

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8710-12:2015

Xuất bản lần 1

**BỆNH THỦY SẢN - QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN -
PHẦN 12: BỆNH VI BÀO TỬ DO ENTEROCYTOZON
HEPATOPENAEI Ở TÔM**

*Aquatic animal disease - Diagnostic procedure -
Part 12: Microsporida diseases by enterocytozoon hepatopenaei in shrimp*

HÀ NỘI - 2015

Lời nói đầu

TCVN 8710-12:2015 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 12: Bệnh vi bào tử do *Enterocytozoon hepatopenaei* ở tôm**

Aquatic animal diseases - Diagnostic procedure -

Part 12: Microsporida diseases by Enterocytozoon hepatopenaei 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 vi bào tử do *Enterocytozoon hepatopenaei* gây ra ở tôm.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1**Bệnh vi bào tử (microsporida disease)**

Bệnh do *Enterocytozoon hepatopenaei* và một số kí sinh trùng thuộc giống *Thelohania* (*Agmasoma*) ký sinh trong các tế bào gan tụy, cơ lưng và cơ bụng của các loài tôm.

CHÚ THÍCH: Các kí sinh trùng gây bệnh vi bào tử có kích thước nhỏ và cấu tạo phức tạp, mỗi bào tử trùng có hình bầu dục, kích thước 0,7 µm x 1,1 µm và đơn nhân, phía trước cực nang có từ 5 vòng đến 6 vòng sợi tơ, có không bào phía sau, có đĩa bám gắn với sợi tơ ở đầu cực nang, vách tế bào đậm đặc mỏng. Vách tế bào cấu tạo gồm màng sinh chất, lớp nội bào sáng dày khoảng 10 nm và lớp đậm đặc ở ngoại bào dày khoảng 2 nm. Bào tử trùng có màng tế bào 2 lớp bọc ngoài và có hệ cơ quan đính đặc trưng giúp cho chúng chui vào tế bào vật chủ.

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 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-axit etylendiamintetraaxetic).

3.2.7 Thang chuẩn AND (Marker)

3.2.8 Nước tinh khiết, không có nuclease.

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

3.2.10 Kit nhân gen (PCR Master Mix Kit).

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.

3.4 Thuốc thử và vật liệu dung cho phương pháp nhuộm tiêu bản tươi

3.4.1 Thuốc nhuộm lugol iodine (xem A.5).

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 Lam kính, vô trùng.

4.1.2 Lamen, vô trùng.

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

4.2 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp chẩn đoán bằng PCR

4.2.1 Máy nhân gen (PCR).

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

4.2.3 Máy lắc trộn vortex.

4.2.4 Máy spindown.

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

4.2.6 Máy đọc gel.

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

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

4.3.2 Máy xử lý mẫu mô tự động.

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

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

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

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

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

5 Chẩn đoán lâm sàng

5.1 Đặc điểm dịch tễ

- Bệnh thường xảy ra trên các loài tôm thuộc họ tôm he (*Penaeidae*) như tôm sú (*Penaeus monodon*), tôm he (*P. merguensis*), tôm chân trắng (*P. vannamei*), tôm nâu (*P. aztecus*), *P. setiferus*... Ngoài ra, bệnh còn gặp trên một số loài như tôm đất, tôm càng xanh, cua, ghe, giáp xác phù du *Artemia*, *Copepoda*;
- Tôm thường nhiễm bệnh ở giai đoạn rất sớm, từ 10 ngày đến 15 ngày sau khi thả giống và ở các giai đoạn của tôm nuôi;
- Tỷ lệ chết có thể từ 7 % đến 80 % số tôm trong ao nuôi;
- Ký sinh trùng ký sinh trong các tế bào gan tụy, cơ lưng và cơ bụng của các loài tôm;
- Bệnh có thể lây nhiễm trực tiếp theo trực ngang từ các loài cá trong ao nuôi, gián tiếp từ cá tạp dùng làm thức ăn cho tôm hoặc lây nhiễm theo trực dọc qua tôm bố mẹ nhiễm vi bào tử tham gia sinh sản;
- Bệnh có thể xảy ra quanh năm và phân bố hầu khắp các vùng nuôi tôm.

5.2 Triệu chứng lâm sàng

- Tôm bị bệnh cơ thể yếu, kém ăn, hoạt động chậm chạp và sinh trưởng chậm;
- Xuất hiện các đám màu trắng đục hoặc trắng sữa trên vùng cơ lưng, cơ bụng và khối gan tụy. Ở tôm lớn, các đám màu trắng thể hiện rõ hơn ở phần lưng từ gan tụy đến phần giữa thân;
- Trên tôm bệnh nặng, những đám màu trắng dần chiếm chỗ các vùng cơ lưng, cơ bụng và khối gan tụy.

5.3 Bệnh tích

- Gan tụy tôm bệnh nặng hoại tử (dịch hóa), tôm nhẹ không có dấu hiệu rõ ràng;
- Tôm bệnh nặng yếu và chết, gan tụy thoái rữa rất nhanh;
- Dấu hiệu mô bệnh học: mô hình ống gan tụy hầu hết hoại tử (rỗng) và có chứa nhiều giọt mỡ. Một số tế bào trên mô hình ống tương to chứa đầy các hạt nhỏ, nhân phân hóa;
- Trên các lát cắt mô học cũng cho thấy sự chiếm chỗ của các vi bào tử trong mô cơ, mô của khối gan tụy.

6 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

6.1 Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)

6.1.1 Lấy mẫu

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.

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

- Đối với tôm giống và hậu ấu trùng: sử dụng nguyên con;
- Đối với tôm bố mẹ, tôm thương phẩm: 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 tách chiết (3.2.9) thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

VÍ DỤ: Sử dụng kit tách chiết ADN: DNeasy® Blood & Tissue Kit (250) (Cat No. 69506)¹⁾ (xem phụ lục B).

6.1.4.2 Chuẩn bị mồi

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy nhân gen (4.2.1) theo phương pháp PCR khuếch đại đoạn gen đặc hiệu của *Enterocytozoon hepatopenaei* sử dụng cặp mồi MF1/ MR1(3.2.1). Trình tự cặp mồi được nêu trong bảng 1.

Bảng 1 : Trình tự cặp mồi ^[1]

Mồi	Trình tự Cặp mồi
MF1	5'-CCG-GAG-AGG-GAG-CCT-GAG-A-3'
MR1	5'-GAC-GGG-CGG-TGT-GTA-CAA-A-3'

¹⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiên 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.

TCVN 8710-12 : 2015

Cặp mồi MF1/ MR1 dùng để khuếch đại đoạn gen của *Enterocytozoon hepatopenaei* có kích thước 951 bp.

Mồi được chuẩn bị như sau:

Chuẩn bị mồi gốc:

- Mồi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.2.4) 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 200 μ M làm mồi gốc.

Chuẩn bị mồi sử dụng

- Mồi sử dụng ở nồng độ 20 μ M: pha loãng mồi gốc bằng nước (3.2.8) (10 μ l mồi gốc và 90 μ l nước).

6.1.4.3 Tiến hành phản ứng PCR

Sử dụng cặp mồi đã được chuẩn bị (6.2.4.2) sử dụng kit nhân gen (3.2.10) 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
Mồi xuôi 20 μ M	1,25 μ l
Mồi ngược 20 μ M	1,25 μ l
Nước không có nuclease	7,5 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 *Enterocytozoon hepatopenaei* chuẩn.

Mẫu kiểm chứng âm: Cho 2,5 μ l nước (3.2.8).

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 (4.2.1) đã cài đặt chu trình nhiệt được nêu trong bảng 3.

Bảng 3 : Chu trình nhiệt của phản ứng PCR ^[1]

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
94 °C	30 s	35
55 °C	30 s	
72 °C	90 s	
72 °C	5 min	1

CHÚ THÍCH:

- Phản ứng PCR phải bao gồm: mẫu kiểm tra, 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) 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.

Chuyển bản gel vào bể điện di (4.2.5), 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 stain ³⁾) và sử dụng theo quy định của nhà sản xuất.

6.1.4.4.2 Chạy điện di

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.

³⁾ Sản phẩm do hãng Invitrogen cung cấp. Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ảnh hưởng đến việc sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

TCVN 8710-12 : 2015

Thực hiện điện di trong bộ điện di (4.2.5), 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 (4.2.6) theo bảng 4.

Bảng 4: Kết quả điện di

Giếng	Sản phẩm có kích thước 951 bp	Kết quả
Thang chuẩn ADN	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 hồng hoặc enzym hồng
Mẫu kiểm chứng âm tính	Không	Không bị tạp nhiễm
	Có	Bị tạp nhiễm
Mẫu thử	Có	Dương tính với vi bào tử
	Không	Âm tính với vi bào tử

Đánh giá kết quả:

Kết quả mẫu thử dương tính khi: tại giếng mẫu thử xuất hiện vạch sáng có kích thước 951 bp. Thang chuẩn ADN phân vạch rõ ràng, mẫu kiểm chứng dương có kích thước 951 bp, mẫu kiểm chứng âm không có vạch sáng.

Kết quả mẫu thử âm tính khi: tại giếng mẫu thử không xuất hiện vạch sáng. Thang chuẩn ADN phân vạch rõ ràng, mẫu kiểm chứng dương có kích thước 951 bp, mẫu kiểm chứng âm không có vạch sáng.

6.2 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 ($< 1 \text{ cm}^3$);

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.

Lấy mẫu bệnh phẩm cố định trong formalin 10% ra, cắt miếng nhỏ dày khoảng 1 mm, dài khoảng 1 cm cho vào khuôn nhựa (4.3.1).

6.2.4 Cách tiến hành

6.2.4.1 Đúc khuôn

Đặt khuôn nhựa (4.3.1) 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 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) thứ 2, thời gian từ 2 h đến 3 h;

Ngâm khuôn nhựa vào cốc xylen (3.3.2) lần thứ 1, thời gian từ 2 h đến 3 h;

Ngâm khuôn nhựa vào cốc xylen (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 1, thời gian từ 2 h đến 3 h;

Ngâm khuôn nhựa vào cốc parafin (3.3.6) lần thứ 2, thời gian từ 2 h đến 3 h;

CHÚ THÍCH: Nếu sử dụng máy xử lý mẫu mô tự động (4.3.2) thì tiến hành tiếp theo từ bước ngâm etanol.

Đúc khuôn: rót parafin (3.3.6) nóng chảy từ nồi đun parafin (4.3.3) vào khay sắt (4.3.4), gắp bệnh phẩm từ khuôn nhựa đặt vào khay sắt, đặt khuôn nhựa (4.3.1) lên trên. Để nguội, tách lấy khối parafin.

6.2.4.2 Cắt tiêu bản

TCVN 8710-12 : 2015

- Cắt gọt khối parafin cho bằng phẳng, đặt trên mặt máy làm lạnh (4.3.5);
- Đặt khối parafin lên máy cắt tiêu bản (4.3.6) sao cho mặt khối parafin song song với mép lưỡi dao, cắt bỏ những lát đầu đến khi lát cắt có đủ các tổ chức;
- Cắt lấy tiêu bản, độ dày lát cắt từ 3 μm đến 5 μm ;
- Chọn lát cắt tiêu bản phẳng và lấy được hết các mô cần lấy, thả vào nồi dẫn tiêu bản (4.3.7) có nhiệt độ nước từ 35 °C đến 40 °C;
- Dùng phiến kính (4.1.1) vớt dán lát cắt bằng, dựng nghiêng và để khô.

6.2.4.3 Nhuộm tiêu bản

- Ngâm tiêu bản (6.2.4.2) vào cốc xylen (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 xylen (3.3.2) 2 lần, thời gian mỗi lần từ 2 min đến 3 min; gắn lamên (4.1.2) vào tiêu bản bằng keo dán lamên (3.3.7). Để khô, soi tiêu bản dưới kính hiển vi quang học (4.1.3).

6.2.5 Đọc kết quả

Mẫu dương tính khi thấy sự hiện diện của các vi bào tử trong tế bào chất của tế bào biểu mô gan tụy với các dấu hiệu mô học:

- Tế bào biểu mô ống gan tụy trương to, nhân bị phân hóa và chứa đầy các hạt ưa acid, tạo thành đám được bao quanh bởi lớp màng không bào và bắt màu hồng đỏ của eosin;

– Ống gan tụy của những con tôm bị nhiễm bệnh nặng bị giãn rộng, hoại tử (rỗng) và có thể chứa các giọt dầu;

Quan sát mô bệnh học cho thấy các đám màu trắng lớn của vi bào tử dần thay thế ống gan tụy, dạ dày và phần cơ bụng.

6.3 Phương pháp nhuộm tiêu bản tươi

6.3.1 Lấy mẫu

Xem 6.1.1.

6.3.2 Bảo quản mẫu

Mẫu tôm được vận chuyển đến phòng thí nghiệm phải còn sống và được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C:

Tôm còn sống có những dấu hiệu lâm sàng đặc trưng của bệnh vi bào tử, được chuyển đến phòng thí nghiệm đựng trong túi nilon (chứa không quá 1/3 nước) có bơm oxy.

6.3.3 Chuẩn bị mẫu

Mẫu sử dụng nhuộm tiêu bản tươi phải còn sống hoặc vừa mới chết.

Tách phần giáp đầu ngực và lấy khối gan tụy bên trong rồi đặt lên lam kính (4.1.1) sạch.

6.3.4 Cách tiến hành

Dùng lamén tán nhỏ khối gan tụy, dàn mỏng khối gan tụy trên lam kính, nhỏ từ 2 giọt đến 3 giọt thuốc nhuộm lugol iodine (3.4.1) và đặt lamén lên rồi quan sát dưới kính hiển vi;

Quan sát với vật kính 10 X, 40 X và 100 X.

6.3.5 Đọc kết quả

Mẫu tôm dương tính nếu quan sát dưới kính hiển vi (4.1.3) cho thấy sự xuất hiện của các vi bào tử có hình giọt nước, đứng thành từng đám một và bắt màu nâu xám của thuốc nhuộm lugol iodine;

Nếu quan sát ở vật kính 100 X cho thấy rõ hơn cấu tạo các bào tử:

- Các bào tử chưa trưởng thành được bao bọc bởi một lớp màng plasma bên trong và bên ngoài là lớp màng ngoại bào tử là protein;
- Ở bào tử trưởng thành có thể quan sát thấy nhân nằm sâu bên trong các sợi cực, đĩa bám và đĩa cực gồm nhiều phiến mỏng của nó.

7 Kết luận

Mẫu tôm được xác định nhiễm bệnh vi bào tử do *Enterocytozoon hepatopenaei* 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:

- Phương pháp PCR có kết quả dương tính với *Enterocytozoon hepatopenaei*;
- Mẫu cắt mô thể hiện những dấu hiệu bệnh tích vi thể đặc trưng cho bệnh vi bào tử.

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 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) (3.1.1). Hoà tan eosin trong etanol, sau đó thêm axit axetic rồi lọc qua giấy lọc.

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

A.5 Thuốc nhuộm lugol iodine**A.5.1 Thành phần**

Kali iodua:	6 g
I-ốt:	4 g
Nước cất:	100 ml

A.5.2 Chuẩn bị

Trộn 6 g Kali iodua và 4 g i-ốt vào 100 ml cho nước cất, lắc cho tan. Để yên trong 24 h sau đó được lọc qua giấy lọc.

Dung dịch được giữ trong chai màu nâu ở nhiệt độ phòng để tránh sự kết tủa. Dung dịch có thể được giữ trong nhiều tuần nhưng nên thỉnh thoảng lọc để loại bỏ các hạt kết tủa có thể xuất hiện.

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 (4.2.4);
- Ủ ấm ở 56 °C trong 10 min, sau đó ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.2.4);
- Thêm 200 µl etanol tuyệt đối vào ống ly tâm;
- Trộn kỹ huyền dịch trong 15 s, sau đó ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.2.4);
- 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] Somjintana Tourtip, Somjai Wongtripop, Grant D. Stentiford, Kelly S. Bateman, Siriporn Sriurairatana, Jittipan Chavadej, Kallaya Sritunyalucksana, Boonsirm WithyachumnADNkul. September 2009. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. Journal of Invertebrate Pathology Sydney M. Finegold, Ellen Jo Baron, 1986. Bailey diagnostic and scott's microbiology. Seventh edition.
- [2] Amornrat Tangprasittipap, Jiraporn Srisala, Saisunee Chouwdee, Montagan Somboon, Niti Chuchird, Chalor Limsuwan, Thinnarat Srisuvan, Timothy W Flegel and Kallaya Sritunyalucksana. 15 July 2013. *The microsporidian Enterocytozoon hepatopenaei is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/139>.
- [3] FAO and NACA, *Asia Diagnosstic Guide to Aquatic Animal Diseases*, Fisheries technical paper 402/2 , Page 160.
- [4] Đỗ Thị Hòa, Bùi Quang Tề, Nguyễn Hữu Dũng, Nguyễn Thị Muội, 2004, Bệnh học thủy sản, NXB Nông nghiệp.
- [5] Bùi Quang Tề, Lê Ngọc Quân, Nguyễn Thị Biên Thủy, Bùi Quang Tâm, Hoàng Thị Yến, Nguyễn Thị Niên, Nguyễn Văn Thành, Phan Thị Hương. 2010. *Kết quả nghiên cứu bệnh gan tụy trên tôm sú (Penaeus monodon) nuôi ở Việt Nam và biện pháp phòng ngừa*.