

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 8710-9 : 2012**

Xuất bản lần 1

**BỆNH THỦY SẢN – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –  
PHẦN 9: BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY Ở TÔM**

*Aquatic animal disease. Diagnostic procedure*

*Part 9: Necrotising hepatopancreatitis*

HÀ NỘI - 2012

**Lời nói đầu**

TCVN 8710-9:2012 do 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.

## Bệnh thủy sản – Quy trình chẩn đoán – Phần 9: Bệnh hoại tử gan tụy ở tôm

*Aquatic animal disease – Diagnostic procedure –  
Part 9: Necrotising hepatopancreatitis*

**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 gan tụy ở tôm.

### 2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

**Bệnh hoại tử gan tụy do vi khuẩn ở tôm (Necrotising hepatopancreatitis)**

NHP

Bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn  $\alpha$ -subclass - proteobacterium. Vi khuẩn có kích thước tương đối nhỏ, đa hình, gram âm, chỉ gây bệnh trong nội bào. Vi khuẩn gây bệnh NHP có hai hình dạng khác nhau về hình thái: một dạng là que nhỏ đa hình và không có tiên mao, dạng còn lại là que dài xoắn có 8 tiên mao trên đỉnh của vi khuẩn và một tiên mao phụ (đôi khi là hai) ở gờ của vùng xoắn.

**CHÚ THÍCH:** Vi khuẩn NHP là một giống mới trong nhóm vi khuẩn phân giải protein nhóm  $\alpha$  và có liên hệ mật thiết với vi khuẩn nội cộng sinh khác của động vật nguyên sinh. NHP cũng được biết đến với các tên gọi như bệnh gan tụy hoại tử Texas (TNHP), hội chứng chết trong ao Texas (TPMS) và bệnh gan tụy hoại tử Peru (PNHP).

### 3 Phương pháp chẩn đoán

#### 3.1 Chẩn đoán lâm sàng

##### 3.1.1 Dịch tễ học

NHP lần đầu tiên được mô tả ở Texas năm 1985. Các trận dịch khác cũng được ghi nhận ở cả bờ biển Thái Bình Dương và Đại Tây Dương, bao gồm Brazil, Costarica, Ecuador, Mexico, Panama, Peru và Venezuela. Năm 1999 và 2000, bệnh hoại tử gan đã xảy ra trên tôm sú (*Penaeus monodon*) nuôi thâm canh tại các tỉnh miền Trung Việt Nam.

NHP gây bệnh trên tôm *Penaeus vannamei* và *P. stylirostris* nhưng gây chết hàng loạt ở tôm *P. vannamei*, cũng tìm thấy NHP ở tôm *P. aztecus*, *P. californiensis* và *P. setiferus*.

Bệnh thường xảy ra khi nhiệt độ môi trường tăng cao (từ 29 °C tới 32 °C) và hàm lượng muối trong nước cao (từ 20 ppt tới 40 ppt), tỷ lệ chết có thể từ 90 % tới 95 % trong 30 ngày.

Bệnh lan truyền trực tiếp qua đường tiêu hóa từ những con tôm mang trùng, không lan truyền dọc từ tôm bố mẹ sang tôm con.

##### 3.1.2 Triệu chứng lâm sàng

Tôm nằm một chỗ, giảm sinh trưởng, không ăn, đường tiêu hóa trống rỗng, hệ số chuyển đổi thức ăn cao, tỷ lệ giữa trọng lượng và chiều dài nhỏ.

Lớp vỏ bị mềm, tôm bị mềm, mang bị đen hoặc sẫm màu, bề mặt cơ thể bám đầy các sinh vật cơ hội. Tôm bị hôn mê, lơ đãng, gan tụy hoại tử và có màu trắng nhạt khác biệt với màu nâu vàng bình thường, có các vệt sọc nâu đen trên mô gan tụy, gan tụy mềm, dễ nát vụn hay hóa lỏng, trung tâm gan chứa nước, xuất hiện những đốm trắng nhạt nhạt.

#### 3.2 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

##### 3.2.1 Phương pháp PCR

###### 3.2.1.1 Nguyên tắc

Phương pháp PCR dựa trên hoạt động của DNA polymerase tổng hợp nên mạch mới từ mạch khuôn, có sự tham gia của mỗi, bốn loại nucleotit gồm adenin (dATP), thymin (dTTP), guanin (dGTP), cytosin (dCTP), dùng để khuếch đại đoạn DNA đích thông qua các chu trình nhiệt. Để thực hiện phản ứng khuếch đại DNA đích gồm 3 quá trình: biến tính, bắt cặp và kéo dài mạch tổng hợp mạch DNA mới.

### 3.2.1.2 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và sử dụng nước cất hai lần đã khử ion hoặc nước có độ tinh khiết tương đương không có RNAase, trừ khi có quy định khác.

– Dung dịch đệm TE (Tris - EDTA)

Chuẩn bị dung dịch chứa Tris [tris (hydroxymetyl) aminometan] 10 mM và EDTA 1 mM, dùng axit clohydric (HCl) để chỉnh pH 7,6.

– Dung dịch EDTA (etylen diamin tetra axetic), 0,5 M

Hòa tan 93,05 g EDTA trong 350 ml nước, chỉnh pH 8,0 bằng dung dịch NaOH 4 M. Thêm nước cho đủ 500 ml. Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

– Dung dịch TBE 1X

Chuẩn bị dung dịch đệm TBE đậm đặc 10 lần (Tris - axit boric - EDTA 10X): Hòa tan 108 g Tris và 55 g axit boric trong 600 ml nước, thêm 40 ml EDTA 0,5 M và thêm nước đến 1 lít. Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Khi sử dụng, thêm 900 ml nước vào 100 ml dung dịch TBE gốc (10X) thành dung dịch 1X.

– Dung dịch đệm tải mẫu DNA đậm đặc 6 lần (loading dye 6X).

– Cồn 75 %.

– Cloroform.

– Bộ kit tách chiết DNA, ví dụ: NHP IQ 2000.

– Thang chuẩn DNA (DNA marker), gồm có các thang 100 bp; 200 bp; 300 bp; 400 bp; 500 bp; 1000 bp.

– Etidi bromua (EtBr).

**CẢNH BÁO AN TOÀN:** Etidi bromua là chất độc hại, tránh tiếp xúc và tránh hít phải hơi từ dung dịch còn nóng có chứa EtBr, sử dụng găng tay và mặc áo bảo hộ lao động trong suốt thời gian tiếp xúc với EtBr.

– Agarose.

### 3.2.1.3 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm chẩn đoán bệnh. Yêu cầu cơ bản là phòng thử nghiệm cần có các khu vực riêng biệt để thao tác tách chiết DNA, tiến hành phản ứng PCR và điện di, đọc kết quả.

## TCVN 8710-9:2012

- Tủ lạnh;
- Tủ lạnh âm sâu, có thể hoạt động ở nhiệt độ  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- Máy li tâm, có thể hoạt động với gia tốc 13 000 g.
- Tủ ấm, có thể hoạt động ở nhiệt độ  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Nồi cách thủy hay block nhiệt khô, có thể hoạt động ở nhiệt độ  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- Máy lắc tròn vortex;
- Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg;
- Đèn cồn;
- Micropipet đơn kênh có dải từ 0,5  $\mu\text{l}$  đến 10  $\mu\text{l}$ , từ 2  $\mu\text{l}$  đến 20  $\mu\text{l}$ , từ 10  $\mu\text{l}$  đến 100  $\mu\text{l}$ , từ 100  $\mu\text{l}$  đến 1 000  $\mu\text{l}$ ;
- Giá cho ống Eppendorf có kích thước 0,2 ml và 1,5 ml;
- Máy luân nhiệt (máy PCR);
- Bếp điện hoặc lò vi sóng;
- Ống đong, dung tích 100 ml; 500 ml; 1 000 ml;
- Bình nón bằng thủy tinh chịu nhiệt, dung tích 250 ml;
- Bộ điện di gồm bộ nguồn và máng chạy điện di;
- Buồng đổ gel;
- Bàn đọc gel (UV);
- Giấy parafin.

### 3.2.1.4 Lấy mẫu

Tôm bố mẹ: Lấy mẫu phân tôm bố mẹ.

Tôm giống (> postlarvae 8, hay hậu ấu trùng lớn hơn 8 ngày tuổi) đến tôm trưởng thành: lấy một phần khối gan tụy của từ 5 con đến 10 con.

Tôm nhỏ hơn tôm giống (nhỏ hơn postlarvae 8): lấy phần đầu của từ 10 con đến 15 con.

Ấu trùng biến thái: lấy cả con, khoảng 50 con.

Lượng mẫu lấy để tách chiết DNA khoảng 20 mg, có thể dùng tôm còn sống hoặc mẫu tôm, mẫu phân cố định trong etanol 95 % để tách chiết DNA.

### 3.2.1.5 Cách tiến hành

#### 3.2.1.5.1 Tách chiết DNA

**CHÚ THÍCH:** Hiện nay có nhiều thuốc thử và bộ kit thương mại tiện lợi cho việc tách chiết DNA (QiaGen, Promega, IQ,...). Người sử dụng có thể lựa chọn bộ kit thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví dụ về quy trình tách chiết DNA bằng dung dịch đệm DTAB-CTAB (kit IQ 2000):

Cho mẫu vào ống Eppendorf 1,5 ml, nếu mẫu cố định trong etanol 95 % cần làm khô etanol bằng cách đổ etanol và dốc ngược trên tờ giấy lọc, để khô tự nhiên.

Cho vào ống Eppendorf có chứa mẫu khoảng 100 µl đến 200 µl dung dịch tách chiết DTAB, nghiền nhỏ và mịn bằng chày nghiền, sau đó thêm vào khoảng 400 µl đến 500 µl dung dịch tách chiết DTAB và nghiền tiếp đến khi nhuyễn.

Ủ mẫu ở 75 °C trong 5 min, sau đó làm lạnh xuống nhiệt độ phòng.

Trộn đều bằng máy trộn vortex và làm lắng hỗn hợp trên, sau đó cho 700 µl cloroform, trộn đều trong 20 s và ly tâm ở 12 000 g trong 5 min.

Chuyển 200 µl phần trong phía trên sang ống Eppendorf 1,5 ml mới, thêm 100 µl dung dịch CTAB và 900 µl nước, trộn đều, sau đó ủ ở 75 °C trong 5 min.

Làm lạnh xuống nhiệt độ phòng và ly tâm ở 12 000 g trong 10 min. Gạn bỏ dịch nổi, hòa tan phần còn lại bằng 150 µl dung dịch hòa tan, ủ ở 75 °C trong 5 min, sau đó làm lạnh xuống nhiệt độ phòng.

Ly tâm ở 12 000 g trong 5 min. Chuyển dung dịch sạch sang ống Eppendorf 1,5 ml cùng 300 µl etanol 95 %.

Trộn đều, ly tâm ở 12 000 g trong 5 min, sau đó rửa viên cùng 200 µl etanol 75 %, làm lắng xuống, làm khô viên và hòa tan viên bằng nước hoặc đệm TE.

**CẢNH BÁO:** Tách chiết axit nucleic phụ thuộc vào việc phân giải hay hoà tan của các mô và sự phân tách của axit nucleic từ hỗn hợp kết cấu phức tạp. Hầu như các quy trình đều 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.

**3.2.1.5.2 Tiến hành phản ứng PCR****3.2.1.5.2.1 Cặp mồi ngoài sử dụng trong phản ứng PCR**

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy luân nhiệt theo phương pháp PCR, sử dụng cặp mồi Pf -1, Pr -1, xem Bảng 1.

**Bảng 1 – Trình tự về cặp mồi**

Mồi	Trình tự nucleotit
Pf - 1	5'-ACG-TTG-GAG-GTT-CGT-CCT-TCA-g-3'
Pr - 1	5-TCA CCC CCT TGC TTC TCA TTG T-30

Cặp mồi Pf -1/Pr -1 dùng để khuếch đại đoạn DNA của vi khuẩn NHP có kích thước 441 bp.

Chuẩn bị mồi:

- Mồi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm ngắn để mồi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Lần đầu tiên nên dùng đệm TE để hoàn nguyên mồi ở nồng độ 200 pmol/μl làm gốc.
- Mồi được sử dụng ở nồng độ 20 pmol/μl: pha loãng mồi gốc bằng nước không có nuclease hoặc đệm TE (10 μl mỗi gốc và 90 μl nước).

**3.2.1.5.2.2 Chuẩn bị phản ứng**

Tùy theo điều kiện phòng thử nghiệm, chọn lựa hỗn hợp Mix phản ứng cho phù hợp và sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị trong 1 ống Eppendorf dựa trên tổng số mẫu cần chẩn đoán, cộng thêm một mẫu đối chứng dương và một mẫu đối chứng âm. Sau đó hút 22,5μl hỗn hợp phản ứng vào ống Eppendorf 0,2 ml; ghi kí hiệu mẫu lên nắp ống Eppendorf, chứng dương và chứng âm.

**3.2.1.5.2.3 Tiến hành phản ứng PCR**

Thêm 2,5 μl DNA mạch khuôn (tách chiết được) vào ống PCR chứa sẵn 22,5 μl hỗn hợp phản ứng PCR (thành phần gồm: Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, deoxynucleotide 200 mM, nồng độ 0,5 μM mỗi mồi Pf -1 và Pr -1, nước cho đủ thể tích) để được hỗn hợp PCR với tổng thể tích 25 μl.

Có thể sử dụng thành phần thuốc thử riêng lẻ hay sử dụng hỗn hợp phản ứng thương mại sao cho đảm bảo nồng độ cuối cùng của các thành phần như trên, ví dụ sử dụng hỗn hợp phản ứng Go Taq Green Master Mix của Promega, 2X có thành phần 2X green Go Taq Reaction Buffer (pH 8,5); dATP 400 μM; dGTP 400 μM; dTTP 400 μM; dCTP 400 μM; MgCl<sub>2</sub> 3 mM; Taq DNA polymerase và chất đệm tải mẫu (yellow dye và blue dye) nên khi chạy gel không cần thêm chất đệm tải mẫu (loading dye).



Ví dụ về hỗn hợp phản ứng PCR sử dụng hỗn hợp phản ứng Go Taq Green Master Mix của Promega, 2X như trong Bảng 2.

**Bảng 2 – Hỗn hợp phản ứng PCR**

Thành phần	Thể tích cho 1 mẫu, $\mu\text{l}$	Nồng độ cuối cùng
Promega GoTag Green Master Mix, 2X	12,5	1 X
Pf -1 mỗi	0,625 (20 $\mu\text{M}$ )	0,5 $\mu\text{M}$
Pr -1 mỗi	0,625 (20 $\mu\text{M}$ )	0,5 $\mu\text{M}$
DNA mạch khuôn	2,5	
Nước	8,75	

Sau khi pha hỗn hợp cho mỗi phản ứng đặt vào máy luân nhiệt.

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR được nêu trong Bảng 3.

**Bảng 3 – Chu trình nhiệt của phản ứng PCR**

Bước	Nhiệt độ/thời gian	Số chu kỳ
Biến tính	94 °C/30 s	35
Bắt cặp	58 °C/30 s	
Kéo dài mạch	72 °C/1 min	
Kéo dài mạch	72 °C/5 min	1
Giữ ổn định	4 °C	

**CHÚ Ý:** Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

### 3.2.1.5.3 Chạy điện di

#### 3.2.1.5.3.1 Chuẩn bị bản gel

Pha thạch với nồng độ agarose từ 1,5 % đến 2 % bằng dung dịch đệm TBE 1X hoặc TAE 1X vào bình nón 250 ml, lắc cho tan.

Sau đó cho vào lò vi sóng đun đến sôi, khi nhiệt độ giảm xuống khoảng 40 °C đến 50 °C thì cho vào 5  $\mu\text{l}$  etidi bromua vào mỗi 100 ml. Lắc nhẹ tránh tạo bọt để etidi bromua tan đều.

Chuẩn bị khuôn đổ thạch, đặt lược vào khuôn, rồi đổ thạch vào khuôn.

## TCVN 8710-9:2012

Tiến hành đổ vào bản gel, không nên đổ bản gel dày quá 0,8 cm.

Khi bản gel đông lại thì tiến hành gỡ lược khỏi bản gel.

Chuyển bản gel vào máng điện di, đổ dung dịch đệm (TBE 1X hoặc TAE 1X) cùng loại với dung dịch agarose đã đun) vào máng điện di cho tới khi ngập bản gel.

### 3.2.1.5.3.2 Điện di

Hút 10 µl sản phẩm PCR nhỏ vào một giếng trên bản gel.

Khi thực hiện điện di, chạy kèm theo DNA marker để dự đoán kích thước sản phẩm khuếch đại. Hút 10 µl thang DNA vào một giếng trên bản gel.

Điện di ở hiệu điện thế 100 V đến 150 V (quan sát thấy bóng khí nổi lên từ hai phía điện cực của máy điện di sau khi nối điện). Khi quan sát thấy màu xanh đậm của thuốc nhuộm cách giếng khoảng 2/3 chiều dài băng thạch agarose, dừng quá trình điện di.

**CHÚ Ý:** Trong trường hợp Master Mix không có sẵn đệm tải mẫu thì khi tiến hành điện di nhỏ 2 µl đệm tải mẫu 6X lên giấy parafin, hút 10 µl sản phẩm PCR ra, nhỏ vào và trộn đều, sau đó lấy khoảng 10 µl nhỏ vào một giếng trên bản gel.

### 3.2.1.5.4 Đọc kết quả

Sau khi điện di xong, đọc kết quả trên bàn đọc UV, đọc kết quả với tia UV bước sóng 302 nm.

Đối chiếu các vạch sáng của mẫu với các vạch sáng từ thang DNA, mẫu đối chứng dương tính và mẫu đối chứng âm tính để đưa ra kết luận.

**Bảng 4 – Kết quả điện di**

Giếng	Vạch 441 bp	Kết quả
Thang DNA	Phân vạch rõ ràng và sáng theo kích thước sử dụng	Điện di tốt
Mẫu đối chứng dương tính	Có	Hỗn hợp phản ứng PCR tốt
	Không	Mẫu đối chứng dương tính hỏng, enzym hỏng
Mẫu đối chứng âm tính	Không	Không ngoại nhiễm
	Có	Bị ngoại nhiễm
Mẫu	Có	Dương tính NHP
	Không	Âm tính với NHP

Kết quả mẫu thử dương tính khi: Xuất hiện vạch sáng có kích thước bằng kích thước giếng mẫu đối chứng dương có kích thước 441bp. Thang DNA phân vạch rõ ràng, mẫu đối chứng âm không có vạch sáng.

Kết quả mẫu thử âm tính khi: Không có vạch sáng kích thước 441bp. Không có vạch sáng của mẫu đối chứng âm tính, thang DNA phân vạch rõ ràng.

### 3.2.2 Phương pháp mô học

#### 3.2.2.1 Thuốc thử và vật liệu thử

- Dung dịch Davidson (xem A.1).
- Thuốc nhuộm hematoxylin (xem A.2).
- Thuốc nhuộm eosin (xem A.3).
- Xylen.
- Cloroform.
- Axit picric (dung dịch bão hoà).
- Etanol 70 %, 90 % và etanol tuyệt đối.
- Parafin.
- Keo dán, ví dụ Bom Canada.
- Dinatri hydro phosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ );
- Natri hydro phosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ );

#### 3.2.2.2 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm chẩn đoán bệnh và cụ thể như sau:

- Kính giải phẫu
- Bộ đồ giải phẫu gồm các dụng cụ panh, rùi nhọn, giải phẫu kéo các loại, lam kính và lamén
- Lọ nhỏ có định mẫu
- Bình rót parafin
- Bộ phận làm lạnh mẫu

## **TCVN 8710-9:2012**

- Máy cắt mẫu microtome
- Nồi nước có chỉnh nhiệt độ
- Tủ ẩm hoặc bàn sấy mẫu
- Kính hiển vi quang học
- Cassete
- Khung đúc mẫu.

### **3.2.2.3 Lấy mẫu**

Thu những mẫu tôm có dấu hiệu không bình thường, cơ thể yếu, bơi lội lờ đờ, biếng ăn và ruột rỗng, giảm sức tăng trưởng rõ rệt, tỷ lệ trọng lượng, chiều dài thân thấp (mỏng đuôi).

Tôm có vỏ mềm và cơ thể nhũn; mang đen hoặc sẫm màu; bị nhiều vi sinh vật cơ hội bám trên mặt vỏ; vỏ bị nhiễm vi khuẩn, bao gồm các tổn thương loét lớp cutin hoặc phần phụ bị ăn mòn hóa đen; bị phồng rộp các tế bào sắc tố dẫn đến sự xuất hiện các rìa sẫm màu ở các nang đuôi và chân bụng. Khối gan tụy có thể bị teo.

Không dùng tôm chết hoặc tôm bảo quản đá để cắt mô.

### **3.2.2.4 Cách tiến hành**

#### **3.2.2.4.1 Chuẩn bị mẫu**

Cố định mẫu trong dung dịch Davidson. Đối với ấu trùng hoặc tôm Postlarvae có thể cố định cả con trong dung dịch Davidson từ 12 h đến 24 h. Số tôm thu từ 30 con đến 50 con mỗi bể. Sau đó cố định trong etanol 70 % ở nhiệt độ phòng.

Đối với tôm lớn cố định bằng cách lấy tôm sống cắt giữa phần đầu ngực và bụng, giữ phần đầu ngực lại (trong đó có chứa gan tụy), dùng thuốc Davidson tiêm vào gan tụy và vùng xung quanh gan tụy. Lượng thuốc dùng từ 0,1 ml đến 10 ml (thay đổi tùy kích thước tôm), sau đó cho vào lọ có chứa dung dịch Davidson. Số tôm thu từ 5 con đến 10 con một ao. Nếu mẫu lớn cần phải cắt nhỏ, chiều dài mẫu không quá 3 cm. Tỷ lệ mẫu và dung dịch cố định là 1/10, ngâm trong 24 h đến 72 h phụ thuộc vào kích thước của mẫu, sau đó bảo quản ngay trong etanol 70 % ở nhiệt độ phòng.

#### **3.2.2.4.2 Khử mẫu cố định**

Ngâm trong etanol 90 % hai lần, trong thời gian 30 min đến 60 min mỗi lần. Sau đó ngâm trong etanol tuyệt đối hai lần, thời gian 30 min đến 60 min mỗi lần.

**3.2.2.4.3 Làm trong mẫu**

Ngâm sang lọ xylen 1, để trong 30 min đến 60 min.

Ngâm sang lọ xylen 2, để trong 30 min đến 60 min.

Sau đó ngâm tấm parafin hai lần, mỗi lần 56 °C đến 58 °C trong 1 h.

Đúc khuôn: đặt mẫu đã thấm parafin vào khuôn đổ parafin tập trung vào một mặt của khuôn để khi cắt được tốt hơn. Làm lạnh mẫu trong bàn lạnh hoặc để trong tủ lạnh.

**3.2.2.4.4 Cắt mẫu**

Cắt gọt khối block parafin vuông, mặt cắt bằng phẳng, để trên mặt khay đá.

Đặt mặt khối block parafin song song với mép lưỡi dao, cắt chiều dày lát cắt từ 4 µm đến 5 µm.

Chọn lát cắt tiêu bản phẳng thả vào nồi nước nhiệt độ nước 30 °C đến 35 °C; sau đó dùng lam kính vớt lát cắt tiêu bản. Để khô.

**3.2.2.4.5 Nhuộm tiêu bản H&E**

Tẩy parafin bằng cách ngâm trong xylen hai lần, mỗi lần từ 3 min đến 5 min, sau đó ngâm lần lượt trong etanol tuyệt đối, etanol 90 % và etanol 70 %, mỗi lần ngâm từ 3 min đến 5 min rồi đem rửa dưới vòi nước chảy từ 3 min đến 5 min.

Ngâm trong thuốc nhuộm haematoxylin từ 3 min đến 5 min sau đó rửa dưới vòi chảy từ 3 min đến 5 min rồi tiếp tục ngâm trong thuốc nhuộm eosin từ 1 min đến 2 min.

Làm mất nước trong mẫu qua các thang nồng độ etanol 75 %, etanol 90 % và etanol tuyệt đối, mỗi bước từ 1 min đến 2 min, chuyển sang xylen hai lần (mỗi lần từ 2 min đến 3 min), gắn lamên bằng keo dán, ví dụ Bom Canada. Để khô và soi kính.

**3.2.2.4.6 Đọc kết quả**

Soi kính hiển vi từ vật kính có độ phóng đại thấp đến vật kính có độ phóng đại cao (100 X, 400 X, 1 000 X).

Mô học gan tụy của tôm bị bệnh hoại tử gan tụy thể hiện đặc điểm bệnh lý sau: Các vùng mô gan tụy bị hoại tử, bắt màu đồng đều của thuốc nhuộm, hoàn toàn không còn nhìn thấy cấu trúc tế bào và mô gan tụy đồng thời xuất hiện dày đặc những tế bào máu bao vây xung quanh những vùng bị hoại tử. Trên lát cắt mô học gan tụy với thuốc nhuộm haematoxylin và eosin cho thấy dấu hiệu của sự viêm teo từ trung bình tới rất nặng của ống gan tụy. Các tế bào biểu mô gan tụy khi bị viêm teo hoại tử chuyển từ hình trụ tròn sang hình khối, hoặc có thể bị phình to và chứa một số lớn vi khuẩn tự do giống với rickettsia, gram âm nằm trong nguyên sinh chất của các tế bào.

## **TCVN 8710-9:2012**

Ở tôm *P. vannamei* giai đoạn ấu niên bị nhiễm bệnh NHP nặng, mãn tính biểu mô tuyến gan tụy bị teo rõ rệt, dẫn đến phù thũng nặng (dịch tràn hoặc các khu vực có nước trong gan tụy).

Độ phóng đại 10000X tôm bị bệnh trong tế bào chất có nhiều vi khuẩn bệnh NHP dạng hình que và hình xoắn.

### **4 Báo cáo kết quả chẩn đoán**

Tôm được xác định nhiễm bệnh NHP khi có đặc điểm dịch tễ, triệu chứng lâm sàng của bệnh và dương tính một trong hai phương pháp sau:

- Kết quả phản ứng PCR dương tính;
- Mẫu cắt mô có bệnh tích của NHP.

**Phụ lục A**  
(Quy định)

**Thành phần và chuẩn bị dung dịch thuốc thử**

**A.1 Dung dịch Davidson**

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

**A.2 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:	1 000 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 cloral hydrat rồi lọc qua giấy lọc.

Bảo quản dung dịch đã pha trong chai tối màu.

**A.3 Thuốc nhuộm eosin**

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

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

Bảo quản dung dịch đã pha trong chai tối màu.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] Bacterial disease of shrimp C.10 Necrotising Hepatopancreatitis (NHP). *Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases*.207 – 210
  - [2] Boris Briñez, Fernando Aranguren, Marcela Salazar (2003) Fecal samples as a DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. *Dis Aquat Org Vol. 55*: 69 – 72
  - [3] Diseases of crustaceans, Bacterial diseases - Necrotising hepatopancreatitis. Sourced from AGDAFF–NACA (2007). *Aquatic Animal Diseases Significant to Asia-Pacific*
  - [4] Đỗ Thị Hòa, Bùi Quang Tề, Nguyễn Hữu Dũng, Nguyễn Thị Muội. *Bệnh học thủy sản*. 2004. 232-235.
  - [5] Loy JK, Frelier P, Varner P, Templeton JW (1996) Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org Vol 25*:117 – 122
  - [6] Frelier PF, Sis RF, Bell TA, Lewis DH(1992) Microscopic and ultrastructural features of necrotizing hepatopancreatitis in Texas cultured shrimp (*penaeus vannamei*). *Vet Pathol 29*: 269 - 277
-