thời kỳ đầu thể vùi này nằm ở trung tâm của nhân sau lớn dần lên nằm gần kín nhân, thường có dạng hình cầu hoặc hơi bầu dục. Trong các tế bào bị cảm nhiễm vi rút hạch nhân cũng phình to hơn các tế bào bình thường khác.

Mô hình ống gan tụy nâu nét hoại tử (rỗng) và có chứa nhiều giọt mỡ. Một số tế bào trương to chứa đầy các hạt nhỏ, nhân phân hóa. Thể ẩn trong nhân tế bào biểu bì mô hình ống gan tụy bắt màu đỏ hoặc đỏ sẫm gần kín nhân tế bào.

7 Kết luận

Mẫu tôm được xác định là nhiễm vi rút gây bệnh hoại tử gan tụy (HPV) khi có đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đặc trưng của bệnh và có kết quả dương tính một trong hai phương pháp sau:

- Phản ứng PCR phát hiện HPV dương tính;
- Mẫu cắt mô thể hiện những dấu hiệu bệnh tích vi thể đặc trưng cho bệnh HPV trên tôm.

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị thuốc thử

A.1 Dung dịch đệm TAE hoặc TBE

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 Davidson

A.2.1 Thành phần

Etanol tuyệt đối: 330 ml

Formalin: 220 ml

(dung dịch nước bão hòa khí formaldehyde là dung dịch từ 36 % đến 38 %)

Axit acetic: 115 ml

Nước cất: 355 ml

A.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan axit acetic, formalin và etanol tuyệt đối trong 355 ml nước cất, khuấy và lắc đều.

Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

A.3 Thuốc nhuộm Hematoxylin (dung dịch Hematoxylin – Mayer)**A.3.1 Thành phần**

Hematoxylin dạng tinh thể:	1 g
Natri iodat:	0.2 g
Amoni alum sulphate : (hoặc Potassium alum sulphate)	50 g
Axit citric:	1 g
Chloral hydrate:	50 g
Nước:	1000 ml

A.3.2 Chuẩn bị

Hòa tan Hematoxylin trong nước, sau đó cho natri iodat và amoni alum sulphate hoặc potassium alum sulphate, hoà tan, tiếp tục cho axit citric và chloral hydrate rồi lọc qua giấy lọc.

Bảo quản dung dịch đã pha trong chai tối màu.

A.4 Thuốc nhuộm Eosin**A.4.1 Thành phần**

Eosin Y:	1 g
Etanol 70 % (thể tích):	1 lít
Axit axetic:	5 ml

A.4.2 Chuẩn bị

Thêm từ 2 giọt đến 3 giọt axit axetic vào etanol 70 % (thể tích). Hoà tan eosin trong cồn, sau đó thêm axit axetic rồi lọc qua giấy lọc.

Bảo quản dung dịch đã chuẩn bị trong chai tối màu.

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.

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

- Nhỏ 20 µl protease K vào ống ly tâm 1,5 ml;
- Chuyển 30 mg mẫu bệnh phẩm (6.1.3) vào ống ly tâm đã có protease K;
- Thêm 200 µl dung dịch AL (Lysis buffer);
- Trộn kỹ huyền dịch trong 15 s, sau đó ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.1.4);
- Ủ ấm ở 56 °C trong 10 min, sau đó ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.1.4);
- Thêm 200 µl ethanol tuyệt đối vào ống ly tâm;
- Trộn kỹ huyền dịch trong 15 s, sau đó ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.1.4);
- Hút 420 µl huyền dịch trong ống ly tâm trên, chuyển sang cột ly tâm có ống thu ở dưới;
- Ly tâm bằng máy ly tâm (4.2.2) với gia tốc 6 000 g trong 1 min ở nhiệt độ phòng;
- Thêm 500 µl dung dịch AW1 (Wash buffer 1) vào cột ly tâm có ống thu ở dưới;
- Ly tâm bằng máy ly tâm (4.2.2) với gia tốc 6 000 g trong 1 min ở nhiệt độ phòng;
- Thay ống thu ở dưới cột ly tâm;
- Thêm 500 µl dung dịch AW2 (Wash buffer 2) vào cột ly tâm có ống thu ở dưới;
- Ly tâm bằng máy ly tâm (4.2.2) với gia tốc 20 000 g trong 3 min ở nhiệt độ phòng;
- Chuyển cột ly tâm sang ống ly tâm 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 (4.2.2) với gia tốc 6 000 g trong 1 min;
- Chuyển ADN đã thu được sang ống 1,5 ml khác.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Đỗ Thị Hòa, Bùi Quang Tề, Nguyễn Hữu Dũng, Nguyễn Thị Muội. 202-204. 2004. Bệnh học thủy sản.
 - [2] B. Manjanaik, K. R. Umesha, Indrani Karunasagar, Iddya Karunasagar. 2005. Detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) in wild shrimp from India by nested polymerase chain reaction (PCR)
 - [3] Jurairat Phromjai, Vichai Boonsaeng, Boonsirm Withyachumnarnkul, Timothy W. Flegel. *Detection of hepatopancreatic parvovirus in Thai shrimp Penaeus monodon by in situ hybridization, dot blot hybridization and PCR amplification*, Diseases of aquatic organisms Dis Aquat Org, 2002, 51. p 227-232.
-