

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8710-14:2015

Xuất bản lần 1

**BỆNH THỦY SẢN - QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN -
PHẦN 14: HỘI CHỨNG LỖ LOÉT (EUS) Ở CÁ**

*Aquatic animal disease - Diagnostic procedure -
Part 14: Epizootic ulcerative syndrome-EUS in fish*

HÀ NỘI - 2015

Lời nói đầu

TCVN 8710-14:2015 được xây dựng trên cơ sở tham khảo OIE (2013), *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*, Chapter 2.3.2 *Epizootic ulcerative syndrome*;

TCVN 8710-14:2015 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 15 phần:

- 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 do 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*.

Bệnh thủy sản - Quy trình chẩn đoán - Phần 14: Hội chứng lở loét (EUS) ở cá

*Aquatic animal diseases - Diagnostic procedure -
Part 14: Epizootic ulcerative syndrome (EUS) in fish*

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 hội chứng lở loét do nấm *Aphanomyces invadans* (Syn. *Aphanomyces piscicida*) gây ra ở cá.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1

Hội chứng lở loét ở cá (Epizootic ulcerative syndrome) – EUS:

Hội chứng do nhiều tác nhân gây ra, trong đó nấm *Aphanomyces invadans* là tác nhân chính gây ra những đốm đỏ và vết loét trên thân cá bệnh.

CHÚ THÍCH: Sợi nấm có đường kính từ 12 đến 25 nm và có cấu trúc giống hệ sợi nấm không có vách ngăn. Loài nấm này có hai dạng bào tử động điển hình gồm: bào tử động chính và các bào tử động thứ cấp. Bào tử động chính bao gồm các tế bào hình tròn phát triển bên trong bọc bào tử. Các bào tử động chính tập trung ở trên đầu mút của bọc bào tử tạo thành một cụm bào tử và nhanh chóng chuyển thành các bào tử động thứ cấp, có thể bơi tự do trong nước.

3 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết để phân tích, sử dụng nước cất, nước khử khoáng hoặc nước tinh khiết, trừ các trường hợp 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 chẩn đoán bằng PCR.

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

3.2.2 Agarose.

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

3.2.4 Chất nhuộm màu, ví dụ: Sybr safe.

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

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

3.2.7 Thang chuẩn AND (Marker)

3.2.8 Nước tinh khiết, không có nuclease.

3.2.9 Kít nhân gen (PCR Master Mix Kit).

3.2.10 Kít tách chiết ADN (acid deoxyribo nucleic), protein K.

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

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

3.3.2 Xylen.

3.3.3 Thuốc nhuộm Haematoxylin (xem A.2).

3.3.4 Thuốc nhuộm Eosin (xem A.3).

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

3.3.6 Keo dán lamen.

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.

4.1.1 Máy nhân gen (PCR).

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

4.1.3 Máy lắc trộn vortex.

4.1.4 Máy spindown.

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

4.1.6 Máy đọc gel.

4.2 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp kiểm tra bệnh tích vi thể bằng parafin.

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

4.2.2 Máy xử lý mẫu mô tự động.

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

4.2.4 khay sắt, loại chuyên dụng cho làm tiêu bản vi thể.

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

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

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

4.2.8 Phiến kính, vô trùng.

4.2.9 Lamen, vô trùng.

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

5 Chẩn đoán lâm sàng

5.1 Đặc điểm dịch tễ

– Hội chứng lở loét ở cá (EUS) xảy ra phổ biến ở các loài cá nước ngọt, trên cả quần thể cá tự nhiên và cá nuôi;

TCVN 8710-14 : 2015

- Cá nhiễm nấm *A. invadans* thường ở giai đoạn tiền trưởng thành và trưởng thành;
- Tác nhân chính của bệnh là nấm *Aphanomyces invadans* (*A. piscicida*) có đường kính từ 12 nm đến 25 nm;
- *A. invadans* lây lan qua bào tử động trong môi trường nước. Các bào tử động xâm nhập và gắn vào da, bào tử nảy mầm trong điều kiện thích hợp và sợi nấm xâm nhập vào da cá, mô cơ gây ra các vết viêm trên da, mang, đuôi và các vết loét trên cơ;
- EUS xuất hiện trên các ao nuôi với tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong cao (> 50 %). Thường xuất hiện trong những năm có mùa lạnh dài, với nhiệt độ nước từ 18 °C đến 22 °C và thường xảy ra từ tháng 11 đến tháng 12.

5.2 Triệu chứng lâm sàng.

- Cá chán ăn, bỏ ăn và da cá trở lên sẫm màu hơn;
- Cá bệnh thường nổi gần bề mặt nước và trở lên linh hoạt hơn với kiểu di chuyển co giật;
- Cá bệnh xuất hiện các đốm màu đỏ trên bề mặt cơ thể, đầu, nắp mang hay cuống đuôi;
- Cá bệnh nặng thường xuất hiện các đốm đỏ lớn hoặc các vết loét nông màu xám với phần hoại tử màu nâu;

5.3 Bệnh tích.

- Cá bị bệnh nặng, các vết loét lõm sâu tới xương, làm phần cơ hai bên hoại tử và để lộ ra nội tạng bên trong. Tại các vết loét lớn, vùng trung tâm có màu xám, các mép xung quanh có màu đen;
- Những tổn thương bề mặt lớn thường xảy ra trên sườn và lưng cá;
- Ở một số loài cá nhạy cảm với bệnh, các tổn thương lan rộng có thể ăn mòn hết các phần sau của cơ thể cá hoặc hoại tử cả phần mô mềm và mô cứng của hộp sọ.

6 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

6.1 Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction).

6.1.1 Lấy mẫu.

- Thu mẫu cá có dấu hiệu bệnh lý, còn sống hoặc vừa mới chết.
- Bệnh phẩm: Cá nguyên con.
- Số lượng cá trên mỗi mẫu phụ thuộc vào kích cỡ của cá:

+ Cá giống: lấy từ 3 con/mẫu đến 5 con/mẫu

+ Cá trưởng thành, cá bố mẹ: lấy 1 con/mẫu.

– Lấy mẫu mỗi loại bệnh phẩm, cho vào từng lọ hay túi nilon vô trùng riêng biệt, đậy kín. thao tác lấy mẫu, dụng cụ đựng mẫu và tiếp xúc với mẫu phải đảm bảo vô trùng.

6.1.2 Bảo quản mẫu.

Trong quá trình vận chuyển, mẫu được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 6 °C không qua 24 h hoặc bảo quản 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).

6.1.3 Chuẩn bị mẫu.

Bệnh phẩm: cá nguyên con vô trùng bên ngoài bề mặt cá bằng etanol 70 % (thể tích) (3.1.1), dùng panh, kéo vô trùng lấy phần cơ bên cạnh hoặc bên dưới vết loét.

Lượng mẫu cần chuẩn bị: khoảng 30 mg.

6.1.4 Cách tiến hành.

6.1.4.1 Tách chiết ADN.

Sử dụng bộ kit tách chiết (3.2.10) 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 B).

6.1.4.2 Chuẩn bị môi.

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy nhân gen (4.1.1) theo phương pháp PCR khuếch đại đoạn gen đặc hiệu của *A. invadans* sử dụng cặp mồi ITS1-2F/ITSR1 (3.2.1). Trình tự cặp mồi được nêu trong bảng 1.

Bảng 1 : Trình tự cặp mồi

Mồi	Trình tự cặp mồi
ITS1-2F	5'-TCA-TTG-TGA-GTG-AAA-CGG-TG-3'
ITSR1	5'-GGC-TAA-GGT-TTC-AGT-ATG-TAG-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.

TCVN 8710-14 : 2015

Cặp mồi ITS1-2F/ITSR1 dùng để khuếch đại đoạn gen của nấm *A. invadans* có kích thước 234 bp

Mồi được chuẩn bị như sau:

Chuẩn bị mồi gốc:

- Mồi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.1.4) ở gia tốc 6 000g trong 30 s để mồi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Khi hoàn nguyên, nên dùng đệm TE (3.2.6) 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 (3.2.8) (10 μ l mồi gốc và 90 μ l nước).

6.1.4.3 Tiến hành phản ứng PCR.

Sử dụng cặp mồi đã chuẩn bị (6.1.4.2) sử dụng kit nhân gen (3.2.9) 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 1 phản ứng được nêu trong bảng 2

Bảng 2: Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích
Taq PCR Master Mix Kit	12,5 μ l
Mồi xuôi 20 μ M	1 μ l
Mồi ngược 20 μ M	1 μ l
Nước không có nuclease	8 μ l
Tổng thể tích	22,5 μ l

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

- Mẫu kiểm chứng dương: Cho 2,5 μ l mẫu ADN đã được giám định hoặc sử dụng các chủng *Aphanomyces invadans* chuẩn vào ống phản ứng;
- Mẫu kiểm chứng âm: Cho 2,5 μ l nước (3.2.8) vào 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.

- 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 và được nêu trong bảng 3.

Bảng 3 : Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
95 °C	2 min	1
94 °C	30 s	35
56 °C	45 s	
72 °C	2,5 min	
72 °C	5 min	1

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

6.1.4.4 Điện di.

6.1.4.4.1 Chuẩn bị bản gel.

Pha thạch với nồng độ agarose (3.2.2) từ 1,5 % đến 2 % bằng dung dịch đệm TBE 1X hoặc TAE 1X (3.2.3) 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 (3.2.4) 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 gel vào bể điện di (4.1.5), đổ dung dịch đệm (3.2.3) 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.

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.

6.1.4.4.2 Chạy điện di.

Hút 2 µl chất đệm tải mẫu (3.2.5) vào 8 µl sản phẩm PCR trộn đều và cho vào các giếng trên bản thạch.

Thực hiện điện di trong bộ điện di (4.1.5), chạy kèm theo thang chuẩn ADN (3.2.7) để dự đoán kích thước sản phẩm khuếch đại. Hút 10 µl thang chuẩn ADN (3.2.7) vào một giếng trên bản thạch.

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

6.1.4.5 Đọc kết quả.

Sau khi điện di, đọc kết quả trên máy đọc gel (4.1.6) theo bảng 4.

Bảng 4 : Kết quả điện di

Giếng	Sản phẩm có kích thước 234 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 EUS
	Không	Âm tính với EUS

Đánh giá kết quả:

- Kết quả mẫu thử dương tính khi: tại giếng mẫu thử xuất hiện vạch sáng có kích thước 234 bp. Thang chuẩn ADN phân vạch rõ ràng, mẫu kiểm chứng dương có kích thước 234 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 234 bp, mẫu kiểm chứng âm không có vạch sáng.

6.2 Phương pháp kiểm tra bệnh tích vi thể bằng phương pháp parafin.

6.2.1 Lấy mẫu.

Xem 6.1.1

6.2.2 Bảo quản mẫu.

Mẫu bệnh phẩm được đảm bảo ngập trong formalin (3.3.1), tránh đổ vỡ, rơi vãi formalin (3.3.1) ra ngoài môi trường; khi gửi mẫu đến phòng thí nghiệm, bao gói lọ chứa mẫu bằng túi nilon, miệng túi được dán kín. Trong phòng thí nghiệm, nếu chưa xét nghiệm ngay, mẫu phải được bổ sung hoặc thay mới formalin (3.3.1), đảm bảo thể tích mẫu bệnh phẩm và formalin (3.3.1) đạt tỷ lệ khoảng 1 : 10.

6.2.3 Chuẩn bị mẫu.

- Đối với cá giống cố định cả con;
- Đối với cá trưởng thành cố định bằng cách lấy cá sống cắt lấy phần da, mô cơ (< 1 cm³) xung quanh vết loét;
- Mẫu bệnh phẩm cố định trong formalin (3.3.1) từ 24 h đến 72 h tùy thuộc vào kích thước mẫu;

6.2.4 Cách tiến hành.

6.2.4.1 Đúc khuôn.

- Đặt khuôn nhựa (4.2.1) 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) lần thứ 2, thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc xylen (3.3.2) lần thứ 1, thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc xylen (3.3.2) lần thứ 2, thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc parafin (3.3.5) lần thứ 1, thời gian từ 2 h đến 3 h;
- Ngâm khuôn nhựa vào cốc parafin (3.3.5) lần thứ 2, thời gian từ 2 h đến 3 h;

CHÚ THÍCH: Nếu sử dụng máy xử lý mẫu mô tự động (4.2.2) thì tiến hành tiếp theo từ bước ngâm etanol.

- Đúc khuôn: rót parafin (3.3.5) nóng chảy từ nồi đun parafin (4.2.3) vào khay sắt (4.2.4), gấp bệnh phẩm từ khuôn nhựa đặt vào khay sắt (4.2.4), đặt khuôn nhựa (4.2.1) lên trên. Để nguội, tách lấy khối parafin.

6.2.4.2 Cắt tiêu bản.

- Cắt gọt khối parafin (6.2.4.1) cho bằng phẳng, đặt trên mặt máy làm lạnh tiêu bản (4.2.5);
- Đặt khối parafin lên máy cắt tiêu bản (4.2.6) sao cho mặt khối parafin song song với mép lưỡi dao cắt bỏ những lát đầu đến khi lát cắt có đủ các bệnh phẩm, điều chỉnh độ dày của lát cắt từ 3 μm đến 5 μm , cắt một vài lát;
- Chọn lát cắt phẳng thả vào nồi đun tiêu bản (4.2.7) với nhiệt độ nước từ 35 °C đến 40 °C.

Dùng phiến kính (4.2.8) vớt dán lát cắt. Dựng nghiêng tiêu bản và để khô.

6.2.4.3 Nhuộm tiêu bản

- Ngâm tiêu bản (6.2.4.2) vào cốc xylene (3.3.2) 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 (3.3.3), 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 (3.3.4), 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 (3.3.2) 2 lần, thời gian mỗi lần từ 2 min đến 3 min; gắn lamên (4.2.9) vào tiêu bản bằng keo dán lamên (3.3.6). Để khô, soi tiêu bản dưới kính hiển vi quang học (4.2.10).

6.2.5. Đọc kết quả.

Mẫu mô được soi dưới kính hiển vi quang học (4.2.10) cho thấy sự hiện diện của các khối u hình tròn màu trắng không bắt màu của H & E;

Giai đoạn sớm quan sát thấy sợi nấm tại vị trí hoại tử thể hiện ở những chấm đen nhỏ trên tiêu bản nhuộm. Dàn hình thành những u hạt nấm màu trắng.

7 Kết luận

Mẫu cá được xác định là nhiễm bệnh do *A. invadans* khi có đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích đặc trưng của bệnh và có kết quả dương tính một trong hai phương pháp sau:

- Phản ứng PCR phát hiện nấm *A. Invadans* dương tính.
- Mẫu cắt mô thể hiện những dấu hiệu bệnh tích vi thể đặc trưng cho hội chứng lở loét trên cá.

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 Thuốc nhuộm Hematoxylin (dung dịch Hematoxylin – Mayer)

A.2.1 Thành phần

Hematoxylin dạng tinh thể: 1 g

Natri iodat: 0,2 g

Amoni alum sulphate : 50 g
(hoặc Potassium alum sulphate)

Axit citric: 1 g

Chloral hydrate: 50 g

Nước: 1000 ml

A.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan Hematoxylin trong nước, sau đó cho natri iodat và Amoni alum sulphate hoặc kali nhôm sulfat, hoà tan, tiếp tục cho axit citric và chloral hydrate rồi lọc qua giấy lọc.

Bảo quản dung dịch đã pha trong chai tối màu.

A.3 Thuốc nhuộm Eosin

A.3.1 Thành phần

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

A.3.2 Chuẩn bị

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

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 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 (6.1.3) 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 (4.1.4);
- Ủ ấm ở 56 °C trong 10 min, sau đó ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.1.4);
- Thêm 200 µl etanol tuyệt đối (từ 96 % đến 100 %) (3.1.1) vào ống ly tâm;
- Trộn kỹ huyền dịch trong 15 s, sau đó ly tâm nhanh bằng máy spindown (4.1.4);
- 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 (4.1.2) 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 (4.1.2) 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 (4.1.2) 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 (4.1.2) với gia tốc 6 000 g trong 1 min;
- Chuyển ADN đã thu được sang ống 1,5 ml khác.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] AAHRI – J.H. Lilley, R.B. Callinan, S. Chinabut, S. Kanchanakhan, I.H. MacRae and M.J. Phillips. 2002. Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) Technical Handbook. The Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok.
- [2] D.A. Huchzermeyer, Benjamin C.W. van der Waal. 2012. Epizootic ulcerative syndrome. Exotic fish disease threatens Africa's aquatic ecosystems. *Journal of the South African Veterinary Association*, September 2012.
- [3] FAO and NACA – Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases, Fisheries technical paper 402/2, Page 52, 88.
- [4] Lilley J.H., Callinan R.B., Chinabut S., Kanchanakhan S., MacRae I.H. & Phillips M.J. (1998). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) technical handbook. Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand.
- [5] Đỗ Thị Hòa, Bùi Quang Tề, Nguyễn Hữu Dũng, Nguyễn Thị Muội. 2004. Bệnh học thủy sản NXB NN.
- [7] Phạm Minh Đức, Khoa Thủy sản, ĐH Cần Thơ. Hội chứng lở loét ở cá – Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS).