



TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8710-8:2023

Xuất bản lần 2

**BỆNH THỦY SẢN – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN 8: BỆNH HOẠI TỬ CƠ Ở TÔM (IMNV)**

*Aquatic Animal Disease - Diagnostic procedure -
Part 8: Infectious myonecrosis virus on shrimp*

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 8710-8: 2023 thay thế TCVN 8710-8: 2012

TCVN 8710-8:2023 được xây dựng trên cơ sở tham khảo OIE/WOAH, 2019 *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals*. Chapter 2.2.5. *Infection with infectious myonecrosis virus*

TCVN 8710-8:2023 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 tiêu chuẩn TCVN 8710 *Bệnh thủy sản – Quy trình chẩn đoán* gồm các phần sau đây:

- TCVN 8710-1:2011, *Phần 1: Bệnh còi do vi rút ở tôm;*
- TCVN 8710-2:2019, *Phần 2: Bệnh hoại tử thần kinh ở cá biển;*
- TCVN 8710-3:2019, *Phần 3: Bệnh đốm trắng ở tôm;*
- TCVN 8710-4:2019, *Phần 4: Bệnh đầu vàng ở tôm;*
- TCVN 8710-5:2023, *Phần 5: Hội chứng taura ở tôm;*
- TCVN 8710-6:2019, *Phần 6: Bệnh do Koi herpesvi rút ở cá chép;*
- TCVN 8710-7:2019, *Phần 7: Bệnh xuất huyết mùa xuân ở cá chép;*
- TCVN 8710-8:2023, *Phần 8: Bệnh hoại tử cơ ở tôm (IMNV);*
- TCVN 8710-9:2012, *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 8710-12:2019, *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 hydrophila ở cá;*
- TCVN 8710-16:2016, *Phần 16: Bệnh gan thận mũ 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;*
- TCVN 8710-22:2022, *Phần 22: Bệnh sán lá 16 móc ở cá;*
- TCVN 8710-23:2022, *Phần 23: Bệnh hoại tử cơ quan tạo máu do IHNV ở cá hồi;*
- TCVN 8710-24:2022, *Phần 24: Bệnh do sán lá Dollfusurema sp. ở cá da trơn;*
- TCVN 8710-25:2022, *Phần 25: Bệnh do ký sinh trùng Bonamia ostreae và Bonamia exitiosa ở hào.*

TCVN 8710-8:2023

- TCVN 8710-26:2023, *Phần 26: Bệnh hoại tử cơ quan tạo máu do EHNV ở cá*
- TCVN 8710-27:2023, *Phần 27: Bệnh do vi rút Tilapia lake (TiLV) ở cá rô phi*
- TCVN 8710-28:2023, *Phần 28: Bệnh do RSIV ở cá biển*

Bệnh thủy sản – Quy trình chẩn đoán –

Phần 8: Bệnh hoại tử cơ ở tôm (IMNV)

Aquatic animal disease – Diagnostic procedure –

Part 8: Infectious myonecrosis virus on 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 quy định quy trình chẩn đoán bệnh hoại tử cơ ở tôm (IMN).

2 Thuật ngữ, định nghĩa và các từ viết tắt

2.1 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1.1

Bệnh hoại tử cơ ở tôm (IMN)

Bệnh truyền nhiễm do tác nhân infectious myonecrosis virus (IMNV) gây ra ở tôm, tôm bị bệnh hoại tử cơ ban đầu cơ đuôi có hiện tượng màu trắng đục sữa, sau đó lan dần khắp cơ thể. Tôm bị bệnh nặng có hiện tượng hoại tử và đổ ở phần cơ này.

2.1.2

Vi rút gây bệnh hoại tử cơ (Infectious myonecrosis virus)

IMNV là vi rút thuộc Chi *Giardiavirus lamblia*, họ *Totiviridae*. IMNV có hình dạng tứ diện và đường kính 40nm, mật độ nổi 1.366 g/ml. Bộ gen bao gồm một phân tử ARN đơn, chuỗi kép (ds) có kích thước 8226–8230 bp.

2.2 Các từ viết tắt

- **IMNV:** Infectious myonecrosis virus;
- **ADN (Deoxyribonucleic acid):** Axit deoxyribonucleic;
- **ARN (Ribonucleic acid):** Axit Ribonucleic;
- **PBS (Phosphate buffered saline):** Dung dịch muối đệm phosphat;
- **RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction):**
Phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược;
- **Realtime RT-PCR (Realtime Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction):**
Phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược theo thời gian thực;
- **TAE (Tris-acetate-EDTA):** Tris-axetat-axit etylendiamintetraaxetic;
- **TBE (Tris-borate-EDTA):** Tris-borat-axit etylendiamintetraaxetic;
- **TE (Tris-EDTA):** Tris-axit etylendiamintetraaxetic.

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 Ethanol, từ 70 % đến ethanol tuyệt đối

3.1.2 Dung dịch muối đệm phosphate (PBS)

3.2 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phương pháp sinh học phân tử

3.2.1 Mồi và dò (primers/probe) realtime RT - PCR, gồm mồi xuôi, mồi ngược và dò

3.2.2 Mồi (primers) Nested RT-PCR, gồm mồi xuôi và mồi ngược

3.2.3 Kit nhân gen PCR

3.2.4 Kit nhân gen RT- PCR

3.2.5 Kit nhân gen Realtime RT- PCR

3.2.6 Kit tách chiết ARN

3.2.7 Thạch agarose

3.2.8 Dung dịch đệm TAE hoặc TBE (xem A.1)

3.2.9 Chất nhuộm màu, Ví dụ: Sybr safe

3.2.10 Chất đệm tải mẫu (Loading dye 6X)

3.2.11 Thang chuẩn ADN (Ladder/ Marker)

3.2.12 Dung dịch đệm TE

3.2.13 Nước tinh khiết, không có nuclease.

3.3 Thuốc thử và vật liệu dùng cho kiểm tra bệnh tích vi thể bằng phương pháp nhuộm HE

3.3.1 Dung dịch Davidsson

3.3.2 Xylen

3.3.3 Thuốc nhuộm Haematoxylin

3.3.4 Thuốc nhuộm Eosin

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

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 Tủ lạnh, có thể duy trì ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C

4.1.2 Tủ lạnh âm sâu, có thể duy trì ở nhiệt độ từ âm 20 °C tới âm 80 °C

4.1.3 Buồng cấy an toàn sinh học cấp 2

4.1.4 Pipet đơn kênh các loại

4.1.5 Ống đong, dung tích 100 mL; 500 mL; 1000 mL

4.1.6 Máy ly tâm, có thể hoạt động với gia tốc 2 000 g đến 4 000 g và gia tốc 12 000 g

4.1.7 Máy nghiền mẫu

TCVN 8710-8:2023

4.1.8 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg

4.1.9 Dụng cụ chứa mẫu, kín, có nắp đậy, không rò rỉ, vô trùng

4.1.10 Panh, kéo, vô trùng

4.1.11 Máy ủ nhiệt, từ 0 °C đến 100 °C

4.2 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp sinh học phân tử

4.2.1 Máy nhân gen PCR

4.2.2 Máy realtime PCR

4.2.3 Máy tách chiết ARN/ADN

4.2.4 Máy lắc trộn Vortex

4.2.5 Máy đọc sản phẩm PCR

4.2.6 Bộ điện di, gồm bộ nguồn và bể chạy điện di

4.2.7 Khay đựng đá lạnh

4.2.8 Bộ khuôn và lược đổ thạch

4.3 Thiết bị, dụng cụ dùng cho kiểm tra bệnh tích vi thể bằng phương pháp nhuộm HE

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

4.3.2 Máy xử lý mẫu mô tự động

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

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

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

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

4.3.7 Nồi dẫn tiêu bản, có thể duy trì nhiệt độ từ 35 °C đến 65 °C

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

4.3.9 Lamen, vô trùng

4.3.10 Lam kính, vô trùng

4.3.11 Keo dán (Bom Canada)

4.3.12 Bút ghi kính

4.3.13 Máy sấy mẫu sau cắt.

5 Chẩn đoán lâm sàng

5.1 Đặc điểm dịch tễ

- Các loài tôm dễ nhiễm vi rút như tôm thẻ chân trắng (*P. vannamei*), tôm sú (*Penaeus monodon*), tôm sú nâu (*Penaeus esculentus*), tôm chuối (*P. merguensis*), tôm xanh Nam Mỹ (*Penaeus stylirostris*) và tôm nâu phương nam (*Penaeus subtilis*).
- Các cơ quan và mô đích bị nhiễm vi rút: cơ thịt (cơ vân), mô liên kết, tế bào máu và các tế bào nhu mô của cơ quan lymphoid.
- Vi rút IMNV thường gây tỉ lệ chết cao nhất cho tôm thẻ chân trắng từ 40 đến 70% tổng đàn. IMNV có thể xảy ra ở bất kỳ giai đoạn phát triển nào của tôm và là một bệnh nhiễm trùng mãn tính. Tỷ lệ tử vong có thể lên tới 70% vào cuối chu kỳ nuôi.
- Lứa tuổi mắc bệnh: Tôm thẻ chân trắng (*P. vannamei*) ở giai đoạn tôm giống (Juvenile) và tiền trưởng thành (subadult) thường nhạy cảm nhất với mầm bệnh.
- Bệnh có thể lây truyền theo chiều ngang: con tôm bệnh lây sang con tôm khỏe hoặc lây truyền qua môi trường nước.
- Nhiệt độ và nồng độ muối được xem là một trong những yếu tố môi trường có ảnh hưởng đến quá trình phát bệnh của bệnh hoại tử cơ.

5.2 Triệu chứng và bệnh tích

- Tôm bị bệnh hoại tử cơ ở giai đoạn cấp tính xuất hiện các vùng hoại tử trắng rộng ở các cơ vân như phần cơ bụng và cơ đuôi, đặc biệt là phần bụng dẫn đến hiện tượng hoại tử. Sau khi chết các phần này có màu đỏ tương tự như màu của tôm nấu chín.
- Dấu hiệu lâm sàng: Tôm nhiễm IMNV trở nên lờ đờ và giảm ăn, có màu trắng đục cơ, thường nổi bật hơn ở tôm thẻ chân trắng *P. vannamei* so với tôm xanh *P. stylirostris* và tôm sú *P. monodon*.
- Kích thước của cơ quan bạch huyết của tôm nhiễm IMNV tăng gấp 2 đến 4 lần so với kích thước thông thường.

6 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

6.1 Phương pháp sinh học phân tử

6.1.1 Lấy mẫu

TCVN 8710-8:2023

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

- Tôm giống, ấu trùng và hậu ấu trùng: Lấy nguyên con, từ 100 mg đến 500mg/ mẫu
- Tôm thương phẩm: Lấy nguyên con, từ 5 con/mẫu đến 10 con/mẫu hoặc lấy mang, máu, biểu mô dưới vỏ kitin, chân bơi của 5 con/mẫu đến 10 con/mẫu
- Tôm bố mẹ: Lấy nguyên con, 1 con/mẫu hoặc lấy mang, chân bơi của 1 con/mẫu

Thu mẫu tôm có dấu hiệu bệnh lý, còn sống hoặc mới chết. Mẫu bệnh phẩm phải được lấy vô trùng và để riêng biệt trong dụng cụ chứa mẫu (4.1.9).

6.1.2 Bảo quản mẫu

Bảo quản vận chuyển: Bảo quản mẫu ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C không quá 48 h từ khi lấy mẫu đến khi vận chuyển về phòng thí nghiệm hoặc bảo quản trong ethanol 70 % đến ethanol tuyệt đối với tỉ lệ 1:10 (1 phần mẫu:9 phần ethanol).

Bảo quản tại phòng thí nghiệm: Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C chuyển đến phòng thí nghiệm chưa phân tích ngay phải được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C đến âm 80 °C hoặc được bảo quản trong dung dịch PBS (3.1.2) theo tỉ lệ 1:10 (1 phần mẫu:9 phần PBS) ở nhiệt độ âm 20 °C đến âm 80 °C hoặc bảo quản trong ethanol từ 70 % đến ethanol tuyệt đối.

6.1.3 Chuẩn bị mẫu

Dùng panh, kéo (4.1.10) vô trùng để thực hiện các thao tác: tách, cắt lấy mẫu (mang, máu, biểu mô dưới vỏ kitin, chân bơi). Mẫu được chia thành hai phần: một phần cho thực hiện xét nghiệm và một phần lưu trữ.

Lượng mẫu lấy để tách chiết ARN khoảng 30 mg.

Cho 30 mg mẫu vào dung dịch PBS (3.1.2) với tỷ lệ 1:10 (1 thể tích mẫu:9 thể tích PBS), đồng nhất mẫu bằng máy nghiền mẫu (4.1.7) hoặc bằng cối, chày nghiền mẫu để tạo thành huyền dịch 10 %. Chuyển huyền dịch vào 2 ống vô trùng đóng nắp, một ống mẫu để xét nghiệm và một ống lưu mẫu.

CHÚ Ý: Với mẫu đã bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C đến âm 80 °C cần rã đông ngoài nhiệt độ phòng trước khi thực hiện đồng nhất mẫu.

6.1.4 Tách chiết ARN

Sử dụng bộ kit tách chiết (3.2.6) thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví dụ: Sử dụng kit tách chiết ARN: InviMAG[®]Virus DNA/RNA Mini Kit/ KF96, Cat. No: 7441050100 (xem phụ lục B1) hoặc sử dụng kit tách chiết TACO RNA/DNA extraction Kit (GeneReach Cat. No. atc-d/rna, 320 tests (xem phụ lục B2) hoặc PureLink[®] Viral RNA/DNA mini kit (50) (Cat. No: 12280-050) xem phụ lục B3)¹⁾

6.1.5 Phương pháp Nested RT-PCR

6.1.5.1 Chuẩn bị mẫu

Phương pháp Nested RT-PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu 4587F/ 4914R và 4725NF/4863NR (3.2.2) để phát hiện vi rút gây hoại tử cơ ở tôm

Trình tự cặp mồi (xem phụ lục C, Bảng C1).

Mẫu được chuẩn bị như sau:

- Mẫu ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy ly tâm (4.1.6) trong 30 s để mẫu lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Dùng dung dịch đệm TE (3.2.12) để hoàn nguyên mẫu ở nồng độ 100 µM làm gốc.
- Mẫu được sử dụng ở nồng độ 20 µM: Pha loãng mẫu gốc bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.13) (20 µl mẫu gốc và 80 µl nước tinh khiết không có nuclease).

6.1.5.2 Tiến hành phản ứng Nested RT-PCR

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy nhân gen PCR (4.2.1) theo phương pháp Nested RT-PCR khuếch đại đoạn gen đặc hiệu của vi rút gây bệnh hoại tử cơ ở tôm sử dụng cặp mồi 4587F/ 4914R và 4725F/4863R (3.2.2) (xem phụ lục C)

6.1.5.3 Điện di

6.1.5.3.1 Chuẩn bị bản thạch

Pha thạch với nồng độ agarose (3.2.7) từ 1,5 % đến 2 % bằng dung dịch đệm TBE 1X hoặc TAE 1X (3.2.8) 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 (3.2.9) 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.

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.

TCVN 8710-8:2023

Chuyển bản thạch vào bể điện di (4.2.6), đổ dung dịch đệm (TBE 1X hoặc TAE 1X) cùng loại với dung dịch pha 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 DNA gel stain và sử dụng theo quy định của nhà sản xuất).

6.1.5.3.2 Chạy điện di

Hút 2 µl chất đệm tải mẫu (Loading dye 6X) (3.2.10) vào 8 µl sản phẩm PCR trộn đều và cho vào các giếng trên bản thạch. Thực hiện điện di trong bộ điện di, chạy kèm theo thang chuẩn ADN (3.2.11) để so sánh kích thước sản phẩm khuếch đại. Hút 10 µl thang chuẩn ADN (3.2.11) vào một giếng trên bản thạch.

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

6.1.5.4 Đọc kết quả

Sau khi điện di, đọc kết quả trên máy đọc sản phẩm PCR (4.2.5).

Điều kiện của phản ứng được công nhận khi:

- Đối chứng âm không có vạch sáng (không có sản phẩm khuếch đại);
- Đối chứng dương có vạch sáng kích thước 328 bp và 139 bp
- Thang chuẩn ADN sáng và chia vạch rõ ràng

Với điều kiện phản ứng trên

Mẫu xét nghiệm âm tính khi:

- Tại giếng của mẫu thử không xuất hiện vạch sáng (không có sản phẩm khuếch đại);

Mẫu xét nghiệm dương tính khi:

- Tại giếng của mẫu thử xuất hiện vạch sáng kích thước 328 bp và 139 bp (mẫu dương yếu chỉ có kích thước 139 bp).

6.1.6 Phương pháp realtime RT - PCR

6.1.6.1 Tách chiết ARN

Sử dụng bộ kit tách chiết ARN (3.2.6) thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví DỤ: Sử dụng kit tách chiết ARN: PureLink Viral RNA/DNAmini kit (50) (Cat. No: 12280-050)²⁾ (xem phụ lục B)

6.1.6.2 Chuẩn bị mẫu

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy realtime PCR (4.2.2) theo phương pháp realtime RT-PCR khuếch đại đoạn gen đặc hiệu của vi rút gây hoại tử cơ sử dụng cặp mồi IMNV142F / IMNV545R và đoạn dò Taqman IMNV-p1 (3.2.1). Trình tự cặp mồi được nêu trong Bảng Trình tự cặp mồi (xem phụ lục D, Bảng D1).

Mẫu được chuẩn bị như sau:

- Mẫu ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy ly tâm (4.1.6) trong 30 s để mẫu lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Khi hoàn nguyên, nên dùng dung dịch đệm TE (3.2.12) để hoàn nguyên mẫu ở nồng độ 100 µM làm gốc.
- Mẫu được sử dụng ở nồng độ 20 µM: pha loãng mẫu gốc bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.13) (20 µl mẫu gốc và 80 µl nước tinh khiết không có nuclease).
- Đoạn dò Taqman IMNV-p1 sử dụng nồng độ 10 µM: pha loãng đoạn dò bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.13) (10 µl mẫu gốc và 90 µl nước tinh khiết không có nuclease)

6.1.6.3 Tiến hành phản ứng realtime RT - PCR

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy realtime PCR (4.2.2) theo phương pháp realtime RT-PCR sử dụng cặp mồi IMNV 142F và IMNV 545R đầu dò IMNV p1, sử dụng kit nhân gen realtime RT-PCR (3.2.5) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6.1.6.4 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

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.

TCVN 8710-8:2023

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

6.2 Phương pháp kiểm tra bệnh tích vi thể bằng phương pháp nhuộm HE

6.2.1 Lấy mẫu

Tôm ấu trùng, hậu ấu trùng sử dụng nguyên con. Tôm bố mẹ, tôm thương phẩm lấy nguyên con hoặc bộ phận đầu ngực có chứa khối gan tụy ($< 1 \text{ cm}^3$). Cố định mẫu trong dung dịch Davidson (3.3.1) ngay sau khi lấy mẫu với tỷ lệ mẫu và dung dịch Davidson là 1: 10.

6.2.2 Bảo quản mẫu

Mẫu cố định trong Davidson (3.3.1) chuyển đến phòng thí nghiệm trong khoảng từ 24 h đến 72 h sau khi lấy mẫu

6.2.3 Chuẩn bị mẫu

Mẫu cố định trong Davidson (3.3.1) khoảng từ 24 h đến 72 h.

Mẫu được chuyển sang ethanol 70%

Lấy bệnh phẩm đã cố định trong ethanol hoặc Davidson cắt miếng nhỏ dày khoảng 1 mm, dài khoảng 1 cm cho vào khuôn nhựa (4.3.1).

6.2.4 Cách tiến hành

Tiến hành xử lý mẫu, cắt tiêu bản và nhuộm tiêu bản tiêu bản Haematoxylin và Eosin theo hướng dẫn (xem phụ lục E).

6.2.5 Đọc kết quả

Soi kính hiển vi từ vật kính có độ phóng đại thấp đến vật kính có độ phóng đại cao. 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 IMNV 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.

7 Kết luận

Mẫu tôm được xác định mắc bệnh hoại tử cơ (IMNV) khi có những đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đặc trưng của bệnh và:

- Có kết quả dương tính với IMNV bằng phương pháp Nested RT- PCR hoặc
- Có kết quả dương tính với IMNV bằng phương pháp realtime RT- PCR hoặc
- Phát hiện được bệnh tích vi thể đặc trưng bằng phương pháp nhuộm HE.

Phụ lục A
(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị thuốc thử

A.1 Dung dịch đệm TAE 1X hoặc TBE 1X

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 muối đệm phosphat (PBS)

A.2.1 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 g

Kali dihydro photphat (KH_2PO_4) 0,2 g

Kali clorua (KCl) 0,2 g

Nước cất 1000 ml

A.2.2 Chuẩn bị

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

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

A.3 Dung dịch Davidson

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

A.4 Thuốc nhuộm hematoxylin (dung dịch hematoxylin – Mayer)

Hematoxylin dạng tinh thể:	1 g
Natri iodat:	0,2 g
Amoni alum $[\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2]$ hoặc kali alum $[\text{KAl}(\text{SO}_4)_2]$: 50 g	Axit xitric: 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 xitric và chloral hydrat rồi lọc qua giấy lọc.

Bảo quản dung dịch đã pha trong chai tối màu.

A.5 Thuốc nhuộm eosin

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

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

Bảo quản dung dịch đã pha trong chai tối màu.

Phụ lục B
(Tham khảo)

Quy trình tách chiết ARN

CẢNH BÁO: Việc tách chiết ARN 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.

B1. Tách chiết ARN bằng bộ kit InviMAG®Virus DNA/RNA Mini Kit/ KF96

B1.1. Chuẩn bị hóa chất

Các hóa chất cần được chuẩn bị và bảo quản theo đúng hướng dẫn của bộ kit InviMAG®Virus DNA/RNA Mini Kit/ KF96, Cat. No: 7441050100, với thể tích vừa đủ cho số lượng mẫu chiết tách, bao gồm:

- (1) Dung dịch đệm Lysis Buffer RV
- (2) Dung dịch rửa 1 (Wash 1)
- (3) Dung dịch rửa 2 (Wash 2)
- (4) Hỗn hợp hạt từ tính (Bead Mix)
- (5) Dung dịch thu hồi ADN/ARN Elution Buffer (EB)

Nếu chiết tách RNA bằng máy chiết tách tự động Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex, cần phải chuẩn bị trước các đĩa chứa dung dịch chiết tách theo hệ thống của máy như sau:

- + Đĩa Washing 1: 800µl dung dịch Wash 1/giếng;
- + Đĩa Washing Wash 2 và Washing Wash 3: 800µl dung dịch Wash 2/giếng;
- + Đĩa Elution Buffer: 100µl dung dịch EB/giếng.

B1.2. Tiến hành

- Hủy dịch 10% của mẫu bệnh phẩm được rã đông, trộn đều bằng máy vortex. Ly tâm mẫu trong máy ly tâm lạnh với lực ly tâm 2500 g/15 min.

- Hút 200µl dịch trong bên trên sau khi ly tâm vào ống eppendorf 1,5ml vô trùng có chứa sẵn 200 µl dung dịch đệm Lysis. Trộn đều mẫu bằng máy vortex và spin để kéo các phần bám trên nắp ống xuống.

- Chuyển toàn bộ dung dịch trong ống eppendorf vào đĩa chứa mẫu 96 giếng (mỗi giếng tương ứng với một mẫu chiết tách). Dùng giấy dán đĩa chuyên dụng dán kín mặt đĩa.

- Đặt đĩa lên máy lắc, ủ nhiệt (HLC-MHR23). Lắc đĩa với gia tốc 750rpm/15 min, nhiệt độ 65 °C.

- Lấy đĩa ra khỏi máy lắc, để nguội trong 5 min, tháo bỏ giấy dán đĩa. Bổ sung 420 µl dung dịch Bead Mix (gồm có 400 µl Binding solution và 20 µl MAP) vào mỗi giếng.

- Chuyển tất cả các đĩa bao gồm: đĩa Tip Combs, đĩa Elution Buffer, đĩa Washing Wash 3, đĩa Washing Wash 2, đĩa Washing Wash 1 và đĩa chứa mẫu vào từng khay của máy chiết tách tự động theo hướng dẫn của máy.
- Chọn chương trình chiết tách RNA đã được cài đặt trước đó theo hướng dẫn của hãng sản xuất kit InviMAG®Virus DNA/RNA Mini Kit/ KF96.
- Sau 34 min, quá trình chiết tách hoàn tất. Thu hồi ARN của từng giếng vào ống eppendorf 0.5 ml tương ứng đã ghi rõ ký hiệu mẫu.
- Bảo quản mẫu ARN ở 4 °C trong vài giờ và âm 20 °C đến âm 80 °C trong thời gian lâu hơn.

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

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

Ethanol tuyệt đối

B.2.2 Chuẩn bị:

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

Thuốc Thử	Lượng (µl)	Thuốc thử	Lượng (µl)		H	G	F	E	D	C	B	A
Ethanol 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								
Ethanol tuyệt đối	250	–	–	► 7								
Dung dịch đệm rửa A	750	Hạt từ	50	► 8								
Dung dịch đệm rửa A	750	–	–	► 9								
Dung dịch đệm rửa B	750	–	–	► 10								
Dung dịch đệm rửa B	750	–	–	► 11								
Nước đệm	100	–	–	► 12								

TCVN 8710-8:2023

B.2.3 Chuẩn bị mẫu:

- Cho 250 µL/mẫu dung dịch đệm vào các ống eppendorf.
- Cho 100 µL/mẫu vào ống eppendorf chứa dung dịch đệm.
- Lắc bằng máy lắc trộn vortex (4.2.4) trong 15 s.
- Ly tâm 12000 g trong 1 min.
- Cho 350 µL (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 µL ADN 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 ARN trong cùng thời điểm với mẫu cần phát hiện

B.3. Tách chiết ARN bằng bộ kit Invitrogen PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit

B.3.1. Chuẩn bị hoá chất

Các hóa chất cần được chuẩn bị và bảo quản theo đúng hướng dẫn của bộ kit Invitrogen PureLink Viral RNA/DNA mini Kit, Cat. No: 12280-050, với thể tích vừa đủ cho số lượng mẫu chiết tách, bao gồm:

- Proteinase K
- Dung dịch đệm Lysis Buffer
- Dung dịch Carrier RNA
- Dung dịch Wash buffer (W5)
- Nước RNase-free (E3)
- Cách pha hỗn hợp dung dịch Carrier và Lysis Buffer

$$N \times 0.21 \text{ mL} = A \text{ mL}$$

$$A \text{ mL} \times 28 \text{ µL/mL} = B \text{ µL}$$

Trong đó: N là số mẫu cần tách chiết

A là tổng số mL Lysis Buffer cần cho N mẫu;

B là tổng số µL Carrier RNA cần cho N mẫu.

B.3.2. Tiến Hành

1. Cho 25 μL Proteinase K vào ống eppendorf 1,5 ml;

2. Cho 200 μL mẫu vào ống eppendorf chứa Proteinase K;

CHÚ Ý: nếu thể tích mẫu <200 μL thì có thể điều chỉnh thể tích mẫu cho đủ 200 μL bằng dung dịch PBS hoặc 0.9 % NaCl.

3. Cho hỗn hợp dung dịch Lysis Buffer và Carrier RNA vào ống chứa mẫu; đóng nắp ống và vortex 15s;

4. Ủ mẫu ở 56 °C trong 15 min;

5. Cho thêm 250 μL ethanol 96 % đến ethanol tuyệt đối vào ống mẫu; đóng nắp và vortex 15 s;

6. Để ở nhiệt độ phòng 5 min;

CHÚ Ý: mẫu mô sau khi để ở nhiệt độ phòng 5 min thì đem ly tâm 12.000 vòng trong 2 min và lấy dịch nổi bên trên.

7. Chuyển toàn bộ mẫu tách chiết vào cột lọc;

8. Ly tâm cột lọc ở 12.000 vòng trong 2 min đến 3 min; chuyển cột lọc sang ống thu mới;

9. Cho 500 μL nước rửa Wash buffer (W5) vào cột lọc; ly tâm 12.000 vòng trong 2 min đến 3 min; Chuyển cột lọc sang ống thu mới;

10. Lặp lại bước 9 với 500 μL nước rửa Wash buffer (W5) một lần nữa;

11. Loại bỏ ống thu và chuyển cột lọc sang ống thu mới;

12. Ly tâm khô 12000 vòng trong 1 min cho khô sạch nước rửa W5;

13. Chuyển cột lọc sang ống eppendorf 1,5 μL ;

14. Cho 10 - 50 μL nước RNase-free (E3) (có sẵn) vào cột lọc;

15. Để ở nhiệt độ phòng 1 min; Ly tâm cột lọc ở 12000 vòng trong 1 min đến 2 min.

16. Lấy sản phẩm dưới cột lọc; Bảo quản mẫu ARN ở 4 °C trong vài giờ và âm 20 °C đến âm 80 °C trong thời gian lâu hơn.

Phụ lục C

(Quy định)

Phương pháp Nested RT - PCR phát hiện vi rút gây hoại tử cơ ở tôm

C.1 Trình tự cặp mồi

Bảng C.1 – Trình tự cặp mồi ^[3]

Cặp mồi	Trình tự mồi từ đầu 5' tới 3'	Sản phẩm (bp)
4587F	CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA	328 bp
4914R	ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT	
4725NF	GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA	139 bp
4863NR	AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G	

C.2 Thực hiện phản ứng Nested RT - PCR

Kỹ thuật Nested RT - PCR bao gồm 2 bước:

Bước 1: Phản ứng RT - PCR

Chuẩn bị dung dịch cho phản ứng sử dụng cặp mồi 4587F/ 4914R đã được chuẩn bị (3.2.2) và kit nhân gen (3.2.4) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví DỤ: Chuẩn bị MasterMix cho phản ứng RT-PCR theo kit SuperScript® III One-Step RT-PCR with Platinum® Taq. Cat: 12574-026³⁾ hoặc kit tương đương theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

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

Bảng C.2 – Thành phần phản ứng RT - PCR

Thành phần	Nồng độ (µM)	Thể tích cho 1 phản ứng (µl)
Nước không có ARN/DNA		6
Dung dịch 2x Reaction Mix		12,5
Mồi 4587F	20	0,5
Mồi 4914R	20	0,5
Enzyme		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 ARN đã được giám định hoặc sử dụng các chủng chuẩn.

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

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

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

Tiến hành phản ứng RT - PCR bằng máy nhân gen (4.2.1) đã cài đặt chu trình nhiệt (xem Bảng C.3).

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

Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ (vòng)
50	25 min	1
94	2 min	1
94	15 s	30
55	30 s	
68	60 s	
68	5 min	1

Bước 2: Phản ứng Nested RT - PCR

Chuẩn bị dung dịch cho phản ứng sử dụng cặp mồi và 4725F/4863 R đã được chuẩn bị (3.2.2) và kit nhân gen (3.2.3) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví DỤ: Chuẩn bị Master mix cho phản ứng Nested RT-PCR theo kit Thermo Scienetific Dream Taq PCR Master Mix (2X), Cat. No: K 1071⁴⁾ hoặc kit tương đương theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Thành phần cho 1 phản ứng (xem bảng C.4).

Bảng C.4 – Thành phần phản ứng Nested RT - PCR

Thành phần	Nồng độ (μM)	Thể tích cho 1 phản ứng (μl)
Nước không có ARN/DNA		6,5
Dung dịch Master Mix 2X		12,5
Mồi 4725F	20	0,5
Mồi 4863R	20	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 3 μl mẫu cDNA là sản phẩm bước 1.

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.

TCVN 8710-8:2023

Mẫu đối chứng âm: Cho 3 µl nước tinh khiết không có nuclease.

Mẫu thử: Cho 3 µl mẫu sản phẩm của phản ứng RT - PCR tại bảng C2 vào ống phản ứng.

Tiến hành phản ứng Nested RT - PCR bằng máy nhân gen (4.2.1) đã cài đặt chu trình nhiệt (xem Bảng C.4).

Bảng C.4 – Chu trình nhiệt của phản ứng Nested RT - PCR

Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ (vòng)
95	2 min	1
95	30 s	30
55	30 s	
72	60 s	
72	10 min	1

CHÚ Ý:

- + Phản ứng Nested RT- PCR phải bao gồm: mẫu kiểm tra, mẫu kiểm chứng dương (mẫu chiết tách và mẫu chạy nhân gen) và mẫu kiểm chứng âm (mẫu chiết tách và mẫu chạy nhân gen);
- + Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng Nested RT - PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng;
- + Tùy theo kit sử dụng mà thành phần hỗn hợp phản ứng có thể khác nhau, việc thực hiện chuẩn bị hỗn hợp phản ứng nên tuân thủ theo hướng dẫn của kit được sử dụng.

Phụ lục D
(Quy định)

Phương pháp realtime RT - PCR phát hiện vi rút gây hoại tử cơ ở tôm.

D.1 Trình tự cặp mồi

Bảng D.1 – Trình tự cặp mồi ^[3]

Tên mồi	Trình tự cặp mồi
IMNV412F	5'-GGA CCT ATC ATA CAT AGC GTT GCA-3'
IMNV545R	5' AAC-CCA-TAT-CTA-TTGTCG-CTG-GAT -3'
IMNVp1	5'-6 FAM CCA CCT TTA CTT TCA ATA CTA CAT CAT CCC CGG –TAMRA-3'

D.2 Thực hiện phản ứng realtime RT - PCR

Kỹ thuật realtime RT - PCR bao gồm:

Chuẩn bị dung dịch cho phản ứng sử dụng cặp mồi IMNV412F và IMNV545R đã được chuẩn bị (3.2.1) và kit nhân gen realtime RT - PCR (3.2.5) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví DỤ: theo kit SuperScript III Platinum[®] one step qRT-PCR System, Cat.No: 11732-020⁵⁾ hoặc kit tương đương theo hướng dẫn của nhà sản xuất

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

Bảng D.2 – Thành phần phản ứng PCR

STT	Thành phần	Nồng độ (μM)	Thể tích cho 1 phản ứng (μl)
1	Nước không có RNA/ADN		5,5
2	Dung dịch 2X reaction mix		12,5
3	Mồi IMNV412F	20	0,5
4	Mồi IMNV545R	20	0,5
5	Đoạn dò IMNVp1	10	0,5
6	Enzyme		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:

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.

TCVN 8710-8:2023

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

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

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

Tiến hành phản ứng realtime RT - PCR bằng máy realtime PCR (4.2.2) đã cài đặt chu trình nhiệt được nêu trong bảng D.3.

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

Nhiệt độ, °C	Thời gian	Số chu kỳ (vòng)
50	15 min	01
95	02 min	01
95	15 s	40
60(*)	30 s	
Giữ ở 4 °C đến khi tắt máy		

CHÚ Ý:

- + Phản ứng realtime RT - PCR phải bao gồm: mẫu kiểm tra, mẫu kiểm chứng dương (mẫu chiết tách và mẫu chạy nhân gen) và mẫu kiểm chứng âm (mẫu chiết tách và mẫu chạy nhân gen);
- + Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng realtime RT - PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng;
- + Tùy theo kit sử dụng mà thành phần hỗn hợp phản ứng có thể khác nhau, việc thực hiện chuẩn bị hỗn hợp phản ứng nên tuân thủ theo hướng dẫn của kit được sử dụng.

Phụ lục E
(Quy định)

Phương pháp kiểm tra bệnh tích vi thể bằng phương pháp nhuộm HE

E.1 Xử lý mẫu

Chuyển khuôn chứa mẫu sang ngâm ethanol 70 % (thể tích) (3.1.1) trong thời gian từ 30 min đến 60 min;

Ngâm sang ethanol 90 % (3.1.1) trong thời gian từ 30 min đến 60 min;

Ngâm sang ethanol tuyệt đối (3.1.1) lần thứ nhất trong thời gian từ 30 min đến 60 min;

Ngâm sang ethanol tuyệt đối (3.1.1) lần thứ hai trong thời gian từ 30 min đến 60 min;

Ngâm sang xylene (3.3.2) lần thứ nhất trong thời gian từ 30 min đến 60 min;

Ngâm sang xylene (3.3.2) lần thứ hai trong thời gian từ 30 min đến 90 min;

Ngâm tẩm parafin (3.3.5) lần thứ nhất trong thời gian từ 30 min đến 90 min;

Ngâm tẩm parafin (3.3.5) lần thứ hai, thời gian 120 min;

CHÚ THÍCH: Tất cả các thao tác trên có thể được thực hiện trong máy xử lý mẫu mô tự động (4.2.2).

Đúc khuôn:

Sau đó, đưa mẫu vào khung đúc parafin: rót parafin nóng chảy từ nồi đun parafin (4.2.3) vào khay sắt (4.3.4) chuyên dụng;

Gấp bệnh phẩm vào rồi đặt khuôn nhựa (4.3.1) lên trên;

Để nguội, tách lấy khối parafin.

E.2 Cắt tiêu bản

Cắt gọt khối parafin cho bằng phẳng, đặt trên mặt máy làm lạnh (4.3.5);

Đặt khối parafin lên máy cắt tiêu bản (4.3.6) sao cho mặt khối parafin 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;

TCVN 8710-8:2023

Chọn lát cắt tiêu bản phẳng và lấy được hết các mô cần lấy, thả vào nồi dẫn tiêu bản (4.3.7) có nhiệt độ nước từ 35 °C đến 40 °C;

Dùng lam kính (4.3.10) vớt dán lát cắt, chuyển sang máy sấy mẫu (4.3.13) có nhiệt độ 40 °C trong 2 h đến 3 h.

E.3 Nhuộm tiêu bản Haematoxylin và Eosin

Tẩy parafin trong xylene (3.3.2) 2 lần (2 cốc), mỗi lần để từ 3 min đến 5 min;

Ngâm trong ethanol tuyệt đối (3.1.1) 2 lần (2 cốc), mỗi lần để từ 3 min đến 5 min;

Ngâm trong ethanol 90 % (3.1.1) để từ 3 min đến 5 min;

Ngâm trong ethanol 70 % (3.1.1) để từ 3 min đến 5 min;

Rửa dưới vòi nước chảy từ 3 min đến 5 min;

Ngâm trong thuốc nhuộm haematoxylin (3.3.3) từ 3 min đến 5 min;

Rửa dưới vòi nước chảy từ 3 min đến 5 min;

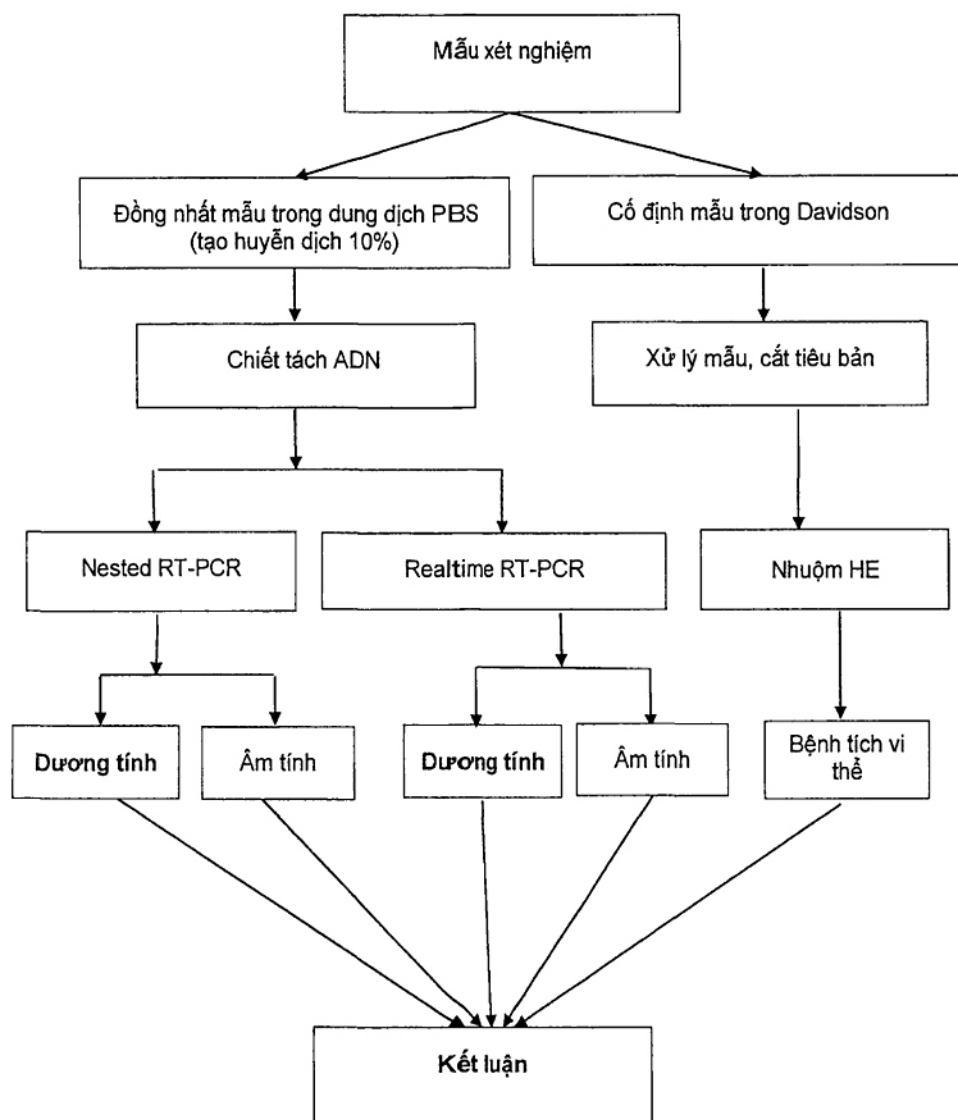
Ngâm trong thuốc nhuộm từ Eosin (3.3.4) từ 3 min đến 5 min;

Loại bỏ nước còn bám trên phiến kính bằng cách:

Nhúng qua ethanol 70 % (3.1.1) để từ 2 min đến 3 min; sau đó nhúng qua ethanol tuyệt đối (3.1.1) 3 lần (3 cốc), mỗi lần để từ 2 min đến 3 min; chuyển sang ngâm trong xylene (3.3.2) 2 lần (2 cốc), mỗi lần từ 2 min đến 3 min; Lau sạch xung quanh và gắn lamên (4.3.9) bằng keo dán.

Để khô tự nhiên và soi dưới kính hiển vi quang học (4.3.8).

Phụ lục F
(Quy định)
Sơ đồ xét nghiệm vi rút IMNV



Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Andrade T. P. D., Srisuvan T., Tang K. F. J. and Lightner D. V., 2007. Realtime reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). *Aquaculture*, 264, 9–15;
 - [2] Bonnie T Poulos et al. Dis Aquat Organ. 2006. Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR);
 - [3] OIE/WOAH, 2019 *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals*. Chapter 2.2.5. *Infection with infectious myonecrosis virus*
 - [4] Kathy F J Tang et al. Dis Aquat Organ. 2005. In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV);
 - [5] TCVN 8710-8: 2012 Bệnh thủy sản - Quy trình chẩn đoán Bệnh hoại tử cơ ở tôm (IMNV).
-