

TCVN 8710-6 : 2012

Xuất bản lần 1

**BỆNH THỦY SẢN – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 6: BỆNH DO KOI HERPESVIRUS Ở CÁ CHÉP**

Aquatic animal disease - Diagnostic procedure -

Part 6: Koi herpesvirus disease

HÀ NỘI - 2012

Lời nói đầu

TCVN 8710-6:2012 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 6: Bệnh do *Koi herpesvirus* ở cá chép

Aquatic animal disease – Diagnostic procedure –

Part 6: Koi herpesvirus disease

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 do KHV (*Koi herpesvirus*) ở cá chép.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

Bệnh do KHV ở cá chép (*Koi herpesvirus* disease)

Bệnh truyền nhiễm nguy hiểm gây ra bởi vi rút *Koi herpesvirus* thuộc họ Herpesviridae.

CHÚ THÍCH 1: Vi rút dạng hình cầu hai mươi mặt, có axit nucleic là DNA mạch đôi, kích thước khoảng 277 kbp.

CHÚ THÍCH 2: Hiện nay đã có ba chủng vi rút được nghiên cứu và mô tả: KHV phân lập từ Israel, Mỹ và Nhật Bản. Kết quả giải mã di truyền gen của ba chủng vi rút này cho thấy sự tương đồng về kiểu gen là rất cao. Tuy nhiên, bộ gen của vi rút phân lập từ Israel và Mỹ có độ tương đồng cao hơn so với bộ gen phân lập từ Mỹ so với Nhật Bản, Israel và Nhật Bản.

3 Phương pháp chẩn đoán

3.1 Chẩn đoán lâm sàng

3.1.1 Dịch tễ học

Đặc điểm phân bố: Bệnh do KHV trở thành bệnh dịch động vật thủy sản ở các loài cá thuộc họ Cá chép: *Cyprinus carpio carpio*, *Cyprinus carpio koi*, *Cyprinus carpio goi* và các dòng cá chép lai.

Giai đoạn cảm nhiễm: cá giống từ 2,5 g đến 6 g dễ cảm nhiễm hơn cá lớn hơn 230 g.

Tỉ lệ cảm nhiễm và tỉ lệ chết liên quan đến nhiệt độ nước: tỉ lệ chết có thể lên đến 100 % ở nhiệt độ khoảng 18 °C đến 28 °C. Trong điều kiện thí nghiệm, kết quả cho thấy rằng tỉ lệ chết giảm ở nhiệt độ dưới 13 °C hoặc nhiệt độ trên 30 °C.

Con đường xâm nhập của vi rút: vi rút có khả năng tồn tại trong môi trường nước ít nhất 4 h, vi rút xâm nhập qua da và mang, gây tổn thương da, mang sau đó xâm nhập đến các cơ quan nội tạng: thận, gan, lách, mô ruột. Thể vi rút tấn công vào nhân, tế bào chất của tế bào vật chủ. Vì vậy, bệnh lây lan từ cá bệnh sang cá khỏe, từ dòng nước nhiễm vi rút, từ vật chủ trung gian, các loài chim ăn cá có mang KHV vào vùng nuôi.

3.1.2 Triệu chứng lâm sàng

Trạng thái: dấu hiệu đầu tiên cá ngạt thở, giảm ăn, bơi gần tầng mặt, mang và da cá có màu sắc nhợt nhạt, mang bị hoại tử, xuất huyết tơ mang, mắt lồi xuống, da mất nhớt, có thể bị hoại tử.

Cá bị bệnh do KHV rất dễ bị nhiễm các tác nhân thứ cấp khác, khi lấy nhớt mang kiểm tra dưới kính hiển vi thường gặp số lượng lớn vi khuẩn, nấm và kí sinh trùng ngoại kí sinh khác nhau: *Argulus* sp, *Chilodonella* sp, *Cryptobia* sp, *Dactylogyrus* sp, *Gyrodactylus* sp...

Dấu hiệu bên trong của bệnh do KHV: gan, thận có trường hợp sưng to hơn bình thường, có thể bị xuất huyết.

Trong trường hợp cấp tính: cá chết rất nhanh mà không thể hiện dấu hiệu tổn thương cơ quan nội tạng.

Cơ quan đích: mang, gan, thận, lách và ruột, máu.

3.2 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm (Phương pháp PCR)

3.2.1 Nguyên tắc

Phương pháp PCR dựa trên hoạt động của DNA polymerase tổng hợp nên mạch-mới từ mạch khuôn, có sự tham gia của mỗi bốn loại nucleotit gồm adenin (dATP), thymin (dTTP), guanin (dGTP), cytosin

(dCTP), dùng để khuếch đại đoạn DNA đích thông qua các chu trình nhiệt. Việc thực hiện phản ứng khuếch đại DNA đích gồm 3 quá trình: biến tính, bắt cặp và kéo dài mạch tổng hợp mạch DNA mới.

3.2.2 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.

- Dung dịch đệm TE (Tris - EDTA)

Chuẩn bị dung dịch chứa Tris [tris (hydroxymetyl) aminometan] 10 mM và EDTA 1 mM, dùng axit clohydric (HCl) để chỉnh pH 7,6.

- 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 pH 8,0 bằng dung dịch NaOH nồng độ 4 M. Thêm nước cho đủ 500 ml. Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

- Dung dịch DEPC

Dung dịch diethylpyrocacbonat 0,1 % thể tích, lắc trộn đều khoảng 10 min. Sau đó để qua đêm trong bình kín, nơi lồng nắp và hấp khử trùng ở 121 °C trong 15 min, bảo quản ở nhiệt độ -20 °C.

- Bộ kit tách chiết DNA.

- Dung dịch đệm tải mẫu DNA đậm đặc 6 lần (loading dye 6X)

Chuẩn bị dung dịch gồm Tris - HCl 10 mM (pH 7,6); xanh bromophenol 0,03 %; xylene cyanol FF 0,03 %; glycerol 60 % và EDTA 60 mM (sử dụng dung dịch EDTA 0,5 M). Bảo quản ở nhiệt độ -20 °C.

- Etanol 95° (95 % thể tích).

- 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.

- Agarose.

3.2.3 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm chẩn đoán bệnh. Yêu cầu cơ bản là phòng thử nghiệm cần có các khu vực riêng biệt để thao tác tách chiết DNA, tiến hành phản ứng PCR và điện di đọc kết quả.

- Tủ lạnh;
- Tủ lạnh âm sâu, có thể hoạt động ở nhiệt độ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- Máy li tâm, có thể hoạt động với gia tốc 13 000 g;
- Tủ ấm, có thể hoạt động ở nhiệt độ $95\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- Nồi cách thủy hay block nhiệt khô, có thể hoạt động ở nhiệt độ $95\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- Máy lắc trộn vortex;
- Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg;
- Đèn cồn;
- 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 ;
- Máy luân nhiệt (máy PCR);
- Bếp điện hoặc lò vi sóng;
- Ống đong, dung tích 100 ml; 500 ml; 1000 ml;
- Bình nón bằng thủy tinh chịu nhiệt, dung tích 250 ml;
- Bộ điện di gồm bộ nguồn và máng chạy điện di;
- Bể đổ gel;
- Bàn đọc gel (UV);
- Giấy parafin.

3.2.4 Lấy mẫu

Thu khoảng 10 con cá có dấu hiệu bệnh.

Cá có kích thước nhỏ hơn 4 cm: dùng kéo cắt bỏ phần thịt thân cá tới phía sau hậu môn, lấy phần nội tạng sau đó cho vào ống Eppendorf 1,5 ml sạch.

Cá có kích thước từ 4 cm đến 6 cm: lấy toàn bộ thận, gan, lách chứa trong ống nhựa (có thể dùng ống Eppendorf 1,5 ml).

Mẫu được bảo quản trong thùng chứa có thành dày, xếp đá sao cho nhiệt độ luôn đảm bảo khoảng 4 °C, trong 24 h phải xử lý ngay. Khi bảo quản ở -80 °C, mẫu có thể giữ được tới vài năm.

Có thể cố định mẫu trong etanol 95°. Lượng mẫu lấy để tách chiết DNA khoảng 20 mg cố định trong etanol 95°.

3.2.5 Cách tiến hành

3.2.5.1 Tách chiết DNA

CHÚ THÍCH: Hiện nay có rất nhiều thuốc thử và bộ kit thương mại tiện lợi cho việc tách chiết DNA (QiaGen, Promega...). Người sử dụng có thể lựa chọn bộ kit thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví dụ quy trình tách chiết DNA bằng Lysis Buffer (kit IQ2000KHV):

Cho mẫu vào ống Eppendorf 1,5 ml.

Nếu mẫu 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 tách chiết, nghiền nhỏ và mịn bằng chày nghiền, sau đó thêm vào khoảng 300 µl đến 400 µl dung dịch tách chiết và nghiền tiếp đến khi nhuyễn.

Ủ mẫu ở nhiệt độ 95 °C trong 10 min, ly tâm 12000 g trong thời gian 10 min.

Chuyển 200 µl phần dịch nổi sang ống Eppendorf mới có chứa 400 µl etanol 95°, trộn trên máy lắc trộn vortex hoặc lắc nhẹ.

Ly tâm 12000 g trong thời gian 5 min, sau đó loại bỏ etanol và làm khô mẫu.

Hòa tan DNA bằng nước tinh khiết hoặc dung dịch đệm TE 1X với lượng khoảng từ 50 µl đến 200 µl tùy thuộc vào lượng DNA tách chiết được.

CẢNH BÁO: Tách chiết axit nucleic phụ thuộc vào việc phân giải hay hoà tan của các mô và sự phân tách của axit nucleic từ hỗn hợp kết cấu phức tạp. Hầu như các quy trình đều 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.

3.2.5.2 Tiến hành phản ứng PCR

3.2.5.2.1 Cặp mồi sử dụng trong phản ứng PCR

Ví dụ về phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy luân nhiệt theo phương pháp PCR khuếch đại DNA đặc hiệu của KHV, sử dụng cặp mồi của Bercovier TK:

Bảng 1 – Trình tự về cặp mồi

Mồi	Trình tự nucleotit
Mồi xuôi	5'-GGG- TTA-CCT-GTA-CGA-G-3'
Mồi ngược	5'-CAC-CCA-GTA-GAT-TAT-GC-3'

Cặp mồi trên dùng để khuếch đại đoạn DNA của KHV có kích thước 409 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).

3.2.5.2.2 Chuẩn bị phản ứng

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

Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị trong 1 ống Eppendorf dựa trên tổng số mẫu cần chẩn đoán, cộng thêm một mẫu đối chứng dương và một mẫu đối chứng âm. 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.

3.2.5.2.3 Tiến hành phản ứng PCR vòng ngoài (bước 1)

Thêm 2,5 μl DNA mạch khuôn (tách chiết được) vào ống PCR chứa sẵn 22,5 μl hỗn hợp phản ứng PCR (thành phần gồm: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 9; Triton X-100 0,1 %; mỗi dNTP có nồng độ

0,2 mM; $MgCl_2$ 1,5 mM; mỗi mỗi xuôi và mỗi ngược có nồng độ 1 μM ; 1,25 U of Taq DNA polymerase và nước cho đủ thể tích) để được hỗn hợp PCR với tổng thể tích 25 μl .

Có thể sử dụng thành phần thuốc thử riêng lẻ hay sử dụng hỗn hợp phản ứng thương mại sao cho đảm bảo nồng độ cuối cùng của các thành phần như trên, ví dụ sử dụng hỗn hợp phản ứng Go Taq Green Master Mix của Promega, 2X có thành phần 2X green Go Taq Reaction Buffer (pH 8,5); dATP 400 μM ; dGTP 400 μM ; dTTP 400 μM ; dCTP 400 μM ; $MgCl_2$ 3 mM; Taq DNA polymerase và chất đệm tải mẫu (yellow dye và blue dye) nên khi chạy gel không cần thêm chất đệm tải mẫu (loading dye).

Ví dụ về hỗn hợp phản ứng PCR sử dụng hỗn hợp phản ứng Go Taq Green Master Mix của Promega, 2X như trong Bảng 2.

Bảng 2 – Hỗn hợp phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích cho một mẫu, μl	Nồng độ cuối cùng
Promega Gotag Green Master Mix, 2X	12,5	1 X
Mỗi xuôi	1,25 (20 μM)	1 μM
Mỗi ngược	1,25 (20 μM)	1 μM
DNA mạch khuôn	2,5	
Nước	7,5	

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

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR được nêu trong Bảng 3.

Bảng 3 – Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

Bước	Nhiệt độ/thời gian	Số chu kỳ
	94 °C/5 min	1
Biến tính	95 °C/1 min	40
Bắt cặp	55 °C/1 min	
Kéo dài mạch	72 °C/1 min	
Kéo dài mạch	72 °C/10 min	1
	4 °C	Giữ ổn định

CHÚ Ý: Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

3.2.5.3 Chạy điện di

3.2.5.3.1 Chuẩn bị bản gel

Pha thạch với nồng độ agarose từ 1,5 % đến 2 % 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, khi nhiệt độ giảm xuống khoảng 40 °C đến 50 °C thì 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, 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 agarose đã đun) vào máng điện di cho tới khi ngập bản gel.

3.2.5.3.2 Điện di

Hút 10 µl sản phẩm PCR nhỏ vào một giếng trên bản gel.

Khi thực hiện điện di, chạy kèm theo thang trọng lượng phân tử chuẩn 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, trong thời gian 35 min đến 40 min.

CHÚ Ý: Trong trường hợp Master Mix không có sẵn đệm tải mẫu thì khi tiến hành điện di nhỏ 2 µl đệm tải mẫu 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.

3.2.5.4 Đọc kết quả

Sau khi điện di xong, đọc kết quả trên bàn đọc UV, đọc kết quả với tia UV ở bước sóng 302 nm.

Đối chiếu các vạch sáng của mẫu với các vạch sáng từ thang DNA, mẫu đối chứng dương và mẫu đối chứng âm để đưa ra kết luận.

Bảng 4 – Kết quả điện di

Giếng	Vạch 409 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	Hỗn hợp phản ứng PCR tốt
	Không	Mẫu đối chứng dương tính hỏng, enzym hỏng
Mẫu đối chứng âm tính	Không	Không ngoại nhiễm
	Có	Bị ngoại nhiễm
Mẫu	Có	Dương tính với KHV
	Không	Âm tính với KHV

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 409 bp, thang DNA phân vạch rõ ràng, mẫu đối chứng âm không có vạch sáng.

Kết quả mẫu thử âm tính khi mẫu không có vạch sáng kích thước 409 bp. Không có vạch sáng của mẫu đối chứng âm tính, thang DNA phân vạch rõ ràng, mẫu đối chứng dương có vạch sáng 409 bp.

4 Báo cáo kết quả chẩn đoán

Mẫu được xác định nhiễm bệnh do KHV khi có đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng của bệnh và kết quả phản ứng PCR phát hiện vi rút dương tính.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Bercovier H., Fishman Y., Nahary R., Sinai S., Zlotkin A., Eyngor M., Gilad O., Eldar A. & Hedrick R.P. 2005. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiol.*, **5**, 1–9.
 - [2] Bùi Quang Tề. 2008. *Bệnh học thủy sản*.
 - [3] Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals, 2010. Chương 2.3.6. *Koi herpesvirus disease*.
-