

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8710-16:2016

Xuất bản lần 1

**BỆNH THỦY SẢN - QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN -
PHẦN 16: BỆNH GAN THẬN MỦ Ở CÁ DA TRƠN**

Aquatic animal disease - Diagnostic procedure - Part 16: Enteric septicaemia of catfish

HÀ NỘI - 2016

Lời nói đầu

TCVN 8710-16:2016 được xây dựng trên cơ sở tham khảo (OIE) *Manual of Diagnostic tests for Aquatic Animal*, 2009, Chapter 2.1.11 Enteric Septicaemia of Catfish (*Edwardsiella ictaluri*).

TCVN 8710-16:2016 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 16: Bệnh gan thận mù ở cá da trơn

Aquatic animal diseases - Diagnostic procedure -

Part 16: Enteric septicaemia of catfish

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 gan thận mù do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây ra ở cá da trơn như cá tra, cá basa và một số loài cá da trơn nước ngọt khác như cá nheo, cá trê ...

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1

Bệnh gan thận mù trên cá da trơn (Enteric septicaemia of catfish – ESC)

Bệnh do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* xâm nhập vào gan, thận và lách (tỳ tạng) của cá da trơn gây nên những đốm trắng như đốm mù ở các tổ chức này.

CHÚ THÍCH: *Edwardsiella ictaluri* là vi khuẩn hình que, gram âm, di động, không sinh bào tử, thuộc họ *Enterobacteriaceae*.

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 không có nuclease, trừ khi có quy định khác.

3.1 Thuốc thử và vật liệu thử dùng chung

TCVN 8710-16:2016

- 3.1.1 Etanol, 70 % (thể tích), 90 % (thể tích) và etanol tuyệt đối.
- 3.1.2 Nước tinh khiết (không có nuclease).
- 3.2 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phương pháp nuôi cấy, phân lập, định danh vi khuẩn
 - 3.2.1 Môi trường nuôi cấy chọn lọc EIA (thạch *Edwardsiella ictaluri*).
 - 3.2.2 Môi trường nuôi cấy NA (thạch dinh dưỡng) hoặc môi trường nuôi cấy TSA (thạch đậu tương trypton).
 - 3.2.3 Thuốc nhuộm Gram (xem A.1).
 - 3.2.4 Môi trường và thuốc thử để xác định đặc tính sinh hóa (xem phụ lục B).
 - 3.2.5 Nước muối sinh lý, dung dịch natri clorua (NaCl) 0,9 %.
- 3.3 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction).
 - 3.3.1 Kít tách chiết ADN (acid deoxyribo nucleic), Protein K.
 - 3.3.2 Kít nhân gen (PCR Master Mix Kit).
 - 3.3.3 Cặp mồi – primer (gồm mồi xuôi, mồi ngược) (xem bảng 2).
 - 3.3.4 Agarose.
 - 3.3.5 Dung dịch đệm TAE (Tris-acetate - EDTA) hoặc TBE (Tris-borate - EDTA)

Thành phần

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

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.

- 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).

3.4 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho Real-time PCR.

3.4.1 Kít nhân gen Real-time PCR.

3.4.2 Cặp mồi – primer (gồm mồi xuôi, mồi ngược) và mẫu dò (xem bảng 6).

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, phân lập, định danh vi khuẩn

4.1.1 Nồi hấp vô trùng, duy trì nhiệt độ 115 °C và 121 °C.

4.1.2 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ ở 28 °C đến 37 °C.

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

4.1.4 Ống nghiệm vô trùng, dung tích 15 ml.

4.1.5 Đèn cồn.

4.1.6 Que cấy.

4.1.7 Phiến kính, vô trùng.

4.1.8 Lamên, vô trùng.

4.1.9 Dao mổ, panh, kéo vô trùng.

4.2 Thiết bị, dụng cụ sử dụng cho phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction) và Real-time PCR

4.2.1 Máy nhân gen (PCR)

4.2.2 Máy Real-time PCR

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

4.2.4 Máy lắc trộn vortex.

4.2.5 Máy spindown.

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

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

4.2.8 Máy đọc gel.

5 Chẩn đoán lâm sàng

5.1 Đặc điểm dịch tễ

- Loài mẫn cảm: Cá tra, cá basa và một số loài cá da trơn nước ngọt khác;
- Mùa xuất hiện bệnh: Bệnh gan thận mù xuất hiện trên cá tra hầu như quanh năm, nhưng bệnh xảy ra nặng nhất vào lúc giao mùa, mùa mưa, thường bùng phát vào các tháng 7, 8, 10, 11;

CHÚ THÍCH: Đối với cá da trơn nuôi tại Mỹ thời gian bùng phát bệnh vào mùa xuân và mùa thu.

- Tần suất xuất hiện bệnh: Bệnh xuất hiện nhiều lần trong 1 vụ nuôi;
- Bệnh xảy ra trên cá tra ở tất cả các giai đoạn nuôi, nhưng chủ yếu đối với cá dưới 400 g;
- Đường lây truyền: *Edwardsiella ictaluri* có thể xâm nhập vào cơ thể cá từ môi trường nước qua da, qua mang cá hoặc qua miệng.

5.2 Triệu chứng lâm sàng

5.2.1 Giai đoạn cá mới nhiễm bệnh

- Bên ngoài thân cá bình thường không biểu hiện xuất huyết, mắt hơi lồi.

5.2.2 Giai đoạn cá nhiễm nặng

- Cá bơi lơ lờ trên mặt nước, không có phản ứng với tiếng động xung quanh;
- Cá giảm ăn hoặc bỏ ăn hoàn toàn;
- Cá có hiện tượng xuất huyết trên da, các gốc vây, hậu môn, phù mắt và sưng đầu;
- Gan, thận, lách có nhiều đốm trắng (như đốm mù);
- Một số cá bệnh còn biểu hiện màu sắc nhợt nhạt, số lượng cá chết hàng ngày cao và tỷ lệ chết tăng dần.

5.3 Bệnh tích

- Mở khám quan sát thấy có nhiều đốm trắng trên gan, thận và lách;

- Thận, lách có hiện tượng xuất huyết, nhiều vùng bị hoại tử trầm trọng.

6 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

6.1 Giám định *Edwardsiella ictaluri* bằng phương pháp nuôi cấy, phân lập, định danh vi khuẩn

6.1.1 Lấy mẫu

6.1.1.1 Lấy mẫu nguyên con

- Đối tượng thu mẫu bệnh phẩm: Lựa chọn các con cá còn sống hoặc vừa mới chết có triệu chứng lâm sàng như được mô tả tại 5.2;
- Số lượng cá trên mỗi mẫu bệnh phẩm phụ thuộc vào kích cỡ của cá:

Cá giống: lấy từ 3 con đến 5 con/mẫu bệnh phẩm;

Cá trưởng thành, cá bố mẹ: lấy 1 con/mẫu bệnh phẩm;

- Bao gói mẫu bệnh phẩm: cho cá vào từng lọ hay túi ni lon vô trùng riêng biệt, hàn hoặc đậy kín.

6.1.1.2 Lấy mẫu bệnh phẩm

- Vô trùng bên ngoài bề mặt cá bằng etanol 70 % (thể tích) (3.1.1), dùng pank, kéo vô trùng mở để bộc lộ tổ chức bên trong;
- Dùng bông cotton thấm và vô trùng bề mặt của tổ chức có bệnh tích điển hình như mô tả tại 5.3;
- Dùng kéo vô trùng cắt tổ chức đã được vô trùng cho vào dụng cụ chứa vô trùng và đậy kín;
- Đối với tổ chức thận: Dùng bông cotton để thấm và vô trùng bề mặt của thận. Dùng kéo vô trùng cắt tiền thận.

6.1.2 Bảo quản mẫu bệnh phẩm

- Mẫu cá được vận chuyển đến phòng thí nghiệm phải còn sống hoặc vừa mới chết;
- Mẫu bệnh phẩm bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C không quá 24 h.

6.1.3 Cách tiến hành

6.1.3.1 Phân lập vi khuẩn

- Dùng que cấy vô trùng chọc sâu xuống bệnh phẩm tại vị trí đã được vô trùng, ria cấy trên môi trường thạch chọn lọc EIA (3.2.1);

TCVN 8710-16:2016

– Ủ các đĩa thạch đã được cấy trong tủ ẩm (4.1.2) ở 28 °C từ 24 h đến 48 h. Các khuẩn lạc nhỏ, tròn, trắng đục, không nhân, ria có dạng không đồng nhất, đường kính từ 0,5 mm đến 2 mm mọc trên các đĩa thạch EIA sau khi ủ được nghi ngờ là khuẩn lạc của *Edwardsiella ictaluri*;

– Dùng que cấy vô trùng lấy khuẩn lạc điển hình ria cây vào môi trường thạch NA (3.2.2), ủ trong tủ ẩm (4.1.2). Sau 24 h đến 48 h trên môi trường thạch NA (3.2.2), khuẩn lạc của *Edwardsiella ictaluri* có dạng hình tròn, màu trắng đục, kích thước từ 1 mm đến 2 mm.

6.1.3.2 Xác định vi khuẩn

6.1.3.2.1 Quan sát hình thái

Nhỏ một giọt nước sinh lý trên phiến kính (4.1.7), dùng que cấy vô trùng chuyển khuẩn lạc trên môi trường thạch NA (3.2.2) vào giọt nước muối sinh lý (3.2.5) rồi trộn đều, dàn mỏng, để khô tự nhiên sau đó cố định tiêu bản trên ngọn lửa đèn cồn (4.1.5);

Tiêu bản sau khi đã được cố định được nhuộm bằng phương pháp gram (xem phụ lục A);

Edwardsiella ictaluri bắt màu hồng (màu gram âm), hình que, mảnh, có kích thước 1 µm x 2 µm.

6.1.3.2.2 Xác định các đặc tính sinh hóa

Xác định các đặc tính sinh hóa của vi khuẩn dựa vào một số chỉ tiêu cơ bản: vi khuẩn di động, gram âm, âm tính với oxidase, dương tính với catalase, O/F dương tính và các chỉ tiêu sinh hóa nêu trong bảng 1.

Bảng 1 – Các chỉ tiêu sinh hóa của *Edwardsiella ictaluri*

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP
-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

CHÚ THÍCH:

ONPG: Ortho-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosidase

ADH: Arginine DiHydrolase

LDC: Lysine DeCarboxylase

ODC: Ornithine DeCarboxylase

CIT: CITrate utilization

H₂S: H₂S production

URE: UREase

TDA: Tryptophane DeAminase

IND: INDole production

VP: Voges Proskauer

GEL: GELatinase

GLU: GLUcose

MAN: MANnitol

INO: INOsitol

SOR: SORbitol

RHA: RHAmnose

SAC: SACcharose

MEL: MELibiose

AMY: AMYgdalin

ARA: ARABinose

- Xác định các chỉ tiêu di động, oxidase, catalase và phản ứng O/F của vi khuẩn (xem Phụ lục B).
- Tiến hành các phản ứng sinh hóa.

Ví DỤ: Sử dụng bộ kit API 20E (xem Phụ lục C), kết quả được đọc bằng phần mềm đọc kết quả API 20E.

6.1.4 Đọc kết quả

Cá da trơn được xác định là nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* khi nuôi cấy, phân lập, định danh được *Edwardsiella ictaluri* trong phòng thí nghiệm.

6.2 Xác định *Edwardsiella ictaluri* bằng phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)

6.2.1 Lấy mẫu

6.2.1.1 Lấy mẫu bệnh phẩm trực tiếp

Lấy mẫu gan, thận, lách (xem 6.1.1): lượng mẫu lấy khoảng 30 mg.

6.2.1.2 Lấy mẫu nuôi cấy

Lấy mẫu khuẩn lạc thuần chủng: lấy từ 3 đến 5 khuẩn lạc thuần chủng trên môi trường nuôi cấy (xem 6.1.3.1)

6.2.2 Bảo quản mẫu

- Bảo quản mẫu cá nguyên con hoặc gan, thận, lách ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C không quá 24 h;
- Hoặc bảo quản gan, thận, lách trong etanol tuyệt đối (3.1.1);

Mẫu bệnh phẩm 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 Cách tiến hành

6.2.3.1 Tách chiết ADN

Sử dụng bộ kit tách chiết (3.3.1) 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 D).

6.2.3.2 Chuẩn bị môi

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.

Sử dụng cặp mồi EiFd-1/ EiRs-1. Trình tự cặp mồi được nêu trong bảng 2.

Bảng 2 – Cặp mồi EiFd-1/ EiRs-1²⁾

Mồi	Trình tự cặp mồi
EiFd-1 (mồi xuôi)	5'-GTA-GCA-GGG-AGA-AAG-CTT-GC-3'
EiRs-1 (mồi ngược)	5'-GAA-CGC-TAT-TAA-CGC-TCA-CAC-C-3'

Cặp mồi EiFd-1/ EiRs-1 dùng để khuếch đại đoạn gen của *Edwardsiella ictaluri* có kích thước 407 bp.

Chuẩn bị mồi gốc:

- Mồi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.2.5) ở gia tốc 6000g trong 30 s để mồi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên;

- Khi hoàn nguyên nên dùng đệm TE (3.3.8) để hoàn nguyên 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 tinh khiết (3.1.2) (10 µl mồi gốc và 90 µl nước tinh khiết).

6.2.3.3 Tiến hành phản ứng PCR

Sử dụng cặp mồi đã chuẩn bị (6.2.3.2) 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 3.

Bảng 3 – Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích, µl
Dung dịch nhân gen (Taq PCR Master Mix)	12,5
Mồi xuôi 20 µM	1
Mồi ngược 20 µM	1
Nước tinh khiết không có nuclease	8
Tổng thể tích	22,5

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.

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 *Edwardsiella ictaluri* chuẩn vào ống phản ứng;
- Mẫu kiểm chứng âm: Cho 2,5 µl nước tinh khiết (3.1.2) 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 4.

Bảng 4 – Chu trình nhiệt của phản ứng PCR^[2]

Nhiệt độ, °C	Thời gian	Số chu kỳ, vòng
95	4 min	1
95	30 s	30
53	45 s	
72	30 s	
72	10 min	1

CHÚ THÍCH:

- Phản ứng PCR phải bao gồm: mẫu thử, 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

6.2.3.4 Điện di

6.2.3.4.1 Chuẩn bị bản thạch

Pha thạch với nồng độ agarose (3.3.4) từ 1,5 % đến 2 % bằng dung dịch đệm TAE 1X hoặc TBE 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 (4.2.7), 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.

TCVN 8710-16:2016

CHÚ THÍCH: Có thể dùng các sản phẩm có sẵn chất nhuộm ADN để pha chế thạch (ví dụ: Sybr safe ADN gel stain³⁾) và sử dụng theo quy định của nhà sản xuất.

6.2.3.4.2 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 (4.2.7), 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.

6.2.4 Đọc kết quả

Sau khi điện di, đọc kết quả trên máy đọc gel (4.2.8) theo bảng 5:

Bảng 5 – Kết quả điện di

Giếng	Vạch 407 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>Edwardsiella ictaluri</i>
	Không	Âm tính với <i>Edwardsiella ictaluri</i>

Đánh giá kết quả:

Kết quả mẫu thử dương tính khi: Tại giếng mẫu thử xuất hiện vạch sáng có kích thước 407 bp. Thang chuẩn ADN phân vạch rõ ràng, mẫu kiểm chứng dương có kích thước 407 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 407 bp, mẫu kiểm chứng âm không có vạch sáng.

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.

6.3 Xác định *Edwardsiella ictaluri* bằng phương pháp Real-time PCR

6.3.1 Lấy mẫu

Xem 6.2.1.

6.3.2 Bảo quản mẫu

Xem 6.2.2.

6.3.3 Cách tiến hành

6.3.3.1 Tách chiết ADN

Xem 6.2.3.1.

6.3.3.2 Chuẩn bị môi

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy Real-time PCR (4.2.2) theo phương pháp Real-time PCR khuếch đại đoạn gen đặc hiệu của *Edwardsiella ictaluri* sử dụng môi xuôi, môi ngược và mẫu dò được nêu trong bảng 6.

Bảng 6 – Trình tự mẫu dò và cặp môi

Cặp môi/ Mẫu dò	Trình tự gen (5'-3')
Mẫu dò	FAM – CCT-CAC-ATA-TTG-CTT-CAG-CGT-CGA-C – BHQ
Môi xuôi	ACT-TAT-CGC-CCT-CGC-AAC-TC
Môi ngược	CCT-CTG-ATA-AGT-GGT-TCT-CG

Môi và mẫu dò được chuẩn bị như sau:

Chuẩn bị môi gốc:

- Môi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.2.5) ở gia tốc 6000 g trong 30 s để môi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên.
- Khi hoàn nguyên nên dùng đệm TE (3.3.8) để hoàn nguyên môi ở nồng độ 100 µM làm môi gốc.

Chuẩn bị mẫu dò gốc:

- Mẫu dò ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.2.5) ở gia tốc 6000 g trong 30 s để mẫu dò lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên.

TCVN 8710-16:2016

- Khi hoàn nguyên nên dùng đệm TE (3.3.8) để hoàn nguyên mẫu dò ở nồng độ 100 μM làm mẫu dò gốc.

Chuẩn bị môi, mẫu dò sử dụng:

- Môi, mẫu dò sử dụng ở nồng độ 10 μM : pha loãng môi, mẫu dò gốc bằng nước tinh khiết (3.1.2) (10 μl môi gốc và 90 μl nước tinh khiết; 10 μl mẫu dò gốc và 90 μl nước tinh khiết).

6.3.3.3 Tiến hành phản ứng Real-time PCR

Sử dụng cặp môi đã chuẩn bị (6.3.3.2) và sử dụng kit nhân gen Real-time PCR (3.4.1) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví DỤ: Sử dụng kit nhân gen Invitrogen superscript III qRT-PCR kit ⁴⁾

Thành phần cho 1 phản ứng được nêu trong bảng 7.

Bảng 7 – Thành phần phản ứng Real-time PCR

Thành phần	Thể tích, μl
Dung dịch nhân gen (2x Reaction Mix)	12,5
Môi xuôi 10 μM	0,5
Môi ngược 10 μM	0,5
Mẫu dò 10 μM	0,5
Enzym	0,5
Nước tinh khiết không có nuclease	8,5
Tổng thể tích	23

Chuyển 23 μl hỗn hợp nhân gen vào mỗi ống phản ứng:

- Mẫu kiểm chứng dương: Cho 2 μl mẫu ADN đã được giám định hoặc sử dụng các chủng *Edwardsiella ictaluri* chuẩn vào ống phản ứng;
- Mẫu kiểm chứng âm: Cho 2 μl nước tinh khiết (3.1.2) vào ống phản ứng.

Tiến hành phản ứng PCR bằng máy nhân gen realtime PCR (4.2.2)

⁴⁾ 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.

- Mẫu thử: Cho 2 μ l mẫu ADN kiểm tra vào ống phản ứng.

Chu kỳ nhiệt chạy phản ứng được cài đặt theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit sử dụng cho phản ứng. Đối với kit Invitrogen superscript III qRT-PCR, chu kỳ nhiệt được nêu trong bảng 8.

Bảng 8 – Chu trình nhiệt của phản ứng realtime PCR

Nhiệt độ, °C	Thời gian	Số chu kỳ, vòng
50	2 min	1
95	2 min	
95	15 s	40
60	1 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.

6.3.4 Đọc kết quả

Phản ứng được công nhận: mẫu kiểm chứng dương tính (được chuẩn độ trước) phải có giá trị $C_t < 35$, mẫu đối chứng âm không có C_t .

Với điều kiện phản ứng trên:

- 1) Mẫu có giá trị chu kỳ ngưỡng $C_t < 35$ được coi là dương tính;
- 2) Mẫu không có giá trị chu kỳ ngưỡng $C_t = 0$ là âm tính;
- 3) Mẫu có giá trị chu kỳ ngưỡng $35 \leq C_t \leq 40$ được xem là nghi ngờ.

Những mẫu nghi ngờ này cần được phân tích lại hoặc sử dụng phương pháp phân tích khác để khẳng định kết quả.

7 Kết luận

Cá da trơn được xác định là nhiễm bệnh gan thận mù do *Edwardsiella ictaluri* 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:

- Phân lập, định danh được *Edwardsiella ictaluri*.

TCVN 8710-16:2016

- Phản ứng PCR phát hiện dương tính *Edwardsiella ictaluri*
- Phản ứng Real-time PCR phát hiện dương tính *Edwardsiella ictaluri*.

Phụ lục A

(Quy định)

Phương pháp nhuộm Gram**A.1 Thuốc thử****A.1.1 Dung dịch tím tinh thể****Thành phần**

Tím tinh thể	2,0 g
Etanol tuyệt đối	20,0 ml
Amoni oxalat	0,8 g
Nước	80,0 ml

Chuẩn bị

Hòa tan tím tinh thể trong etanol tuyệt đối và hòa tan amoni oxalat trong nước. Sau đó, trộn 2 dung dịch này với nhau và lắc cho tan hết.

A.1.2 Dung dịch fuchsin đậm đặc**Thành phần**

Fuchsin basic	1 g
Etanol tuyệt đối	10 ml
Phenol	5 g
Nước	100 ml

Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước. Khi dùng, pha loãng dung dịch fuchsin đậm đặc với nước theo tỉ lệ thể tích 1 : 10.

TCVN 8710-16:2016

A.1.3 Dung dịch lugol

Thành phần

Kali iodua	2 g
Iod tinh thể	1 g
Nước	200 ml

Chuẩn bị

Nghiền kali iodua và iod tinh thể, cho nước vào từ từ và lắc cho tan.

A.1.4 Cồn axeton

Trộn đều dung dịch etanol tuyệt đối với dung dịch axeton với tỷ lệ thể tích 3 : 1.

A.2 Cách tiến hành

Nhỏ dung dịch tím tinh thể (A.1.1) lên tiêu bản, để từ 1 min đến 2 min sau đó rửa nước nhanh và để khô;

Nhỏ dung dịch lugol (A.1.3), để 1 min sau đó rửa nước nhanh và để khô;

Nhỏ cồn axeton (A.1.4), rửa nước thật nhanh và để khô;

Nhỏ dung dịch fuchsin loãng, để 1 min sau đó rửa nước và để khô.

A.1.3 Xem tiêu bản

Nhỏ 1 giọt dầu vào tiêu bản và xem tiêu bản bằng kính hiển vi quang học (4.1.3) có vật kính 100 X.

Phụ lục B

(Quy định)

Các phản ứng sinh hóa của *Edwardsiella ictaluri***B.1 Môi trường và thuốc thử****B.1.1 Môi trường thạch lỏng****Thành phần:**

Pepton	10 g
Chất chiết thịt	3 g
NaCl	5 g
Thạch	4 g
Gelatin	80 g
Nước cất	1 000 ml

Chuẩn bị:

Hòa gelatin vào nước để 30 min, bổ sung các thành phần khác, đun cho tan hoàn toàn.

Chia ra các ống nghiệm, khoảng 6 ml mỗi ống.

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

B.1.2 Thuốc thử cho phản ứng oxidase**B.1.3 Dung dịch hydroperoxit , 3 % (thể tích)****B.1.4 Môi trường OF****Thành phần:**

Thạch OF	1 g
Glucose	2 g
Nước cất	100 ml

TCVN 8710-16:2016

Chuẩn bị:

Hòa các thành phần trên vào lọ sạch, đun cho tan hoàn toàn.

Chia ra các ống nghiệm, khoảng 6 ml mỗi ống.

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

B.2 Cách tiến hành

B.2.1 Kiểm tra khả năng di động

Dùng que cấy (4.1.6) vô trùng lấy khuẩn lạc cần kiểm tra, chích thẳng (cấy chích sâu) xuống gần đáy của ống nghiệm có môi trường thạch lỏng.

Nuôi cấy trong tủ ấm. Đọc kết quả sau 24 h đến 48 h.

Phản ứng dương tính (có khả năng di động): Môi trường đục, không nhìn rõ đường cấy chích sâu.

Phản ứng âm tính: Môi trường trong và nhìn thấy vi khuẩn mọc quanh đường cấy chích sâu.

B.2.2 Thử phản ứng oxidase

Đặt miếng giấy lọc có thấm thuốc thử vào đĩa lỏng.

Dùng que cấy vô trùng lấy vi khuẩn cần nghiên cứu đã thuần chủng nuôi cấy sau 24 h phết lên miếng giấy lọc có thuốc thử. Đọc kết quả sau 10 s đến 30 s.

Phản ứng dương tính: Vi khuẩn có màu xanh tím là dương tính (+).

Phản ứng âm tính: Vi khuẩn không thay đổi màu sắc là âm tính (-).

B.2.3 Thử phản ứng catalase

Nhỏ một giọt dung dịch hydroperoxit 3 % (thể tích) lên phiến kính (4.1.7). Dùng que cấy (4.1.6) vô trùng lấy khuẩn lạc nghi ngờ cho vào giọt dung dịch 3 % (thể tích). Đọc kết quả sau 5 s.

Phản ứng dương tính: có hiện tượng sủi bọt;

Phản ứng âm tính: không có hiện tượng sủi bọt.

B.2.4 Thử khả năng lên men và oxy hoá của vi khuẩn (O/F)

Dùng que cấy (4.1.6) vô trùng lấy vi khuẩn từ ống nghiệm đã thuần chủng nuôi cấy sau 24 h, cấy vào hai ống nghiệm có chứa môi trường OF, trong đó một ống được phủ một lớp dầu parafin lỏng dày khoảng 1 cm.

Nuôi cấy trong tủ ấm (4.1.2). Đọc kết quả sau 24 h đến 48 h.

Vi khuẩn có khả năng lên men: Cả hai ống đều chuyển màu vàng

Vi khuẩn có khả năng oxy hoá: Ống không phủ dầu có màu vàng, ống phủ dầu có màu xanh.

Vi khuẩn không có khả năng oxy hoá và lên men: Cả hai ống vẫn giữ nguyên màu xanh của môi trường.

Phụ lục C

(Tham khảo)

Định danh vi khuẩn bằng bộ kit API 20 E

C.1 Thuốc thử và vật liệu thử

C.1.1 Bộ kit API 20 E.

C.1.2 Nước muối sinh lý.

C.1.3 Nước cất tiệt trùng.

C.1.4 Parafin, đã tiệt trùng.

C.3 Cách tiến hành

Dùng que tiệt trùng lấy một ít khuẩn lạc cho vào 5 ml nước muối sinh lý (C.1.2), lắc trộn đều.

Cho một ít nước cất tiệt trùng (C.1.3) vào khay nhựa của bộ kit để giữ ẩm khi ủ trong tủ ấm (4.1.2).

Dùng pipet với đầu tít tiệt trùng hút dung dịch vi khuẩn cho vào mỗi ô của bộ kit. Nhỏ dung dịch vi khuẩn vừa đủ vào tất cả các ô CIT, VP, GEL thì nhỏ đầy, 5 ô ADH, LDC, ODC, H₂S và URE cho thêm parafin tiệt trùng (C.1.4) để tạo điều kiện yếm khí.

Đậy nắp khay lại và ủ trong tủ ấm (4.1.2) ở 28 °C.

Đọc kết quả sau 18 h đến 24 h.

C.3 Đọc kết quả

a) Kiểm tra và ghi nhận tất cả các chỉ tiêu không cần cho thêm thuốc thử, đọc kết quả dựa vào bảng C.1.

b) Đối với các chỉ tiêu cần sử dụng thuốc thử:

+ TDA: Nhỏ một giọt thuốc thử TDA. Màu đen xuất hiện thì kết quả là phản ứng dương tính, màu vàng thì kết quả phản ứng âm tính;

+ IND: Nhỏ một giọt thuốc thử IND. Đợi 2 min. Một vòng màu đỏ xuất hiện là phản ứng dương tính, màu vàng là âm tính;

+ VP: Thêm một giọt lần lượt mỗi dung dịch thuốc thử VP₁, VP₂. Đợi ít nhất 10 min, màu hồng hoặc đỏ xuất hiện là phản ứng dương tính. Nếu màu hồng nhạt xuất hiện trong vòng 10 min đến 12 min là phản ứng âm tính.

Bảng C.1 – Các chỉ tiêu định danh *Edwardsiella ictaluri* bằng bộ kit API 20 E

Chỉ tiêu	Âm tính	Dương tính
ONPG	Không màu	Vàng
ADH	Vàng	Đỏ/ cam
LDC	Vàng	Đỏ/ cam
ODC	Vàng	Đỏ/ cam
CIT	Vàng	Xanh/ xanh lá
H ₂ S	Không màu	Đen
URE	Vàng	Đỏ/ cam
TDA	Vàng	Nâu sậm
IND	Vàng	Đỏ (2 min)
VP	Không màu	Hồng/ đỏ (10 min)
GEL	Không màu (còn kết tủa đen)	Đen
GLU	Xanh/ xanh lá	Vàng
MAN	Xanh/ xanh lá	Vàng
INO	Xanh/ xanh lá	Vàng
SOR	Xanh/ xanh lá	Vàng
RHA	Xanh/ xanh lá	Vàng
SAC	Xanh/ xanh lá	Vàng
MEL	Xanh/ xanh lá	Vàng
AMY	Xanh/ xanh lá	Vàng
ARA	Xanh/ xanh lá	Vàng

Phụ lục D

(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 (6.2.1.1) 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 (4.2.5);
- Ủ ấm ở 56 °C trong 10 min, sau đó ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.2.5);
- 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 (4.2.5);
- 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 (4.2.3) 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;
- Thay ống thu ở dưới cột ly tâm;
- Ly tâm bằng máy ly tâm (4.2.3) 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 (4.2.3) 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 (4.2.3) 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] N.B, Buller, *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals. A practical Identification Manual*; 2004. P.47, 95, 149.
 - [2] Victor S. Panangala, Craig A. Shoemaker, Vicky L.van Santen, Kevin Dybvig, Phillip H. Klesius, *Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogens, Flavobacterium columnare, Edwardsiella ictaluri, and Aeromonas hydrophila*, Dis Aquat Org, 2007, Vol. 74: 199 – 208.
 - [3] Williams M.L. and Lawrence M.L. (2009). Verification of an *Edwardsiella ictaluri*-specific diagnostic PCR. The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology 50. 2010. p. 153-57.
 - [4] Đặng Thị Hoàng Oanh, Nguyễn Trúc Phương, 2010. Phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh mù gan trên cá tra (*Pangasianodon Hypophthalmus*) bằng phương pháp PCR. Tạp chí khoa học 2010: 13 151-159. Trường Đại học Cần Thơ.
 - [5] Trần Nguyễn Diễm Tú và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012. Chuẩn hóa quy trình phát hiện *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila* và *Flavobacterium columnare* từ máu cá tra. Tạp chí Khoa học 2012: 21b 179-187. Trường Đại học Cần Thơ.
 - [6] Lê Hữu Thôi, Trương Quỳnh Như, Nguyễn Hà Giang và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2009. Nghiên cứu ứng dụng qui trình mPCR chẩn đoán đồng thời vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* trên thận cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Hội nghị nuôi trồng thủy sản toàn quốc. Đại học Nông lâm, Thành phố Hồ Chí Minh.
-