

TCVN 8710-3: 2019

Xuất bản lần 2

**BỆNH THỦY SẢN – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 3: BỆNH ĐÓM TRẮNG Ở TÔM**

*Aquatic animal diseases – Diagnostic procedure –
Part 3: White Spot Disease in shrimp*

HÀ NỘI – 2019

Lời nói đầu

TCVN 8710-3: 2019 thay thế TCVN 8710-03: 2011

TCVN 8710-3: 2019 được xây dựng trên cơ sở tham khảo (OIE) 2017 *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals*. Chapter 2.2.8, Infection with white spot syndrome virus

TCVN 8710-3: 2019 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 (MBV);
- TCVN 8710-02: 2019, phần 2: Bệnh Hoại tử thần kinh ở cá biển (VNN);
- TCVN 8710-03: 2019, phần 3: Bệnh Đốm trắng ở tôm (WSSV);
- TCVN 8710-04: 2019, phần 4: Bệnh Đầu vàng ở tôm (YHV);
- TCVN 8710-05: 2011, phần 5: Bệnh Taura ở tôm He (TSV);
- TCVN 8710-06: 2019, phần 6: Bệnh do Koi herpesvirus ở cá chép (KHV);
- TCVN 8710-07: 2019, phần 7: Bệnh xuất huyết mùa xuân ở cá chép (SVC);
- TCVN 8710-08: 2012, phần 8: Bệnh hoại tử cơ ở tôm (IMNV);
- TCVN 8710-09: 2012, phần 9: Bệnh hoại tử gan tụy ở tôm (NHB);
- 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: 2019, 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 ở cá;
- TCVN 8710-16: 2016, phần 16: Bệnh gan thận mù ở cá da trơn;
- TCVN 8710-17: 2016, phần 17: Bệnh sữa trên tôm hùm;
- TCVN 8710-19: 2019, phần 19: Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm;
- TCVN 8710-20: 2019, phần 20: Bệnh hoại tử dưới vỏ và cơ quan tạo máu ở tôm;
- TCVN 8710-21: 2019, phần 21: Bệnh do vi khuẩn Streptococcus agalactiae ở cá.

Bệnh thủy sản – Quy trình chẩn đoán –

Phần 3: Bệnh đốm trắng ở tôm

Aquatic animal diseases – Diagnostic procedure –

Part 3: White Spot Disease in shrimp

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 áp dụng để chẩn đoán bệnh đốm trắng ở tôm do vi rút.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

Bệnh đốm trắng (White Spot Disease) do vi rút là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm ở tôm.

Vi rút gây bệnh đốm trắng (White Spot Syndrome Virus - WSSV) thuộc họ *Nimaviridae*, chi *Whispovirus*.

Vi rút dạng hình trứng, hay ovan, đối xứng đều có đường kính là 80 - 120 nm và chiều dài khoảng 250-380 nm. Có đuôi phụ giống như lông mao ở một đầu. Vi rút có vật chất di truyền là AND. Mặc dù có sự đa dạng di truyền giữa các chủng phân lập từ các khu vực địa lý khác nhau, cho đến nay vi rút gây bệnh đốm trắng WSSV được phân loại là một loài duy nhất của chi *Whispovirus*. Vi rút ký sinh chủ yếu trên mang, chân bơi, đuôi, giáp đầu ngực, máu và cơ bụng của tôm.

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 chung

3.1.1 Etanol, từ 96 % đến 100 % (C_2H_6O).

3.1.2 Dung dịch muối đệm phát phát (PBS).

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

3.2.1 Cặp mồi, gồm mồi xuôi và mồi ngược.

3.2.2 Cặp mồi, gồm mồi xuôi và mồi ngược, Dò .

3.2.3 Kit tách chiết ADN (Xem B1 và B2)

3.2.4 Kit nhân gen PCR (PCR Master Mix Kit, Cat. No K0171).

3.2.5 Kit nhân gen Realtime PCR (ví dụ: Kit Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG, Cat.No: 11730-017).

3.2.6 Dung dịch đệm TAE (Tris – acetate – EDTA) hoặc TBE (Tris – borate – EDTA) (xem A.1).

3.2.7 Chất nhuộm màu, ví dụ: Sybr safe.

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

3.2.9 Dung dịch đệm TE (Tris-acetate ethylenediaminetetraacetic).

3.2.10 Thang chuẩn AND (Ladder).

3.2.11 Nước tinh khiết, không có nuclease.

3.2.12 Agarose.

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 cho phương pháp chẩn đoán bằng PCR, Realtime PCR

4.1.1 Máy nhân gen PCR.

4.1.2 Máy Realtime PCR.

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

4.1.4 Máy lắc trộn vortex.

4.1.5 Máy ly tâm nhanh spindown.

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

4.1.7 Máy đọc gel.

5 Chẩn đoán lâm sàng

5.1 Đặc điểm dịch tễ

Bệnh thường xảy ra trên các loài tôm thuộc họ tôm he (*Penaeidae*) như tôm sú (*Penaeus monodon*), tôm thẻ chân trắng (*P. vannamei*), tôm rảo (*P. merguensis*).

Ngoài ra còn một số loài như tôm đất, tôm càng xanh, cua, ghẹ, các loài giáp xác phù du như *Artemia*, *Copepoda* có thể mang mầm bệnh.

Bệnh xảy ra ở hầu hết các giai đoạn phát triển của tôm như ở cả tôm nước mặn, lợ.

Vi rút có thể lây lan theo chiều ngang từ cá thể bị nhiễm bệnh sang cá thể khỏe trong cùng ao hoặc có thể do tôm ăn thức ăn có mầm bệnh; hoặc qua các vật chủ trung gian như tôm tự nhiên, cua, ghẹ, động vật phù du mang mầm bệnh.

Bệnh đốm trắng xuất hiện quanh năm, đặc biệt khi thời tiết biến đổi nhiều như biên độ nhiệt độ trong ngày biến thiên quá lớn, thay đổi độ mặn gây sốc cho tôm.

5.2 Triệu chứng lâm sàng

Tôm bị bệnh thường thể hiện dấu hiệu giảm ăn rõ rệt, đôi khi có trường hợp tăng cường sự bắt mồi hơn bình thường, sau vài ngày bỏ ăn, tôm dạt bờ, lơ dờ với dấu hiệu xuất hiện các đốm trắng tròn đường kính từ 0,5 – 2,0mm dưới lớp vỏ kitin đặc biệt là vùng đầu ngực và đốt bụng cuối cùng. Những đốm trắng này nằm trong lớp vỏ và không thể loại bỏ bằng việc chà sát. Trong trường hợp cấp tính, tôm bệnh có thể chuyển sang màu hồng đỏ. Hiện tượng chết có thể xảy ra ngay sau đó, tỉ lệ chết có thể lên đến khoảng từ 90 % đến 100 % trong vòng 3 ngày đến 7 ngày.

6 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

6.1 Phương pháp Nested PCR (Polymerase Chain Reaction)

6.1.1 Lấy mẫu

Số lượng tôm trên mỗi mẫu phụ thuộc vào kích cỡ của tôm:

- Ấu trùng và hậu ấu trùng: 100 mg
- Tôm trưởng thành, tôm bố mẹ: lấy từ 5 con/mẫu đến 10 con/mẫu.

6.1.2 Bảo quản mẫu

- Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C và chuyển đến phòng thí nghiệm trong vòng 48h sau khi lấy mẫu hoặc bảo quản trong etanol từ 96 % đến 100 % (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 từ 96 % đến 100 % (3.1.1).

6.1.3 Chuẩn bị mẫu

- Đối với tôm giống, ấu trùng và hậu ấu trùng: Sử dụng nguyên con;
- Đối với tôm bố mẹ, tôm thương phẩm: Lấy mang, chân bơi, đuôi, giáp đầu ngực, máu, cơ bụng.

Lượng mẫu cần chuẩn bị: Khoảng 30 mg.

Mẫu được nghiền nhuyễn với tỷ lệ 1 thể tích mẫu trong 9 thể tích dung dịch muối đệm PBS (3.1.2), để tạo thành huyền dịch 10 %, chia thành hai phần: một phần cho thực hiện xét nghiệm và một phần lưu trữ ở tủ âm (-80 °C).

6.1.4 Cách tiến hành

6.1.4.1 Tách chiết ADN

Sử dụng bộ kit tách chiết (3.2.3) thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví DỤ: Sử dụng kit tách chiết ADN của Qiagen: DNeasy® Blood & Tissue Kit (250) (Cat No. 69506)¹⁾ (xem phụ lục B1).

Hoặc Sử dụng kit tách chiết TACO RNA/ADN extraction Kit (GeneReach Cat. No. atc-d/rna, 320 tests)²⁾ (xem phụ lục B2).

6.1.4.2 Chuẩn bị môi

Phương pháp Nested PCR sử dụng cặp mồi 146F1/146R1 và 146F2/146R2 (3.2.1) để phát hiện vi rút đốm trắng. Trình tự cặp mồi (xem phụ lục C, Bảng C.1).

Môi được chuẩn bị như sau:

- Môi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy ly tâm nhanh spindown (4.1.5) trong 30 s để môi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Dùng dung dịch đệm TE (3.2.9) để hoàn nguyên môi ở nồng độ 100 µM làm gốc.

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 của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

- Mỗi được sử dụng ở nồng độ 20 μ M: pha loãng mỗi gốc bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.11) (10 μ l mỗi gốc và 40 μ l nước tinh khiết không có nuclease).

6.1.4.3 Tiến hành phản ứng Nested PCR

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy nhân gen (4.1.1) theo phương pháp nested PCR bao gồm 2 giai đoạn (hoặc 2 bước): Giai đoạn 1 (bước 1), thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 146F1/146R1; Giai đoạn 2 (bước 2), thực hiện phản ứng nested PCR sử dụng cặp mồi 146F2/146R2, sử dụng kit nhân gen (3.2.4) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (xem phụ lục C).

6.1.4.4 Điện di

6.1.4.4.1 Chuẩn bị bản gel

Pha thạch với nồng độ agarose (3.2.12) từ 1,5 % đến 2 % bằng dung dịch đệm TBE 1X hoặc TAE 1X (3.2.6) 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 μ l chất nhuộm màu (3.2.7) vào mỗi 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 gel vào bể điện di (4.1.6), đổ dung dịch đệm (TBE 1X hoặc TAE 1X) 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.

6.1.4.4.2 Chạy điện di

Hút 2 μ l chất đệm tải mẫu (Loading dye 6X) (3.2.8) vào 8 μ l sản phẩm PCR trộn đều và cho vào các giếng trên bản thạch.

Thực hiện điện di trong bộ điện di (4.1.6), chạy kèm theo thang chuẩn ADN (ladder) (3.2.10) để dự đoán kích thước sản phẩm khuếch đại. Hút 10 μ l thang chuẩn ADN (ladder) (3.2.10) vào một giếng trên bản thạch.

Điện di ở hiệu điện thế 100 V trong thời gian 25 min.

6.1.4.5 Đọc kết quả

Sau khi điện di, đọc kết quả trên máy đọc gel (4.1.7).

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 của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

Điều kiện phản ứng được công nhận khi:

- Mẫu đối chứng âm không có vạch sáng (không có sản phẩm khuếch đại);
- Mẫu đối chứng dương có vạch sáng kích thước 941 bp.

Với điều kiện phản ứng trên:

Kết quả mẫu thử dương tính khi:

- Tại giếng mẫu thử xuất hiện vạch sáng có kích thước 941 bp.
- Thang chuẩn ADN phân vạch rõ ràng.

Kết quả mẫu thử âm tính khi:

- Tại giếng mẫu thử không xuất hiện vạch sáng.
- Thang chuẩn ADN phân vạch rõ ràng

6.2 Phương pháp Realtime PCR

6.2.1 Lấy mẫu (Theo 6.1.1)

6.2.2 Bảo quản mẫu (Theo 6.1.2)

6.2.3 Chuẩn bị mẫu (Theo 6.1.3)

6.2.4 Cách tiến hành

6.2.4.1 Tách chiết ADN

Sử dụng bộ kit tách chiết (3.2.3) thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví dụ: Sử dụng kit tách chiết ADN: DNeasy® Blood & Tissue Kit (250) (Cat No. 69506)⁴⁾ (xem phụ lục B).

6.2.4.2 Chuẩn bị môi

Phương pháp Realtime PCR sử dụng cặp mồi WSSV1011F /WSSV1079R và đoạn dò WSSV-p (3.2.2) để phát hiện vi rút đốm trắng. Trình tự cặp mồi (xem phụ lục D, Bảng D.1).

Môi được chuẩn bị như sau:

- Môi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.1.5) trong 30 s để môi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Khi hoàn nguyên, nên dùng dung dịch đệm TE (3.2.9) để hoàn nguyên môi ở nồng độ 100 µM làm gốc.

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 của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương

- Mỗi được sử dụng ở nồng độ 20 μ M: pha loãng mỗi gốc bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.11) (10 μ l mỗi gốc và 40 μ l nước tinh khiết không có nuclease).
- Đoạn dò WSSV-p sử dụng nồng độ 6 μ M: pha loãng đoạn dò bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.11) (3 μ l mỗi gốc và 47 μ l nước tinh khiết không có nuclease)

6.2.4.3 Tiến hành phản ứng realtime PCR

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy Realtime PCR (4.1.2) theo phương pháp Realtime PCR khuếch đại đoạn gen đặc hiệu của vi rút WSSV sử dụng cặp mồi đặc hiệu WSSV1011F/WSSV1079R và đoạn dò WSSV-p (3.2.2), sử dụng kit nhân gen (3.2.5) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (xem phụ lục D).

6.2.4.4 Đọc kết quả

Điều kiện của phản ứng được công nhận khi:

- Mẫu đối chứng âm phải cho kết quả âm tính (không có giá trị Ct).
- Mẫu đối chứng dương phải cho kết quả dương tính và có giá trị Ct so với giá trị Ct của mẫu đã được chuẩn độ trước đó có khoảng giá trị Ct = ± 2

Với điều kiện phản ứng như trên:

- Mẫu có giá trị Ct < 35 được xem là dương tính
- Mẫu không có giá trị Ct là âm tính
- Mẫu có giá trị Ct trong khoảng $35 \leq Ct \leq 40$ được xem là nghi ngờ.

CHÚ Ý: - Những mẫu nghi ngờ, cần được thực hiện xét nghiệm lại hoặc sử dụng phương pháp xét nghiệm tương đương khác để khẳng định kết quả.

- Phản ứng realtime PCR phải bao gồm: mẫu kiểm tra, mẫu kiểm chứng dương và mẫu kiểm chứng âm;
- Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng realtime PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

7 Kết luận

Mẫu tôm được xác định mắc bệnh đốm trắng khi có đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng đặc trưng của bệnh đốm trắng và:

- Có kết quả dương tính với WSSV bằng phương pháp Nested PCR, hoặc:
- Có kết quả dương tính với WSSV bằng phương pháp Realtime PCR.

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị thuốc thử**A.1 Dung dịch đệm TAE hoặc TBE****A.1.1 Thành phần**

Dung dịch TAE (hoặc TBE) 10X: 100 ml

Nước khử ion: 900 ml

Tổng: 1000 ml dung dịch TAE (TBE) 1X

A.1.2 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.2 Dung dịch Davidson**A.2.1 Thành phần**

Etanol (96%): 330 ml

Formalin: 220 ml

(dung dịch nước bão hòa khí formaldehyde là dung dịch từ 36 % đến 38 %)

Axit acetic: 115 ml

Nước cất: 355 ml

A.2.2 Chuẩn bị

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

Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

A.3 Dung dịch muối đệm phosphat (PBS)**A.3.1 Thành phần**

Natri clorua (NaCl) 8 g

Natri hydro photphat dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2,9 gKali dihydro photphat (KH_2PO_4) 0,2 g

Kali clorua (KCl)	0,2 g
Nước cất	1000 ml

A.3.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trên vào 1000ml nước cất, khuấy và lắc đều.

Chỉnh pH bằng dung dịch NaOH 1N hoặc dung dịch HCl 1N. Hấp vô trùng ở 121 °C trong 30 min.

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.

B.1. Quy trình tách chiết ADN sử dụng kit tách chiết ADN của Qiagen

VÍ DỤ: Sử dụng kit tách chiết ADN của Qiagen: DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (250) (Cat No. 69506)

Chuyển 30 mg bệnh phẩm vào ống eppendorf, thêm 180 µl dung dịch ATL, thêm 20 µl protease K vào, lắc đều bằng máy lắc trộn vortex (4.1.4);

– Ủ ở 56 °C cho đến khi hoàn toàn đồng nhất (thỉnh thoảng lắc bằng máy lắc trộn vortex (4.1.4) trong quá trình ủ). Lắc đều bằng máy lắc trộn vortex (4.1.4);

– Thêm 200 µl dung dịch AL (Lysis buffer). Lắc đều bằng máy lắc trộn vortex (4.1.4);

– Ủ ấm ở 56 °C trong 10 min;

– Thêm 200 µl etanol (từ 96 % đến 100 %) vào ống eppendorf. Lắc đều bằng máy lắc trộn vortex (4.1.4);

– Hút huyền dịch trong ống eppendorf, chuyển sang cột lọc có ống thu ở dưới;

– Ly tâm bằng máy ly tâm (4.1.3) với gia tốc 6 000 g trong 1 min ở nhiệt độ phòng;

– Thay ống thu ở dưới cột lọc;

– Thêm 500 µl dung dịch AW1 (Wash buffer 1) vào cột lọc có ống thu ở dưới;

– Ly tâm bằng máy ly tâm (4.1.3) với gia tốc 6 000 g trong 1 min ở nhiệt độ phòng;

– Thay ống thu ở dưới cột lọc;

– Thêm 500 µl dung dịch AW2 (Wash buffer 2) vào cột lọc có ống thu ở dưới;

– Ly tâm bằng máy ly tâm (4.1.3) với gia tốc 20 000 g trong 3 min ở nhiệt độ phòng;

– Chuyển cột lọc 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;

– Ly tâm bằng máy ly tâm (4.1.3) với gia tốc 6 000 g trong 1 min;

– Chuyển ADN đã thu được sang ống eppendorf 1,5 ml khác.

- Bảo quản mẫu ADN ở 2-8°C trong vài tuần và -20°C trong thời gian lâu

B.2. Tách chiết ADN bằng TACO RNA/ADN extraction Kit

B.2.1 Vật liệu: Bộ kit chiết tách TACO RNA/ADN extraction Kit (GeneReach Cat. No. atc-d/rna, 320 tests)

Etanol 100% (cồn tuyệt đối)

B.2.2 Chuẩn bị:

- Pha dung dịch đệm rửa A(washing buffer A) với 135ml cồn tuyệt đối
- Pha dung dịch đệm rửa B(washing buffer B) với 230ml cồn tuyệt đối
- Tiến hành theo sơ đồ

Thuốc Thử	Lượng (µl)	Thuốc thử	Lượng (µl)		H	G	F	E	D	C	B	A
Cồn tuyệt đối	250			►1								
Dung dịch đệm rửa A	750	Hạt từ	50	►2								
Dung dịch đệm rửa A	750			►3								
Dung dịch đệm rửa B	750			►4								
Dung dịch đệm rửa B	750			►5								
Nước đệm	100			►6								
Giống như trên				►7								
				►8								
				►9								
				►10								
				►11								
				►12								

- Cho 250 μ L dung dịch đệm vào các ống Eppendorf.
- Cho 100 μ L/mẫu vào ống eppendorf chứa dung đệm.
- Lắc bằng máy vortex (4.1.4) trong 15 giây.
- Ly tâm 12000rpm trong 1 phút.
- Cho 350 μ L (mẫu và dung dịch đệm) vào các giếng ở cột 1 hoặc 7.

B.2.4 Đưa mẫu vào máy TACO

- Đặt đĩa vào máy TACO
- Đặt lược vào máy TACO.
- Sử dụng máy TACO theo hướng dẫn sử dụng: Máy TACO tự động chiết tách trong khoảng 50 min.
- Thu 100 μ L ADN/RNA từ các giếng trong cột 6 hoặc 12 sang các ống eppendorf mới.

CHÚ Ý: Mẫu đối chứng âm và mẫu đối chứng dương đều được tách chiết ADN trong cùng thời điểm với mẫu cần phát hiện vi rút sốt xuất huyết.

Phụ lục C

(Quy định)

Phương pháp Nested PCR phát hiện WSSV

C.1 Trình tự cặp mồi

Bảng C.1 – Trình tự cặp mồi^[8]

Tên mồi	Trình tự	Kích thước sản phẩm, bp
146F1	5'-ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCTAG-3'	1447
146R1	5'-TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A-3'	
146F2	5'-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A-3'	941
146R2	5'-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3'	

C.2 Thực hiện phản ứng Nested PCR

Kỹ thuật nested PCR bao gồm 2 giai đoạn (hoặc 2 bước):

Giai đoạn 1 (bước 1): Chuẩn bị dung dịch cho phản ứng sử dụng cặp mồi 146F1/146R1 đã được chuẩn bị và kit nhân gen (3.2.4) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thành phần cho 1 phản ứng bước 1 (xem Bảng C.2).

Ví dụ: Sử dụng kit nhân gen PCR Master mix của Thermo, Cat.No: #k0171.⁵⁾

Bảng C.2 – Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Nồng độ, μM	Thể tích cho 1 phản ứng, μl
Nước không có RNA/ADN		8,0
Dung dịch Master Mix		12,5
Mồi 146F1	20	1
Mồi 146R1	20	1
Tổng thể tích		22,5

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

⁵⁾ 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.

Mẫu đối chứng dương: Cho 2,5 µl mẫu ADN đã được giám định hoặc sử dụng các chủng WSSV chuẩn.

Mẫu đối chứng âm: Cho 2,5 µl nước tinh khiết không có nuclease.

Mẫu thử: Cho 2,5 µl mẫu ADN kiểm tra vào ống phản ứng.

Tiến hành phản ứng PCR bằng máy nhân gen (4.1.1) đã cài đặt chu trình nhiệt (xem Bảng C.3).

Bảng C.3 – Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

Nhiệt độ, °C	Thời gian	Số chu kỳ
94	4 min	1
55	1 min	1
72	2 min	1
94	30 s	39
55	30 s	
72	2 min	
72	5 min	1

Giai đoạn 2 (bước 2): Chuẩn bị dung dịch cho phản ứng sử dụng cặp mồi 146F2/146R2 đã được chuẩn bị và kit nhân gen (3.2.4) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thành phần cho 1 phản ứng bước 2 (xem Bảng C.4).

VÍ DỤ: Sử dụng kit nhân gen PCR Master mix của Thermo, Cat.No: #k0171.⁶⁾

Bảng C.4 – Thành phần phản ứng Nested PCR

Thành phần	Nồng độ, µM	Thể tích cho 1 phản ứng, µl
Nước không có RNA/ADN		8,0
Dung dịch Master Mix		12,5
Mồi 146F2	20	1
Mồi 146R2	20	1
Tổng thể tích dung dịch đệm thực hiện phản ứng		22,5

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

- Mẫu đối chứng dương: chuyển 2,5 µl sản phẩm bước 1 vào ống phản ứng mới
- Mẫu đối chứng âm: chuyển 2,5 µl sản phẩm bước 1 vào ống phản ứng mới
- Mẫu thử: chuyển 2,5 µl sản phẩm bước 1 vào ống phản ứng mới

⁶⁾ 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.

Tiến hành phản ứng PCR bằng máy nhân gen (4.1.1) đã cài đặt chu trình nhiệt (xem Bảng C.5)

Bảng C.5 – Chu trình nhiệt của phản ứng PCR bước 2

Nhiệt độ, °C	Thời gian	Số chu kỳ
94	4 min	1
55	1 min	1
72	2 min	1
94	30 s	39
55	30 s	
72	2 min	
72	5 min	1

Kết thúc chu trình nhiệt của phản ứng Nested PCR tiến hành điện di theo (6.1.4.4)

Phụ lục D

(Quy định)

Phương pháp Realtime PCR phát hiện WSSV

D.1 Trình tự cặp mồi

Bảng D.1 – Trình tự cặp mồi và đoạn dò^[8]

Tên mồi và đoạn dò	Trình tự	Kích thước sản phẩm, bp
WSSV1011F	5'- Tgg TCC CgT CCT CAT CTC Ag -3 '	69
WSSV1079R	5'- gCT gCC TTg CCg gAA ATT A -3 '	
WSSV-p	5'- 6FAM- AgC CAT gAA gAA TgC CgT CTA TCA CAC A -BHQ1- 3'	

D.2 Thực hiện phản ứng Realtime PCR

Chuẩn bị dung dịch cho phản ứng sử dụng cặp mồi đặc hiệu WSSV1011F /WSSV1079R và đoạn dò WSSV-p (3.2.2), sử dụng kit nhân gen (3.2.5) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví dụ: Sử dụng kit nhân gen của Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG, Cat.No: 11730-017⁷⁾.

Thành phần cho 1 phản ứng (xem Bảng D.2).

Bảng D.2 – Thành phần phản ứng realtime PCR

Thành phần	Nồng độ (µM)	Thể tích cho 1 phản ứng (µl)
Nước không có RNA/ADN		6,0
Dung dịch 2X reaction mix		12,5
Mồi WSSV1011F	20	0,5
Mồi WSSV1079R	20	0,5
Đoạn dò WSSV-p	6	0,5
Tổng thể tích dung dịch đệm thực hiện phản ứng		20

Chuyển 20 µl hỗn hợp nhân gen vào mỗi ống phản ứng:

Mẫu đối chứng dương: Cho 5 µl mẫu ADN đã được giám định hoặc sử dụng các chủng WSSV chuẩn.

⁷⁾ 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.

Mẫu đối chứng âm: Cho 5 µl nước tinh khiết không có nuclease.

Mẫu thử: Cho 5 µl mẫu ADN kiểm tra vào ống phản ứng.

Tiến hành phản ứng PCR bằng máy nhân gen (4.1.2) đã cài đặt chu trình nhiệt (xem Bảng D.3).

Bảng D.3 – Chu trình nhiệt của phản ứng realtime PCR

Nhiệt độ, °C	Thời gian	Số chu kỳ
50	02 min	01
95	02 min	01
95	15 s	40
60(*)	60 s	
Giữ ở 4 °C đến khi tắt máy		

CHÚ THÍCH BẢNG: (*) Nhiệt độ và thời gian này phù hợp với máy Realtime PCR ABI 7500

- [1] Bùi Quang Tề. 2008, *Bệnh truyền nhiễm của động vật thủy sản*.p.122-128.
 - [2] Đỗ Thị Hòa, Bùi Quang Tề, Nguyễn Hữu Dũng, Nguyễn Thị Muội. 2004. *Bệnh truyền nhiễm của động vật thủy sản*.P. 184-189.
 - [3] FAO/NACA. 2001. *Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases*. FAO Fish. Pap. No.402/2: p. 237 pp.
 - [4] Flegel, T.W. 1997. *Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (Penaeus monodon) in Thailand*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 13 : p. 442.
 - [5] Hameed, A.S., Balasubramanian. G., Musthaq, S.S., Yoganandhan. K. 2003. *Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV)*. 57: p. 157-161.
 - [6] Lightner, D.V. 1996. *A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp*. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society.
 - [7] Li, Q., Zhange, Z., Chen, Y., Yang, F. 2003. *White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for Artemia at different developmental stages*. Disease of Aquatic Organism. 57: p. 261-264.
 - [8] Oie. 2017. *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals*.Chapter 2.2.8.
 - [9] TCVN 8710-03: 2011 *Quy trình chẩn đoán bệnh Đốm trắng ở tôm (WSSV)*.
 - [10] TCVN 1-2: 2008 *Xây dựng tiêu chuẩn – Phần 2: Quy định về trình bày và thể hiện nội dung tiêu chuẩn quốc gia*.
 - [11] TCCS 01:2014/TY-TS *Quy trình xét nghiệm phát hiện vi rút gây hội chứng đốm trắng (WSSV) ở tôm bằng kỹ thuật realtime PCR*.
 - [12] TCCS 01:2018/TY-TS *Quy trình xét nghiệm phát hiện vi rút gây hội chứng đốm trắng (WSSV) ở tôm bằng kỹ thuật realtime PCR*.
-