

TCVN 8710-17:2016

Xuất bản lần 1

**BỆNH THỦY SẢN - QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN -
PHẦN 17: BỆNH SỮA TRÊN TÔM HÙM**

*Aquatic animal disease - Diagnostic procedure -
Part 17: Milky haemolymph disease of spiny lobsters*

Lời nói đầu

TCVN 8710-17:2016 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 các phần sau:

- 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 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 hydrophyla ở cá;*
- TCVN 8710-16:2016, *phần 16: Bệnh gan thận mù ở cá da trơn;*
- TCVN 8710-17:2016, *phần 17: Bệnh sứa trên tôm hùm.*

Bệnh thủy sản - Quy trình chẩn đoán -

Phần 17: Bệnh sữa trên tôm hùm

Aquatic animal disease - Diagnostic procedure -

Part 17: Milky haemolymph disease of spiny lobsters

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 sữa do Rickettsia-like bacteria gây ra trên tôm hùm.

CHÚ THÍCH: Tiêu chuẩn này chỉ áp dụng chẩn đoán bệnh sữa trên tôm hùm với tác nhân gây bệnh là Rickettsia-like bacteria, không áp dụng đối với tác nhân gây bệnh khác.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1

Bệnh sữa trên tôm hùm (Milky haemolymph disease of spiny lobsters - MHD-SL)

Bệnh do vi sinh vật Rickettsia-like bacteria - RLB ký sinh nội bào trong máu và cơ quan tạo máu tôm hùm. Chúng gây biến đổi cấu trúc cơ quan tạo máu và làm cho máu tôm chuyển màu trắng sữa.

CHÚ THÍCH: Rickettsia-like bacteria là một loại vi sinh vật gram âm, dạng que, cong, kích thước từ 1,5 µm đến 2,5 µm, tồn tại tự do, dày đặc trong hemolymph của tôm bệnh và trong nguyên sinh chất của các tế bào của mô liên kết của gan tụy.

3 Thuốc thử và vật liệu thử

TCVN 8710-17:2016

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 không có nuclease, trừ khi 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 nhuộm Giemsa

3.2.1 Dung dịch Giemsa đậm đặc (xem A.1).

3.2.2 Dung dịch đệm phosphat (xem A.2).

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng thuốc nhuộm Giemsa thương mại và pha loãng theo hướng dẫn của nhà sản xuất

3.3 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phương pháp chẩn đoán bằng PCR (Polymerase Chain Reaction)

3.3.1 Kít tách chiết ADN (axit deoxyribonucleic), Protein K.

3.3.2 Kít nhân gen (PCR Master Mix Kit).

3.3.3 Cặp mồi (primers), gồm mồi xuôi và mồi ngược.

3.3.4 Agarose.

3.3.5 Dung dịch đệm TAE (Tris-acetate - EDTA) hoặc TBE (Tris-borate - EDTA) (xem A.3).

3.3.6 Chất nhuộm màu, ví dụ: Sybr safe.

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

3.3.8 Dung dịch đệm TE (Tris-axit etylendiamintetraaxetic).

3.3.9 Thang chuẩn ADN (Marker).

3.3.10 Nước tinh khiết, không có nuclease.

3.4 Thuốc thử và vật liệu dùng cho phương pháp mô bệnh học

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

3.4.2 Xylen.

3.4.3 Thuốc nhuộm Haematoxylin (xem A.4).

3.4.4 Thuốc nhuộm Eosin (xem A.5).

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

3.4.6 Dung dịch Davidson (xem A.6).

3.4.7 Keo dán lamén.

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 Phiến kính, vô trùng.

4.1.2 Lamén, vô trùng.

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

4.2 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp nhuộm Giemsa

4.2.1 Xi lanh, dung tích 1 ml.

4.2.2 Bể ủ nhiệt, duy trì nhiệt độ từ 55 °C đến 60 °C.

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

4.3.1 Máy nhân gen (PCR).

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

4.3.3 Máy lắc trộn vortex.

4.3.4 Máy spindown.

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

4.3.6 Máy đọc gel.

4.3.7 Ống eppendorf, dung tích 1,5 ml.

4.4 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp mô bệnh học

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

4.4.2 Máy xử lý mẫu mô tự động.

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

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

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

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

4.4.7 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 ở các loài tôm hùm nuôi thuộc họ tôm hùm gai *Palinuridae*, giống *Panulirus* gồm một số loài: tôm hùm bông (*Panulirus ornatus*), tôm hùm đá (*P. homarus*), tôm hùm tre (*P. polyphagus*);
- Tôm thường nhiễm bệnh từ giai đoạn sớm, khoảng 250 g đến 400 g;
- Tôm chết sau 9 ngày đến 12 ngày phát hiện bệnh;
- Tác nhân gây bệnh là Rickettsia- like bacteria, ký sinh trong máu và cơ quan tạo máu của tôm hùm;
- Bệnh có thể lây nhiễm trực tiếp theo chiều ngang từ thức ăn có mang mầm bệnh; từ tôm bệnh sang tôm khỏe trong cùng một lồng hoặc gián tiếp qua môi trường nuôi;
- Bệnh xuất hiện rải rác quanh năm nhưng tập trung chủ yếu vào tháng 9 đến tháng 10 và từ tháng 12 năm trước đến tháng 3 năm sau. Bệnh xảy ra ở hầu hết các vùng nuôi tôm hùm.

5.2 Triệu chứng lâm sàng

- Tôm bệnh hoạt động kém, ít phản ứng với những tác động xung quanh;
- Giảm ăn hoặc bỏ ăn hoàn toàn;
- Sau từ 3 ngày đến 5 ngày bị nhiễm bệnh, các đốt ở phần bụng của tôm chuyển từ trắng trong sang lốm đốm trắng đục rồi chuyển thành trắng đục.

5.3 Bệnh tích

- Mô cơ ở phần bụng chuyển sang màu trắng đục hay vàng đục, nhão, có mùi hôi;

- Dịch tiết của cơ thể (bao gồm cả máu) có màu trắng đục như sữa, số lượng tế bào máu giảm nhiều so với tôm bình thường, máu khó đông;
- Gan tụy chuyển màu nhợt nhạt và có trường hợp bị hoại tử;
- Ở mô liên kết gan tụy và trong máu tôm bị bệnh có từng đám dày đặc sinh vật ký sinh nội bào Rickettsia-like bacteria.

6 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

6.1 Phương pháp nhuộm Giemsa

6.1.1 Lấy mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm được lấy là máu tôm hùm. Dùng xi lanh (4.2.1) lấy từ 0,1 ml đến 0,2 ml máu từ tim của tôm bằng cách chọc mũi kim qua gốc của chân ngực số 5. Nhỏ mẫu máu tôm thu được lên phiến kính (4.1.1) rồi dàn mỏng bằng lamên (4.1.2).

6.1.2 Bảo quản mẫu bệnh phẩm

- Để khô mẫu tự nhiên, hoặc hơi nhẹ phiến kính trên ngọn lửa đèn cồn;
- Bảo quản mẫu: Cố định mẫu bằng cách nhúng phiến kính (4.1.1) 2 lần vào etanol tuyệt đối (3.1.1);

6.1.3 Cách tiến hành

- Tiêu bản máu sau khi được cố định trong etanol tuyệt đối (3.1.1) trong 10 phút, rồi rửa bằng nước;
- Nhỏ dung dịch Giemsa ngập tiêu bản, để từ 20 min đến 30 min;
- Rửa nhanh bằng nước và sấy khô;
- Nhỏ một giọt dầu lên tiêu bản và xem hình thái Rickettsia-like bacteria dưới kính hiển vi (4.1.3) với vật kính 100 X.

6.1.4 Đọc kết quả

Mẫu tôm dương tính với bệnh sữa trên tôm hùm khi quan sát dưới kính hiển vi (4.1.3) cho thấy sự xuất hiện của Rickettsia-like bacteria bắt màu gram âm. Rickettsia-like bacteria hình que, dạng cong, có kích thước từ 1,5 μ m đến 2,5 μ m.

6.2 Phương pháp PCR (Polymerase chain reaction)

6.2.1 Lấy mẫu bệnh phẩm

- Mẫu máu: lấy từ 0,5 ml đến 1 ml máu tôm hùm;
- Mẫu mô: lấy phần mô mang và gan tụy của tôm.

6.2.2 Bảo quản mẫu bệnh phẩm

Trong quá trình vận chuyển:

- Bảo quản mẫu mang, gan tụy ở nhiệt từ 2 °C đến 8 °C không quá 24 h; hoặc trong etanol tuyệt đối (3.1.1);
- Bảo quản mẫu máu 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).

6.2.3 Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Mẫu máu: lấy từ 100 µl đến 200 µl máu đã loại bỏ etanol;
- Mẫu mô: cắt khoảng 30 mg phần mô mang và khối gan tụy.

Cho vào ống eppendorf 1,5 ml (4.3.7), chuẩn bị tách chiết.

6.2.4 Cách tiến hành

6.2.4.1 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: DNAeasy® Blood & Tissue Kit (250) (Cat No. 69506) (xem Phụ lục B).¹⁾

6.2.4.2 Chuẩn bị mồi

- Sử dụng cặp mồi 254F/254R. Trình tự cặp mồi được nêu trong bảng 1.

Bảng 1 – Cặp mồi 254F/254R

Mồi	Trình tự cặp mồi
254F (Mồi xuôi)	5'-CGA-GGA-CCA-GAG-ATG-GAC-CTT-3'
254R (Mồi ngược)	5'-GCT-CAT-TGT-CAC-CGC-CAT-TGT-3'

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.

Cặp mồi 254F/ 254R dùng để khuếch đại đoạn gen của Rickettsia- like bacteria có kích thước 254 bp.

Chuẩn bị mồi như sau:

Chuẩn bị mồi gốc:

- Mồi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.3.4) trong 30 s để mồi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên.
- Khi hoàn nguyên, nên dùng dung dịch đệm TE (3.3.8) 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 tinh khiết (3.3.10) (10 μ l mồi gốc và 90 μ l nước tinh khiết).

6.2.4.3 Tiến hành phản ứng PCR

Sử dụng một trong hai cặp mồi đã chuẩn bị (6.2.4.2) và sử dụng kit nhân gen (3.3.2) 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 một phản ứng được nêu trong bảng 2.

Bảng 2 – Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích, μ l
Dung dịch nhân gen (Taq PCR Master Mix)	12,5
Mồi xuôi 20 μ M	1
Mồi ngược 20 μ M	1
Nước tinh khiết không có nuclease	7,5
Tổng thể tích	22

Chuyển 22 μ l hỗn hợp nhân gen vào mỗi 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.

TCVN 8710-17:2016

- Mẫu kiểm chứng dương: Cho 3 µl mẫu ADN đã được giám định hoặc sử dụng các chủng Rickettsia-like bacteria chuẩn vào ống phản ứng;
- Mẫu kiểm chứng âm: Cho 3 µl nước tinh khiết (3.3.10) vào ống phản ứng;
- Mẫu thử: Cho 3 µl mẫu ADN kiểm tra vào ống phản ứng.

Tiến hành phản ứng PCR bằng máy nhân gen (4.3.1) đã cài đặt chu trình nhiệt được nêu trong bảng 3.

Bảng 3 – Chu trình nhiệt của phản ứng PCR với cặp mồi 254F/ 254R

Nhiệt độ, °C	Thời gian	Số chu kỳ, vòng
95	5 min	1
65	30 s	30
72	30 s	
95	30 s	
65	60 s	1
72	2 min	

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 thạch

Pha thạch với nồng độ agarose (3.3.4) từ 1,5 % đến 2 % bằng dung dịch đệm TBE 1X hoặc TAE 1X (3.3.5) 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 (3.3.6) 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 thạch vào bể chạy điện di (4.3.5), đổ dung dịch đệm (TBE 1X hoặc TAE 1X) (3.3.5) cùng loại với dung dịch pha thạch 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 (3.3.7) vào 8 µl sản phẩm PCR trộn đều và cho vào các giếng trên bản thạch.

Thực hiện điện di trong bộ điện di (4.3.5), chạy kèm theo thang chuẩn ADN (3.3.9) để dự đoán kích thước sản phẩm khuếch đại. Hút 10 µl thang chuẩn ADN (3.3.9) vào một giếng trên bản thạch.

Điện di ở hiệu điện thế 100 V trong thời gian 30 min.

6.2.5 Đọc kết quả

Sau khi điện di, đọc kết quả trên máy đọc gel (4.3.6) theo bảng 5.

Bảng 5 – Kết quả điện di

Giếng	Vạch 254 bp	Kết quả
Thang chuẩn ADN	Sáng và chia vạch rõ ràng	Điện di tốt
Mẫu kiểm chứng dương	Có	Hỗn hợp phản ứng PCR tốt
	Không	Mẫu đối chứng dương hỏng hoặc enzym hỏng
Mẫu kiểm chứng âm	Không	Không bị tạp nhiễm
	Có	Bị tạp nhiễm
Mẫu thử	Có	Dương tính với Rickettsia- like bacteria
	Không	Âm tính với Rickettsia- like bacteria

Đánh giá kết quả:

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.

Kết quả mẫu thử dương tính khi: Tại giếng mẫu thử xuất hiện vạch sáng có kích thước 254 bp. Thang chuẩn ADN phân vạch rõ ràng, mẫu kiểm chứng âm không có vạch sáng, mẫu kiểm chứng dương có kích thước 254 bp.

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 âm không có vạch sáng, mẫu kiểm chứng dương có kích thước 254 bp.

6.3 Kiểm tra bệnh tích vi thể bằng phương pháp mô bệnh học

6.3.1 Lấy mẫu

Xem 6.2.1.

6.3.2 Chuẩn bị và bảo quản mẫu

- Mẫu tôm còn sống tiến hành giải phẫu để thu các mô đích: gan tụy, mang, dạ dày;
- Cắt một phần mô đích ($< 1 \text{ cm}^3$), cố định mẫu trong dung dịch Davidson (3.4.6) với tỷ lệ thể tích 1 : 10;
- Đối với mô lớn cần tiêm dung dịch Davidson (3.4.6) vào trong mô đích trước khi ngâm trong dung dịch Davidson;
- Mẫu cố định trong dung dịch Davidson từ 36 h đến 48 h và bảo quản ở etanol 70 % (thể tích) (3.1.1) trong khoảng thời gian từ 24 h đến 72 h tùy thuộc vào kích thước mẫu. Phải dùng các dụng cụ vô trùng khi lấy mô ở các mẫu khác nhau để tránh lây nhiễm;
- Lấy miếng tổ chức cố định trong etanol 70 % (thể tích) ra, cắt miếng nhỏ dày khoảng 1 mm, dài khoảng 1 cm cho vào khuôn nhựa (4.4.1).

CHÚ THÍCH: Không dùng tôm chết hoặc tôm bảo quản đông lạnh để cắt mô.

6.3.3 Cách tiến hành

6.3.3.1 Đúc khuôn

Đặt khuôn nhựa (4.4.1) 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 (3.4.2) lần thứ 1, thời gian từ 2 h đến 3 h;

Ngâm khuôn nhựa vào cốc xylen (3.4.2) lần thứ 2, thời gian từ 2 h đến 3 h;

Ngâm khuôn nhựa vào cốc parafin (3.4.5) lần thứ 1, thời gian từ 2 h đến 3 h;

Ngâm khuôn nhựa vào cốc parafin (3.4.5) lần thứ 2, thời gian từ 2 h đến 3 h;

CHÚ THÍCH: Nếu sử dụng máy xử lý mẫu mô tự động (4.4.2) thì tiến hành tiếp theo từ bước ngâm etanol.

– Đúc khuôn: rót parafin (3.4.5) nóng chảy từ nồi đun parafin (4.4.3) vào khay sắt (4.4.4), gấp bệnh phẩm từ khuôn nhựa đặt vào khay sắt, đặt khuôn nhựa (4.4.1) lên trên. Để nguội, tách lấy khối parafin.

6.3.3.2 Cắt tiêu bản

- Cắt gọt khối parafin cho bằng phẳng, đặt trên mặt máy làm lạnh (4.4.5);
- Đặt khối paraffin lên máy cắt tiêu bản (4.4.6) sao cho mặt khối paraffin 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 μ m đến 5 μ m;
- Chọn lát cắt tiêu bản phẳng và lấy được hết các mô cần lấy, thả vào nồi dẫn tiêu bản (4.4.7) có nhiệt độ nước từ 35 °C đến 40 °C;
- Dùng phiến kính (4.1.1) vớt lát cắt sao cho lát cắt nằm gọn trên phiến kính, dựng nghiêng phiến kính và để khô.

6.3.3.3 Nhuộm tiêu bản

- Ngâm tiêu bản (6.3.3.2) vào cốc xylen (3.4.2) 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 (3.4.3), 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 (3.4.4), 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 (3.4.2) 2 lần, thời gian mỗi lần từ 2 min đến 3 min; gắn lamên (4.1.2) vào tiêu bản bằng keo dán lamên (3.4.7). Để khô, soi tiêu bản dưới kính hiển vi quang học (4.1.3).

6.3.4 Đọc kết quả

Mẫu dương tính khi thấy sự hiện diện của Rickettsia- like bacteria ký sinh nội bào ở mô liên kết của gan tụy và mang tạo nên các đám bắt màu tím của hematoxylin. Sự biến đổi mô học đặc thù ở tổ chức gan tụy thể hiện ở việc Rickettsia- like bacteria bao vây xung quanh các mạch máu nhỏ ở giai đoạn sớm của bệnh, sau đó chúng tấn công vào trong các mạch máu, tồn tại tự do trong đó và làm máu chuyển đục.

7 Kết luận

Tôm hùm được xác định là nhiễm bệnh sữa do Rickettsia- like bacteria khi có đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích điển hình của bệnh và có kết quả dương tính một trong ba phương pháp sau:

- Phát hiện Rickettsia- like bacteria trong máu tôm hùm bằng phương pháp nhuộm Giemsa;
- Có kết quả dương tính với Rickettsia- like bacteria bằng phương pháp PCR;
- Thể hiện những dấu hiệu mô học đặc trưng cho bệnh sữa.

Phụ lục A
(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị thuốc thử

A.1 Dung dịch Giemsa đậm đặc

A.1.1 Thành phần

Giemsa (dạng bột)	1,0 g
Glyxerin	66 ml
Cồn metanol nguyên chất	66 ml

A.1.2 Chuẩn bị

Làm nóng glyxerin trong bể ủ nhiệt (4.2.2). Thêm thuốc nhuộm Giemsa trộn đều và ủ trong 2 h. Sau đó để nguội và thêm cồn metanol và giữ trong khoảng 2 tuần trước khi sử dụng.

Khi sử dụng pha loãng theo tỷ lệ 1 : 10 (thể tích) trong dung dịch đệm phosphat 0,01 M (pH = 7,0) và giữ trong 30 min.

A.2 Dung dịch đệm phosphat

A.2.1 Thành phần

Dung dịch natri hydrophosphat	9,47 g
Dung dịch kali dihydrophosphat	9,08 g
Nước cất	900 ml

A.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan natri hydrophosphat, kali dihydrophosphat trong nước cất và lắc cho tan hết.

A.3 Dung dịch đệm TAE hoặc TBE

A.3.1 Thành phần

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

A.3.2 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.4 Thuốc nhuộm Hematoxylin (dung dịch Hematoxylin – Mayer)

A.4.1 Thành phần

Hematoxylin dạng tinh thể	1 g
Natri iodat	0,2 g
Amoni alum sulfat (hoặc kali alum sulfat)	50 g
Axit citric	1 g
Chloral hydrat	50 g
Nước cất	1 000 ml

A.4.2 Chuẩn bị

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

Bảo quản dung dịch đã pha trong chai tối màu.

A.5 Thuốc nhuộm Eosin

A.5.1 Thành phần

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

A.5.2 Chuẩn bị

Thêm từ 2 giọt đến 3 giọt axit axetic vào etanol 70 % (thể tích) (3.1.1). 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.

A.6 Dung dịch Davidson

A.6.1 Thành phần

Etanol tuyệt đối (3.1.1)	330 ml
Formalin (dung dịch nước bão hòa khí formaldehyd, từ 36 % đến 38 %)	220 ml
Axit acetic	115 ml
Nước cất	355 ml

A.6.2 Chuẩn bị

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

Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

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 ADN: DNAeasy® Blood & Tissue Kit (250) (Cat No. 69506):

- Nhỏ 20 µl protease K vào ống ly tâm 1,5 ml;
- Chuyển 30 mg bệnh phẩm (hoặc từ 100 µl đến 200 µl bệnh phẩm máu) (6.2.1) 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 (4.3.4);
- Ủ ấm ở 56 °C trong 10 min, sau đó ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.3.4);
- Thêm 200 µl etanol tuyệt đối (3.1.1) vào ống ly tâm;
- Trộn kỹ huyền dịch trong 15 s, sau đó ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.3.4);
- 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 (4.3.2) 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 (4.3.2) 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 (4.3.2) 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 (4.3.2) với tốc độ 6 000 g trong 1 min;
- Chuyển ADN đã thu được sang ống 1,5 ml khác.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Diseases of aquatic organisms, 2010. Dis Aquat Org - Vol. 91: 105–112.
 - [2] Ngô Nguyễn Vũ, Hoàng Tùng, Lê Thanh Long, Hew Choy Leong, Trần Bích Ngọc, Nguyễn T.T. Hoài, Review on Milky Haemolymph Syndrome caused by Rickettsia-like bacteria (RLB) on Spiny Lobster and experimental culture of RLB on Grouper Embryonic Cell line (GE)
 - [3] Milky Haemolymph Disease of Spiny Lobsters – Aquatic Animal Diseases Significant to Australia. OIE Aquatic Animal Disease Cards. 2007.
 - [4] Đỗ Thị Hòa, Nguyễn Tử Cương, Nguyễn Hữu Dũng, Nguyễn Thị Thùy Giang, Phan Văn Út, Nguyễn Thị Nguyệt Huệ, Đồng Thanh Hà, 2009. *Tác nhân gây bệnh Sứa ở tôm hùm nuôi ở miền trung Việt Nam*, Tạp chí khoa học – Công nghệ thủy sản. số đặc biệt. 2009.
 - [5] Nguyễn Chí Thuận, Phạm Ngọc Long, Nguyễn Quang Vinh, Nguyễn Thị Thành Lợi, 2012. *Đặc điểm hình thái và trình tự Gen 16S rRNA của vi khuẩn tương tự Rickettsia (RLB) ở Tôm hùm bông (Panulirus ornatus) bị bệnh sứa*. Tạp chí Công nghệ Sinh học số 10, 151 -157.
-