TCVN TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8710-8 : 2012

Xuất bản lần 1

BỆNH THỦY SẢN – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN – PHẦN 8: BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY Ở TÔM

Aquatic animal disease. Diagnostic procedure - Part 8: Infectious myonecrosis

HÀ NỘI - 2012

Lời nói đầu

TCVN 8710-8:2012 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 8: Bệnh hoại tử cơ ở tôm

Aquatic animal disease – Diagnostic procedure – Part 8: Infectious myonecrosis

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 hoại tử cơ do vi rút gây ra ở tôm.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

Bệnh hoại tử cơ do vi rút ở tôm (Infectious myonecrosis)
Bệnh truyền nhiễm nguy hiểm gây ra bởi vi rút thuộc họ *Totiviridae* có vật chất di truyền là RNA mạch đôi, kích thước khoảng 7560 bp. Thể vi rút có dạng hình cầu hai mươi mặt, đường kính khoảng 40 nm.

3 Phương pháp chẩn đoán

3.1 Chẩn đoán lâm sàng

3.1.1 Dịch tễ học

Vi rút gây bệnh IMNV cảm nhiễm chủ yếu trên các tôm thuộc họ Tôm he (Penaeidae): *Penaeus vannamei, P. stylirostris, P. monodon*... gây tỉ lệ chết cao. Tỷ lệ tôm nhiễm bệnh trong ao, bể có thể lên đến 100 %, tỷ lệ gây chết khoảng 40 % đến 70 %.

Bệnh có thể lan truyền từ bố mẹ truyền vi rút gây bệnh cho con cái thông qua quá trình sinh sản. Hoặc bệnh lan truyền thông qua những sinh vật mang mầm bệnh vào vùng nuôi như chim ăn những con tôm bệnh hoặc tôm chết thải phân ra ngoài môi trường nuôi, thông qua kí chủ trung gian mang mầm bệnh vào ao bể nuôi, qua dùng chung dụng cụ, nguồn nước nhiễm bệnh.

Bệnh xuất hiện quanh năm, đặc biệt là mùa xuân và đầu hè khi thời tiết biến đổi nhiều như biên độ trong ngày biến thiên quá lớn, thay đổi độ mặn gây sốc cho tôm

3.1.2 Triệu chứng lâm sàng

Giai đoạn cấp tính của bệnh IMNV: cơ vân tôm vùng bụng kéo dọc đến phần đuôi bị hoại tử, có màu trắng đục. Tôm bơi lờ đờ, dạt bờ rồi chết. Tôm chết nhiều liên tiếp trong vài ngày, tỉ lệ tôm chết có thể lên đến 40 % đến 70 % trong ao nhiễm.

CHÚ THÍCH: Trong một số trường hợp, tôm bị stress do yếu tố môi trường hoặc tôm bị bệnh trắng đuôi cũng thể hiện dấu hiệu bệnh lý tương tự.

3.2 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

3.2.1 Phương pháp RT-PCR (Phản ứng chuỗi polymer phiên mã ngược)

3.2.1.1 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 mồi, bốn loại nucleotit gồm adenin (dATP), thymin (dTTP), guanin (dGTP), cytocin (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 axit nucleic đích là RNA. Để có thực hiện được PCR này thì trước hết RNA đích phải được phiên mã ngược (RT- reverse transcription) thành cDNA bằng mồi 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 mồi, 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.

3.2.1.2 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và sử dụng nước cất hai lần đã khử ion hoặc nước có độ tinh khiết tương đương không có RNAase, trừ khi có quy định khác.

- 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.

- Dung dịch DEPC

Dung dịch di-etypyrocacbonat 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 pH 7,6.

- 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.

3.2.1.3 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 đong, 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.

3.2.1.4 Lấy mẫu

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

Tôm bố mẹ: lấy mẫu phần đuôi tôm bố mẹ.

Tôm giống (> postlarvae 8, hay hậu ấu trùng lớn hơn 8 ngày tuổi) đến tôm trưởng thành: lấy chân bơi của từ 5 con đến 10 con.

Tôm nhỏ hơn tôm giống (nhỏ hơn postlarvae 8): lấy phần đầu của từ 10 con đến 15 con.

Ấu trùng biến thái: lấy cả con, khoảng 50 con.

Lượng mẫu lấy để tách chiết RNA khoảng 20 mg, có thể dùng tôm còn sống hoặc mẫu tôm, mẫu phân cố định trong etanol 95 % để tách chiết RNA.

3.2.1.5 Cách tiến hành

3.2.1.5.1 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 kít thương mại hữu ích cho việc tách chiết RNA...). Người sử dụng có thể lựa chọn bộ kít 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).

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 12 000 *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 12 000 *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 12 000 *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 (dietyl 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 hoá chất này. Luôn luôn đeo gang tay, khẩu trang, mặc quần áo bảo hộ khi thực hiện các thao tác này.

3.2.1.5.2 Tiến hành phản ứng RT-PCR

3.2.1.5.2.1 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 của vi rút IMNV sử dụng cặp mồi 4587F/4914R và 4725NF/4863NR (Bảng 1).

Bảng 1 – Trình tự về cặp mồi

Mồi	Trình tự nucleotit
4587F	CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA
4914R	ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT
4725 NF	GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA
4863 NR	AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G

Cặp mồi 4587F/4914R dùng để khuếch đại đoạn gen của vi rút IMNV có kích thước 328 bp. Cặp mồi 4725NF/4863NR dùng để khuếch đại đoạn gen có kích thước 139 bp.

Chuẩn bị mồi:

– Mồi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm ngắn để mồi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Lần đầu tiên nên dùng đệm TE để hoàn nguyên mồi ở nồng độ 200 pmol/µl làm gốc.

– Mồi được sử dụng ở nồng độ 20 pmol/µl: pha loãng mồi gốc bằng nước không có nuclease (10 µl mồi gốc và 90 µl nước).

3.2.1.5.2.2 Chuẩn bị phản ứng

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

Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng RT-PCR bước một và bước hai theo số mẫu chẩn đoán, cộng thêm một mẫu đối chứng dương và một mẫu đối chứng âm, trộn chung vào một ống Eppendorf.

Sau đó hút 22,5 µl hỗn hợp phản ứng vào ống Eppendorf 0,2 ml, ghi kí hiệu mẫu lên nắp ống Eppendorf, mẫu đối chứng dương và mẫu đối chứng âm.

3.2.1.5.2.3 Tiến hành phản ứng PCR bước 1

Thêm 2,5 µl RNA mạch khuôn (tách chiết được) vào ống PCR chứa sẵn 22,5 µl hỗn hợp phản ứng RT-PCR (thành phần gồm: dung dịch đệm 1X EZ; mỗi loại dNTP có nồng độ 300 µM; mồi 4587F, 4914R có nồng độ 0,465 µM; $Mn(OCOCH_3)_2$ 2,5 mM và nước cho đủ thể tích để được hỗn hợp với tổng thể tích 25 µl.

Hỗn hợp phản ứng RT-PCR bước 1, xem Bảng 2.

Bảng 2 – Hỗn hợp phản ứng RT-PCR bước 1

Thành phần	Thể tích cho 1 mẫu (25 µl), µl	Nồng độ cuối cùng
Dung dịch đệm EZ (5X)	5	1 X
dNTP (10 mM mỗi loại)	0,75	300 µM
rTth Enzyme (2,5 U/µl)	1	0,1 U
Mồi 4587F	0,582 (20 µM)	0,465 µM
Mồi 4914R	0,582 (20 µM)	0,465 µM
$Mn(OCOCH_3)_2$ (25 mM)	2,5	2,5 mM
RNA mạch khuôn	2,5	
Nước	12,086	

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

Chu trình nhiệt của phản ứng RT-PCR bước 1 được nêu trong Bảng 3.

Bảng 3 – Chu trình nhiệt của phản ứng RT-PCR bước 1

Bước	Nhiệt độ/thời gian	Số chu kỳ
Tạo cDNA	60 °C/30 min	1
Biến tính	95 °C/2 min	1
Biến tính	95 °C/45 s	39
Bắt cặp	60 °C/45 s	
Kéo dài mạch	60 °C/7 min	1
Giữ ổn định	4 °C	Giữ ổn định

Sản phẩm khuếch đại bảo quản ở 4 °C cho đến khi điện di.

3.2.1.5.2.4 Tiến hành phản ứng RT-PCR bước 2

Thêm 0,5 µl RNA mạch khuôn (sản phẩm PCR bước 1) vào ống PCR chứa sẵn 24,5 µl hỗn hợp phản ứng RT-PCR (thành phần gồm: mỗi dNTP có nồng độ 200 µM; magie clorua 1,5 mM và 2,5 U của Taq DNA polymerase, mỗi mồi 4725 NF, 4863 NR có nồng độ 0,465 µM và nước cho đủ thể tích) để được hỗn hợp PCR với tổng thể tích 25 µl.

Có thể sử dụng thành phần hoá chất riêng lẻ hay sử dụng hỗn hợp phản ứng thương mại vẫn đảm bảo nồng độ cuối cùng của các thành phần trên.

Ví dụ về sử dụng hỗn hợp phản ứng RT-PCR bước 2, sử dụng hỗn hợp phản ứng Go Taq Green Master Mix của Promega 2 X, xem Bảng 4.

Bảng 4 – Hỗn hợp phản ứng RT-PCR bước 2

Thành phần	Thể tích cho 1 mẫu, µl	Nồng độ cuối cùng
Promega Gotag Green Master Mix, 2X	12,5	1 X
Mồi 4725 NF	0,582 (20 µM)	0,465 µM
Mồi 4863 NR	0,582 (20 µM)	0,465 µM
Sản phẩm bước 1	0,5	
Nước	10,836	

Sau khi pha hỗn hợp cho mỗi phản ứng, đặt hỗn hợp vào máy luân nhiệt. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR bước 2 được nêu trong Bảng 5.

Bảng 5 – Chu trình nhiệt của phản ứng RT-PCR bước 2

Bước	Nhiệt độ/thời gian	Số chu kỳ
Biến tính	95 °C/2 min	1
Biến tính	95 °C/30s	39
Bắt cặp	65 °C/30 s	
Kéo dài mạch	72 °C/30 s	
Kéo dài mạch	72 °C/2 min	1
Giữ ổn định	4 °C	Giữ ổn định

CHÚ Ý: Mẫu, 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.

3.2.1.5.3 Chạy điện di

3.2.1.5.3.1 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.

3.2.1.5.3.2 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 Loading dye 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.

3.2.1.5.4 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 6 – Kết quả điện di

Giếng	Vạch 328 bp	Vạch 139 bp	Kết quả
Thang DNA	Phân vạch rõ ràng và sáng theo kích thước sử dụng		Điện di tốt
Mẫu đối chứng dương tính	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 IMNV
	Không	Có	Dương tính với IMNV
	Không	Không	Âm tính với IMNV
	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 328 bp bước 1 và 139 bp bước 2 hoặc chỉ có vạch 139 bp bước 2. 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 139 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.

3.2.2 Phương pháp mô học

3.2.2.1 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và sử dụng nước cất hai lần đã khử ion hoặc nước có độ tinh khiết tương đương không có RNAase, trừ khi có quy định khác.

- Dung dịch Davidson (xem A.1).
- Thuốc nhuộm hematoxylin (xem A.2).
- Thuốc nhuộm eosin (xem A.3).
- Etanol 70 %, 90 % và etanol tuyệt đối.
- Parafin.
- Xylen.
- Keo dán, ví dụ Bom Canada.

3.2.2.2 Thiết bị, dụng cụ

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

- Kính giải phẫu.
- Bộ đồ giải phẫu gồm các dụng cụ panh, rùi nhọn, giải phẫu kéo các loại, lam kính và lamen.
- Lọ nhỏ cố định mẫu.
- Bình rót parafin.
- Bộ phận làm lạnh mẫu.
- Máy cắt mẫu microtome.
- Nồi nước có chỉnh nhiệt độ.

- Tủ ấm hoặc bàn sấy mẫu.
- Kính hiển vi quang học.
- Cassete.
- Khung đúc mẫu.

3.2.2.3 Lấy mẫu

Thu những mẫu tôm có dấu hiệu bệnh (như mô tả dấu hiệu bệnh lý phần trên).

Không dùng tôm chết hoặc tôm bảo quản đá để cắt mô.

3.2.2.4 Cách tiến hành

3.2.2.4.1 Chuẩn bị mẫu

Cố định mẫu trong dung dịch Dadvison. Đối với ấu trùng hoặc tôm hậu ấu trùng có thể cố định cả con trong dung dịch Dadvidson từ 12 h đến 24 h. Số tôm thu từ 30 con đến 50 con mỗi bể. Sau đó cố định trong etanol 70 % ở nhiệt độ phòng.

Đối với tôm lớn cố định bằng cách lấy tôm sống cắt lấy phần cơ đuôi, cơ bụng, sau đó cho vào lọ có chứa dung dịch Dadvison. Số tôm thu từ 5 con đến 10 con một ao. Nếu mẫu lớn cần phải cắt nhỏ, chiều dài mẫu không quá 1 cm. Tỷ lệ mẫu và dung dịch cố định là 1/10, ngâm trong 24 h đến 72 h phụ thuộc vào kích thước của mẫu, sau đó bảo quản ngay trong etanol 70 % ở nhiệt độ phòng.

3.2.2.4.2 Khử mẫu cố định

Ngâm trong etanol 90 % hai lần, trong thời gian 30 min đến 60 min mỗi lần. Sau đó ngâm trong etanol tuyệt đối hai lần, thời gian 30 min đến 60 min mỗi lần.

3.2.2.4.3 Làm trong mẫu

Ngâm sang lọ xylen 1 để trong 30 min đến 60 min.

Ngâm sang lọ xylen 2 để trong 30 min đến 60 min.

Sau đó ngâm tẩm parafin hai lần, mỗi lần 56 °C đến 58 °C trong 1 h.

Đúc khuôn: Đặt mẫu đã thấm parafin vào khuôn đổ parafin tập trung vào một mặt của khuôn để khi cắt được tốt hơn. Làm lạnh mẫu trong bàn lạnh hoặc để trong tủ lạnh.

3.2.2.4.4 Cắt mẫu

Cắt gọt khối block parafin vuông, mặt cắt bằng phẳng, để trên mặt khay đá.

Đặt mặt khối block parafin song song với mép lưỡi dao, cắt chiều dày lát cắt từ 4 µm đến 5 µm.

Chọn lát cắt tiêu bản phẳng thả vào nồi nước nhiệt độ nước từ 30 °C đến 35 °C; sau đó dùng lam kính vớt lát cắt tiêu bản. Để khô.

3.2.2.4.5 Nhuộm tiêu bản H&E

Tẩy parafin bằng cách ngâm trong xylen hai lần, mỗi lần từ 3 min đến 5 min, sau đó ngâm lần lượt trong etanol tuyệt đối, etanol 90 % và etanol 70%, mỗi lần ngâm từ 3 min đến 5 min rồi đem rửa dưới vòi nước chảy từ 3 min đến 5 min.

Ngâm trong thuốc nhuộm haematoxylin từ 3 min đến 5 min sau đó rửa dưới vòi chảy từ 3 min đến 5 min rồi tiếp tục ngâm trong thuốc nhuộm eosin từ 1 min đến 2 min.

Làm mất nước trong mẫu qua các thang nồng độ etanol 75 %, etanol 90 % và etanol tuyệt đối, mỗi bước từ 1 min đến 2 min, chuyển sang xylen hai lần (mỗi lần từ 2 min đến 3 min), gắn lamen bằng keo dán, ví dụ Bom Canada. Để khô và soi kính.

3.2.2.4.6 Đọc kết quả

Soi tiêu bản từ độ phóng đại thấp đến độ phóng đại cao (100 X, 400 X, 1000 X)

Khi tôm bị bệnh IMNV, kết quả mô bệnh học cho thấy các vị trí hoại tử ở các sợi cơ vân và có hiện tượng viêm, phù, xuất huyết giữa các sợi cơ, xuất hiện thể ẩn trong tế bào chất.

Tôm bị nhiễm nặng, phần cơ ở bụng bị hoại tử nghiêm trọng và sự xâm nhập với số lượng lớn của các tế bào máu vào vùng bị viêm.

3.2.3 Phương pháp lai tại chỗ (in situ hybridization - ISH)

3.2.3.1 Nguyên tắc

– Lai tại chỗ được phát triển triển từ phép lai Southern Blot.

Trình tự axit nucleic cần tìm không được tách chiết ra khỏi mô hay tế bào. Quá trình lai với mẫu dò đã được đánh dấu và phát hiện các phân tử lai được thực hiện ngay trên khuẩn lạc, nhiễm sắc thể, tế bào hay lát cắt mô.

3.2.3.2 Thuốc thử và vật liệu thử

– Dung dịch lai.

– Phosphatase kiềm và nitroblue tetrazolium và 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphat.

Xem 3.2.2.1.

3.2.3.3 Thiết bị, dụng cụ

Xem 3.2.2.2.

3.2.3.4 Lấy mẫu

Thu những con tôm có dấu hiệu bị bệnh (như mô tả dấu hiệu bệnh lý phần trên).

Mẫu tôm dùng để phân tích phải còn sống hoặc đang còn trong tình trạng hấp hối.

3.2.3.5 Chuẩn bị mẫu

Để phát hiện IMNV thì mẫu tôm phải được cố định bằng cách cắt lấy phần cơ đuôi, cơ bụng ngâm trong dung dịch không axit [dung dịch R-F (A.4)].

Ngâm mẫu cố định từ 12 h đến 24 h, sau đó lấy mẫu ra khỏi dung dịch cố định, rửa với nước trong 1 h đến 2 h và đem xử lý mẫu.

3.2.3.6 Xử lý mẫu

Mẫu tôm cố định được xử lý và cố định trong parafin và cắt (4 µm) theo hướng dẫn trong quy trình chuẩn.

3.2.3.7 Tiến hành lai

Cặp probe sử dụng trong quá trình lai, xem Bảng 7.

Bảng 7 – Cặp probe sử dụng trong quá trình lai

Probe	Trình tự nucleotit
IMNV 993F	5'-AACACAAAATCTGCCAGCAA-3'
IMNV 993R	5'-CCCAACCACCCAAATTCATA-3'

Quy trình sử dụng cho phương pháp ISH được mô tả bởi Lightner (1996).

Với phương pháp ISH, các mảnh cắt trên tiêu bản được phủ bởi 500 µl dung dịch lai (4 SSC, formamid 50 %, 1 Denhard's, dextran sulfat 5 % (khối lượng/thể tích), DNA tinh dịch cá hồi 0,5 µg/ml) có chứa IMNV probe (0,2 µg/ml). Tiêu bản được đặt trên bản nhiệt ở 84 °C trong 10 min. Làm lạnh trong đá trong thời gian 2 min và ủ qua đêm trong lò lai ở 42 °C. Sự tạo màu được thực hiện với kháng thể kháng digoxigenin được gắn với phosphatase kiềm và nitroblue tetrazolium và 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphat. Đọc kết quả dưới kính hiển vi quang học.

3.2.3.8 Đọc kết quả

Mẫu dương tính nếu có các thể vùi kết tủa màu xanh đến đen trong tế bào chất, những tế bào không bị nhiễm virus thì cấu trúc mô bình thường và bắt màu thuốc nhuộm bổ sung (màu cam).

Mẫu âm tính nếu không có màu xanh hoặc đen, chỉ bắt màu màu thuốc nhuộm bổ sung và có màu cam sau quá trình lai.

4 Báo cáo kết quả chẩn đoán

Tôm được xác định nhiễm bệnh IMNV khi có đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng của bệnh và kết quả dương tính trong các phương pháp sau:

- Phản ứng RT-PCR phát hiện vi rút dương tính;
- Mẫu cắt mô có bệnh tích của vi rút IMNV;
- Kết quả lai tại chỗ dương tính với IMNV.

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị dung dịch thuốc thử

A.1 Dung dịch Davidson

Etanol 95 %	330 ml
Formalin (formaldehyd 37 %) :	220 ml
Axit axetic đậm đặc:	115 ml
Nước:	335 ml

A.2 Thuốc nhuộm hematoxylin (dung dịch hematoxylin – Mayer)

Hematoxylin dạng tinh thể:	1 g
Natri iodat:	0,2 g

Amoni alum [$NH_4Al(SO_4)_2$] hoặc kali alum [$KAl(SO_4)_2$]: 50 g

Axit axetic:	1 g
Cloral hydrat:	50 g
Nước:	1000 ml

Hoà tan hematoxylin trong nước, sau đó cho natri iodat và amoni alum hoặc kali alum, hoà tan, tiếp tục cho axit axetic và chloral hydrat rồi lọc qua giấy lọc.

Bảo quản dung dịch đã pha trong chai tối màu.

A.3 Thuốc nhuộm eosin

Eosin Y:	1 g
Etanol 70 %:	1 lít
Axit axetic băng:	5 ml

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

Bảo quản dung dịch đã pha trong chai tối màu.

A.4 Dung dịch R-F (RNA – friendly)

Formaldehyd 37 %:	349 ml
Cồn 95 %:	407 ml
Nước:	244 ml

Chỉnh pH = 7.

Thư mục tài liệu tham khảo

[1] Bonnie T.Poulos. 2006. Donald V Lightner , Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

[2] Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals, 2010. *Viral encephalopathy and retinopathy.*

[3] Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals, 2009. *Infectious myonecrosis.*

[4] Tang et al. 2005. K.F.J. Tang, C.R. Pantoja, B.T. Poulos, R.M. Redman and D.V. Lightner. *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei, L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV), *Dis. Aquat. Org.* **63**, pp. 261–265.