

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8710-10:2015

Xuất bản lần 1

**BỆNH THỦY SẢN - QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN -
PHẦN 10: BỆNH DO PERKINSUS MARINUS
Ở NHUYỄN THỂ HAI MẢNH VỎ**

*Aquatic animal disease - Diagnostic procedure -
Part 10: Perkinsus marinus disease in bivalve molluscs*

HÀ NỘI - 2015

Lời nói đầu

TCVN 8710-10:2015 được xây dựng trên cơ sở tham khảo OIE (2012), *Manual of diagnostic tests and vaccines for aquatic animals*, Chapter 2.4.5 *Infection Perkinsus marinus*;

TCVN 8710-10:2015 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 10: Bệnh do *Perkinsus marinus* ở nhuyễn thể hai mảnh vỏ**

Aquatic animal diseases - Diagnostic procedure -

Part 10: Perkinsus marinus disease in bivalve mol-

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 gây ra do *Perkinsus marinus* ở nhuyễn thể hai mảnh vỏ.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1

Perkinsus marinus (*Perkinsus marinus*)

Sinh vật đơn bào thuộc ngành bào tử *Apicomplexa* (Levine, 1978), ký sinh trên mang, màng áo, tế bào biểu mô ruột, các tổ chức mô liên kết của tuyến tiêu hóa và tuyến sinh dục của nhuyễn thể hai mảnh vỏ. Chu kỳ sống của *Perkinsus marinus* gồm ba giai đoạn chính: Giai đoạn dinh dưỡng (trophozoite), giai đoạn tăng trưởng (hypnospore), giai đoạn bào tử động (zoospores).

2.1.1

Giai đoạn dinh dưỡng (trophozoite)

Giai đoạn nhân

Giai đoạn xảy ra trong các mô của vật chủ trực tiếp. Trong giai đoạn này *Perkinsus marinus* có dạng tế bào hình cầu với sự xuất hiện của không bào lớn, hơi lệch tâm và có nhân ở ngoại biên.

2.1.2

Giai đoạn tăng trưởng (hypnospore)

Giai đoạn này quan sát được khi ủ mô ký chủ bị nhiễm *Perkinsus marinus* trong môi trường lỏng thioglycollat (FTM), thể dinh dưỡng được phóng lớn (dạng hình cầu) và lớp vỏ của ký sinh trùng được phát triển dày hơn. Sau khi hypnospores được nuôi trong FTM bị cô lập và chuyển vào nước biển, hypnospores bắt đầu sự phân chia nhân tế bào và sự phân bào chu kỳ liên tiếp.

2.1.3

Giai đoạn bào tử động (zoospores)

Giai đoạn tăng sinh

Giai đoạn này hàng trăm bào tử động được hình thành trong màng tế bào gốc. Bào tử động chỉ có một nhân với không bào trong tế bào chất và di động hơn do hai roi chèo ở bên.

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 cho phương pháp nuôi cấy.

3.1.1 **Môi trường lỏng thioglycollat (FTM - fluid thioglycollate medium) (xem A.1).**

3.1.2 **Dung dịch penicilin-streptomycin (xem A.2).**

3.1.3 **Thuốc nhuộm Lugol's iodine (xem A.3).**

3.1.4 **Nystatin.**

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

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

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

3.2.3 **Kit nhân gen (PCR Master Mix Kit).**

3.2.4 **Cặp mồi (primers), gồm mồi xuôi và mồi ngược.**

3.2.5 **Nước tinh khiết, không có nuclease.**

3.2.6 **Agarose.**

3.2.7 **Dung dịch đệm TAE (Tris-brorate – EDTA) hoặc TBE (Tris-acetate – EDTA) (xem A.4).**

- 3.2.6 Chất nhuộm màu, ví dụ: Sybr safe
- 3.2.9 Chất đệm tải mẫu (Loading dye 6X).
- 3.2.10 Dung dịch đệm TE (Tris-axit etylendiamintetraaxetic).
- 3.2.11 Thang chuẩn ADN (Marker)

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 sử dụng cho phương pháp nuôi cấy.
 - 4.1.1 Nồi hấp vô trùng. có thể duy trì ở nhiệt độ 115 °C.
 - 4.1.2 Kính hiển vi quang học, vật kính 10 X, 20 X, 40 X và 100 X.
 - 4.1.3 Ống nghiệm vô trùng, dung tích 15 ml.
 - 4.1.4 Phiến kính vô trùng.
 - 4.1.5 Lamen vô trùng.
 - 4.1.6 Dao mổ, phanh, kéo vô trùng.
 - 4.1.7 Pipet pasteur.
- 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 Bể ủ nhiệt, duy trì nhiệt độ từ 55 °C đến 60 °C.
 - 4.2.6 Bộ điện di, gồm bộ nguồn và bể chạy điện di.
 - 4.2.7 Máy đọc gel.
 - 4.2.8 Ống eppendorf, dung tích 1,5 ml.

5 Chẩn đoán lâm sàng

5.1 Đặc điểm dịch tễ

- Bệnh xảy ra ở đối tượng nhuyễn thể hai mảnh vỏ như hào, vẹm, ngao....;
- Bệnh xảy ra quanh năm nhưng thường tập trung nhiều nhất vào mùa thu và ít nhất vào đầu mùa xuân khi nhiệt độ môi trường trên 20 °C, độ mặn từ 9 ‰ đến 12 ‰. Cường độ nhiễm bệnh tăng cao khi môi trường tăng độ mặn trên 12 ‰;
- *Perkinsus marinus* lây truyền trực tiếp giữa động vật thân mềm mà không cần vật chủ trung gian;
- Giai đoạn lây nhiễm là lúc bào tử động có 2 roi chuyển sang giai đoạn cơ thể dinh dưỡng xâm nhập vào các mô của vật chủ;
- Nhuyễn thể hai mảnh vỏ bị nhiễm bệnh với tỷ lệ cao, tỷ lệ chết có thể lên đến 95 % khi điều kiện môi trường bất lợi đối với vật chủ. *Perkinsus marinus* có thể tồn tại dai dẳng suốt vòng đời vật chủ.

5.2 Triệu chứng lâm sàng

- Biểu hiện chủ yếu của bệnh là nhuyễn thể hai mảnh vỏ sinh trưởng chậm;
- Tuyến sinh dục của nhuyễn thể hai mảnh vỏ chậm phát triển, giảm sức sinh sản và làm chậm chu kỳ sinh sản;
- Nhuyễn thể hai mảnh vỏ có hiện tượng nổi lên cát, mở vỏ và chết hàng loạt.

5.3 Bệnh tích

- Nhuyễn thể hai mảnh vỏ gầy rạc, mô chảy nước, cơ màng áo, tuyến tiêu hóa nhợt màu;
- Bào tử *Perkinsus marinus* xuất hiện từng đám trên màng áo, mang, mô liên kết, tuyến tiêu hóa và tuyến sinh dục với biểu hiện là những nốt sần màu nâu trắng hoặc những cái nang trên mặt của màng áo, mang;
- Sự nhiễm *Perkinsus marinus* nặng gây tổn thương và xung huyết nghiêm trọng trên mang, mô ruột và mô liên kết của nhuyễn thể hai mảnh vỏ.

6 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

6.1 Phương pháp nuôi cấy

6.1.1 Lấy mẫu

Số lượng nhuyễn thể hai mảnh vỏ trên mỗi mẫu tùy thuộc vào kích cỡ của nhuyễn thể hai mảnh vỏ:

- Nhuyễn thể hai mảnh vỏ giống: lấy từ 10 con/mẫu đến 15 con/mẫu.
- Nhuyễn thể hai mảnh vỏ trưởng thành: lấy từ 5 con/mẫu đến 10 con/mẫu.

6.1.2 Bảo quản mẫu

Trong quá trình vận chuyển từ nơi thu mẫu về đến phòng thử nghiệm mẫu được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C không qua 24 h.

Mẫu chuyển đến phòng thí nghiệm phải được phân tích ngay.

6.1.3 Chuẩn bị mẫu

- Nhuyễn thể hai mảnh vỏ còn sống hoặc vừa chết chưa tách vỏ;
- Dùng dao mổ vỏ trùng cắt cơ mở vỏ nhuyễn thể hai mảnh vỏ và tách ra làm hai;
- Dùng panh, kéo vỏ trùng cắt 1 mẫu bệnh phẩm từ 5 mm đến 10 mm của phần mô áo, mang, ruột, phần cơ bị tổn thương;

CHÚ THÍCH: Phải dùng các dụng cụ vỏ trùng khi lấy mô ở các mẫu khác nhau để tránh lây nhiễm.

6.1.4 Cách tiến hành

Bước 1: Cho mẫu bệnh phẩm đã chuẩn bị (6.1.3) vào các ống nghiệm (4.1.3) chứa 9,5 ml FTM (3.1.1) có bổ sung thêm 0,5 ml dung dịch penicilin-streptomycin (3.1.2) và 50 µl nystatin (3.1.4). Ống nghiệm được đóng kín và lắc để mẫu bệnh phẩm chìm trong môi trường;

Bước 2: Ủ ống nghiệm chứa mẫu bệnh phẩm trong điều kiện không có ánh sáng, ở nhiệt độ từ 22 °C đến 25 °C trong 5 ngày đến 7 ngày;

Bước 3: Dùng panh vỏ trùng lấy mẫu bệnh phẩm được ủ ra khỏi môi trường FTM và đặt lên phiến kính (4.1.4);

Bước 4: Dùng đầu côn vỏ trùng xé nhỏ mẫu bệnh phẩm để nhuộm lugol iodine;

Bước 5: Nhỏ 1 hoặc 2 giọt lugol iodine (3.1.3) vào mẫu bệnh phẩm bằng pipet pasteur (4.1.7). Đặt lamên lên mẫu bệnh phẩm và kiểm tra dưới kính hiển vi quang học (4.1.2), sử dụng vật kính 10 X, 40 X và 100 X;

CHÚ THÍCH: Nếu không tiến hành các bước tiếp theo để đọc kết quả sau 7 ngày ủ, các ống nghiệm chứa mẫu được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C trong khoảng 3 tuần ở điều kiện không có ánh sáng.

6.1.5 Đọc kết quả

TCVN 8710-10:2015

Mẫu dương tính với *Perkinsus* sp. khi quan sát dưới kính hiển vi thấy thể bào tử dinh dưỡng có vách tế bào nhuộm hình cầu tròn có màu xanh hoặc xanh đen, kích thước (từ 2 μm đến 10 μm) x (từ 20 μm đến 70 μm).

Mẫu âm tính với *Perkinsus* sp. khi quan sát dưới kính hiển vi không thấy thể bào tử dinh dưỡng có đặc điểm như trên.

6.2 Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)

6.2.1 Lấy mẫu

Xem 6.1.1.

6.2.2 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 (3.2.1);

Mẫu chuyển đến phòng thí nghiệm nếu chưa phân tích ngay phải bảo quản mẫu ở nhiệt độ âm 20 °C đến âm 80 °C hoặc trong etanol tuyệt đối (3.2.1).

6.2.3 Chuẩn bị mẫu

Lượng mẫu cần chuẩn bị: khoảng 30 mg.

a) Mẫu trực tiếp

Thực hiện chuẩn bị mẫu như mô tả tại 6.1.3;

Bảo quản mẫu trong etanol tuyệt đối (3.2.1);

Trước khi tách chiết, lấy mẫu ra khỏi etanol và làm khô bằng giấy thấm.

b) Mẫu tăng sinh

Thực hiện như mô tả tại bước 1 và bước 2 của 6.1.4;

Dùng panh vô trùng lấy mẫu bệnh phẩm ra khỏi môi trường FTM và đặt vào ống eppendorf 1,5 ml (4.2.8) để tách chiết ADN.

6.2.4 Cách tiến hành

6.2.4.1 Tách chiết ADN

Sử dụng bộ kit tách chiết (3.2.2) thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

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

6.2.4.2 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 *Perkinsus marinus* sử dụng cặp mồi PmarITS-70F/PmarITS600R (3.2.4). Trình tự cặp mồi được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 : Trình tự cặp mồi

Mồi	Trình tự cặp mồi
PmarITS-70F	5'-CCT-TTG-YTW-GAG-WGT-TGC-CAG-ATG-3'
PmarITS 600R	5'-CGA-GTT-TGC-GAG-TAC-CTG-KAG-AG-3'

Cặp mồi PmarITS-70F/PmarITS600R dùng để khuếch đại đoạn gen của *Perkinsus marinus* có kích thước 509 bp.

Mồi được chuẩn bị như sau:

Chuẩn bị mồi gốc:

- Mồi gốc 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 (3.2.10) được mồi ở nồng độ 200 µM làm mồi gốc;

Chuẩn bị mồi sử dụng:

- Mồi sử dụng ở nồng độ 20 µM: pha loãng mồi gốc bằng nước (3.2.5) (10 µl mồi gốc và 90 µl nước (3.2.5)).

6.2.4.3 Tiến hành phản ứng PCR

Sử dụng cặp mồi đã được chuẩn bị (6.2.4.2) sử dụng kit nhân gen (3.2.3) 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

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.

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.

Bảng 2: Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích
Taq PCR Master Mix (2X)	12,5 µl
Mồi xuôi 20 µM	1 µl
Mồi ngược 20 µM	1 µl
Nước không có nuclease	8 µl
Tổng thể tích	22,5 µl

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

- Mẫu kiểm chứng dương: Cho 2,5 µl mẫu ADN đã được giám định hoặc sử dụng các chủng *Perkinsus marinus* chuẩn vào ống phản ứng;
- Mẫu kiểm chứng âm: Cho 2,5 µl nước (3.2.5) vào ống phản ứng;
- Mẫu thử: Cho 2,5 µl mẫu ADN kiểm tra vào ống phản ứng.

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

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
94 °C	4 min	1
94 °C	1 min	40
57 °C	1 min	
65 °C	3 min	
65 °C	10 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.

6.2.4.4 Điện di

6.2.4.4.1 Chuẩn bị bản gel

Pha thạch với nồng độ agarose (3.2.6) từ 1,5 % đến 2 % bằng dung dịch đệm TBE 1X hoặc TAE 1X (3.2.7) vào bình 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 (3.2.8) vào mỗi 100 ml thạch. Lắc nhẹ tránh tạo bọt để chất nhuộm màu tan đều;

Chuẩn bị khuôn đổ thạch, đặt lược vào khuôn rồi đổ thạch vào khuôn, 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 thạch vào bể chạy điện di (4.2.6), đổ dung dịch đệm (3.2.7) 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.

6.2.4.4.2 Chạy điện di

Hút 2 µl chất đệm tải mẫu (3.2.9) vào 8 µl sản phẩm PCR trộn đều và cho vào các giếng trên bản thạch.

Thực hiện điện di trong bộ điện di (4.2.6), chạy kèm theo thang chuẩn ADN (3.2.11) để dự đoán 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.

6.2.4.5 Đọc kết quả

Sau khi điện di, đọc kết quả ở máy đọc gel (4.2.7) theo Bảng 4.

Bảng 4 : Kết quả điện di

Giếng	Vạch 509 bp	Kết quả
Thang chuẩn ADN	Các vạch sáng rõ ràng	Điện di tốt
Mẫu kiểm chứng dương tính	Có	Hỗn hợp phản ứng PCR tốt
	Không	Mẫu đối chứng dương tính hỏng hoặc enzym hỏng
Mẫu kiểm chứng âm tính	Có	Bị tạp nhiễm
	Không	Không tạp nhiễm
Mẫu thử	Có	Dương tính với <i>Perkinsus marinus</i>
	Không	Âm tính với <i>Perkinsus marinus</i>

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.

Đánh giá kết quả:

- Kết quả mẫu thử dương tính khi: Tại giếng mẫu thử xuất hiện vạch sáng có kích thước 509 bp. Thang chuẩn ADN phân vạch rõ ràng, mẫu kiểm chứng dương có kích thước 509 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 509 bp, mẫu kiểm chứng âm không có vạch sáng.

6 Kết luận

Mẫu được xác định nhiễm bệnh do *Perkinsus marinus* khi có đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích điển hình của bệnh và có kết quả dương tính với *Perkinsus marinus* bằng phương pháp PCR trong phòng thí nghiệm.

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị môi trường, thuốc thử

A.1 Môi trường lỏng thioglycollat (FTM)**A.1.1 Thành phần**

Môi trường FTM:	29,3 g
-----------------	--------

Natri clorua:	22 g
---------------	------

Nước cất:	1 000 ml
-----------	----------

A.1.2 Chuẩn bị

Trộn 22 g natri clorua và 29,3 g FTM vào 1 000 ml nước cất. Đun cho tan hoàn toàn đến khi dung dịch có màu vàng trong. Chia ra các ống nghiệm vô trùng, mỗi ống khoảng 9,5 ml.

Hấp diệt trùng trong nồi hấp (4.1.1) ở 115 °C trong 20 min.

Các ống nghiệm này được giữ nơi tối và bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.

A.2 Dung dịch penicilin-streptomycin**A.2.1 Thành phần**

Streptomycin sulfat (500 IU/ml):	3,13 g
----------------------------------	--------

Penicilin G (500 IU/ml):	6,55 g
--------------------------	--------

Nước khử ion:	500 ml
---------------	--------

A.2.2 Chuẩn bị

Trộn 3,13 g streptomycin sulfat và 6,55 g penicillin G vào 500 ml nước khử ion và lắc đến khi các kháng sinh tan hoàn toàn.

Dung dịch được bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.

A.3 Thuốc nhuộm Lugol iodine

A.3.1 Thành phần

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

A.3.2 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.

A.4 Dung dịch đệm TAE hoặc TBE

A.4.1 Thành phần

Dung dịch TAE (hoặc TBE) 10X:	100 ml
Nước khử ion:	900 ml
Tổng:	1000 ml dung dịch TAE (TBE) 1X

A.4.2 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.

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) và protein K ủ qua đêm ở 56 °C như sau:

- Nhỏ 20 µl protein K vào ống ly tâm 1,5 ml;
- Chuyển 30 mg mẫu bệnh phẩm (6.2.3) vào ống ly tâm đã có protein 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 qua đêm ở 56 °C trong bể ủ nhiệt (4.2.5), sau đó ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.2.4);
- Thêm 200 µl etanol tuyệt đối (3.2.1) 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 (8 000 r/min) 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 (8 000 r/min) 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 (14 000 r/min) trong 3 min ở nhiệt độ phòng;
- Chuyển cột ly tâm sang ống eppendorf 1,5 ml;
- Nhỏ 200 µl dung dịch AE (Elution buffer) vào cột ly tâm và giữ ở nhiệt độ phòng 1 min;

TCVN 8710-10:2015

- Ly tâm bằng máy ly tâm (4.2.2) với gia tốc 6 000 g (8 000 r/min) trong 1 min;
- Chuyển 200 μ l ADN đã thu được sang ống eppendorf 1,5 ml khác.

Bảo quản ADN ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C nếu thực hiện phản ứng PCR ngay hoặc ở nhiệt độ âm 20 °C đến âm 80 °C nếu thực hiện phản ứng PCR sau 24 h.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] FAO/NACA, *Asia diagnostic guide to aquatic animal diseases*. FAO Fish. Pap. No.402/2, 2001, M5. P 133-137
- [2] Antonio Villalba, Kimberly S. Reece, M. Camino Ordás, Sandra M. Casas and Antonio Figueras, *Perkinsosis in molluscs*. *Aquat. Living Resour*, 2004, 17. p 411-432
- [3] Céline Garcia, Ricardo Leite, Isabelle Arzul, *Parasites of the genus Perkinsus*. Workshop for the analysis of the impact of Perkinsosis to the European shellfish industry session
- [4] David Bushek, Susan E. Ford, and Standish K. Allen, Jr. *Evaluation of methods using ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of Perkinsus marinus infection in the eastern oyster, crassostrea virginica*, *Annual review of fish diseases*, 1994, Vol 4. p 201-217
- [5] Kenneedyt. Paynter, Vincent politano, Hillary A. Lane, Stevenm. Allen And donald meritt, *Growth rates and prevalence of Perkinsus marinus prevalence in restored oyster population in Maryland* – *Journal of shellfish research*, 2010, Vol 29. No2. p 309-317
- [6] Nguyễn Văn Hào và CS, *Sự hiện diện của Perkinsus sp trên nghêu (Meretrix Lyrata) tại vùng biển Cần Giờ – Thành Phố Hồ Chí Minh*, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II, Chi cục Thú y TP. Hồ Chí Minh (2010)
- [7] Nguyễn Thị Thu Hiền, Trần Thị Nguyệt Minh, *Kết quả nghiên cứu một số tác nhân gây bệnh thường gặp trên ngao Meretrix sp tại vùng ven biển Hải Phòng*, *Bản tin Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I*, Số 6 (Quý II năm 2012)
- [8] Bùi Quang Tề, *Bệnh do ngành bào tử Apicomplexa (Levine, 1978) Perkinsiosis*, phần 3, *Bệnh ký sinh trùng của động vật thủy sản*, Bệnh học thủy sản, 2008, Trang 259-266
- [9] Ngô Thị Thu Thảo, *Một số đặc điểm của ký sinh trùng Perkinsus sp. lây nhiễm trên nghêu lụa Paphia undulata ở Kiên Giang và Bà Rịa- Vũng Tàu*, *Tạp chí Khoa học*, Trường Đại học Cần Thơ, 2008, trang 222-230