

## BỆNH TRẮNG ĐUÔI (WHITE TAIL DISEASE)

### 1. Phạm vi

Bệnh trắng đuôi (WTD) hay bệnh trắng cơ thịt (white muscle disease – WMD) được định nghĩa là bệnh do virus, do *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) và có liên quan đến virus siêu nhỏ (extra small virus – XSV). Chúng gây ra dạng trắng sữa trong ấu trùng (larvae)/sau ấu trùng (post larvae)/thiếu trùng (juvenile) giai đoạn đầu, và gây ra các tỷ lệ tử vong lớn trong tôm càng (prawn) nước ngọt *M. rosenbergii*.

### 2. Thông tin về bệnh

#### 2.1. Các yếu tố thuộc về tác nhân gây bệnh

##### 2.1.1. Tác nhân sinh bệnh học, các dòng tác nhân gây bệnh

Các tác nhân sinh bệnh học là hai virus gây bệnh, tên là *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) (chủ yếu) và virus siêu nhỏ (XSV) (kèm theo) (10, 12). MrNV là quan trọng trong các ổ dịch WTD ở tôm càng, tuy nhiên vai trò của XSV trong khả năng gây bệnh vẫn còn chưa rõ. Các dòng hiện nay chưa được rõ. MrNV thuộc về họ Nodaviridae (3, 23). XSV là virus vệ tinh đầu tiên trong động vật và cũng được ghi nhận đầu tiên về một vệ tinh có liên quan đến nodavirus (3).

##### 2.1.2. Sống sót bên ngoài ký chủ

Chưa biết rõ sự sống sót bên ngoài ký chủ, tuy nhiên chất liệu cấy chứa virus chuẩn bị từ mô nghiền nhuyễn được bảo quản ở -20°C gây ra tỷ lệ tử vong 100% ở *M. rosenbergii* bằng cách thử thách ngâm ngập (10, 13).

##### 2.1.3. Tính bền bỉ của tác nhân gây bệnh (các phương pháp làm bất hoạt có hiệu quả)

Chưa biết rõ tính bền bỉ của tác nhân gây bệnh. Tuy nhiên, xử lý nhiệt phá hủy khả năng gây nhiễm của MrNV và XSV trong các thực nghiệm thử thách (10).

##### 2.1.4. Vòng đời

Không biết.

#### 2.2. Các yếu tố thuộc về ký chủ

WTD chịu trách nhiệm cho các tỷ lệ tử vong to lớn trong ấu trùng và sau ấu trùng của tôm càng nước ngọt *M. rosenbergii* trong các cơ sở ấp nở mà dẫn đến tổn thất kinh tế trong các hệ thống nuôi ương.

##### 2.2.1. Các loài ký chủ có miễn cảm

Tôm càng lớn (giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [DeMan, 1879]). Chưa biết các ký chủ khác có nghi ngờ hay chứng minh được.

##### 2.2.2. Các giai đoạn miễn cảm của ký chủ

Ấu trùng, sau ấu trùng, thiếu trùng giai đoạn đầu đều có miễn cảm, trong khi trưởng thành có đề kháng và đóng vai trò là mang trùng (10, 13).

### **2.2.3. Các loài hay các tiểu quần thể có xu hướng bị nhiễm (có khả năng cho phát hiện)**

Không quan sát thấy có tỷ lệ tử vong ở cả trong tự nhiên lẫn thực nghiệm gây nhiễm (*MtNV/XSV*) cho tôm càng cận trưởng thành và trưởng thành. Các nghiên cứu thực nghiệm xác nhận có truyền lây dọc từ tôm giống bị nhiễm đến sau ấu trùng (18).

### **2.2.4. Các cơ quan mục tiêu và mô bị nhiễm**

*MtNV* và *XSV* giới hạn ở mô mang, cơ đầu, tim, cơ bụng, buồng trứng, các chân bơi (pleopod) và cơ đuôi, nhưng không nhiễm vào gay tụy hay eyestalk (13, 16). Sự hiện diện của cả hai virus trong mô buồng trứng cho thấy khả năng truyền lây dọc của WTD từ tôm giống sang ấu trùng và sau ấu trùng. Các thực nghiệm đã chứng minh rằng các chân bơi sẽ là nguồn tiện dụng cho theo dõi RNA trong theo dõi không gây chết đối với *MtNV* và *XSV* mà không gây stress cho tôm càng (13).

### **2.2.5. Bệnh nhiễm dai dẳng với mang trùng suốt đời**

Các thực nghiệm thử thách cho thấy bệnh nhiễm kéo dài dai dẳng trong tôm trưởng thành và cũng có khả năng truyền lây WTD từ tôm giống sang ấu trùng và sau ấu trùng (13, 18).

### **2.2.6. Các trung gian truyền lây (vectors)**

Tôm penaeid (*Penaeus indicus*, *P. monodon*, *P. japonicus*) (20), *Artemia* (22), và các côn trùng thủy sinh (*Belostoma* sp., *Aesohna* sp., *Cybister* sp., và *Notonecta* sp.) đều là các trung gian truyền lây của WTD (17).

### **2.2.7. Các động vật thủy sinh hoang dã được biết hay nghi ngờ mang trùng**

Không biết.

## **2.3. Mô hình bệnh**

Lưu hành cao của bệnh nhiễm WTD đã được báo cáo trong ấu trùng ấp nở - ương và sau ấu trùng của *M. rosenbergii*. WTD có thể truyền lây cả theo đường dọc và ngang trong các hệ thống nuôi tôm.

### **2.3.1. Các cơ chế truyền lây**

Truyền lây dọc (qua trứng) và truyền lây ngang qua đường nước (10, 13, 18).

### **2.3.2. Lưu hành**

Lưu hành bệnh biến thiên từ 10% đến 100% trong các hệ thống ấp nở, nuôi ương và nuôi lớn, cũng như trong thực nghiệm gây nhiễm, bằng thử thách ngâm ngập, và đã có báo cáo tỷ lệ tử vong 100% vào 5 – 7 ngày sau khi xuất hiện các dấu hiệu đại thể đầu tiên trong tự nhiên hay gây nhiễm thực nghiệm (1, 10, 13, 14).

### **2.3.3. Phân bố địa lý**

Bệnh đã được báo cáo đầu tiên ở Tây Ấn Độ thuộc Pháp (French West Indies; 1), sau đó là Trung Quốc (10), Ấn Độ (14), Đài Loan (24) và Thái Lan (25).

### **2.3.4. Tỷ lệ tử vong và tỷ lệ mắc bệnh**

Ấu trùng, sau ấu trùng và thiếu trùng của *M. rosenbergii* có miễn cảm cao với WTD, thường gây ra các tỷ lệ tử vong cao trong các giai đoạn sống này. Tỷ lệ tử vong có thể đạt đến tối đa trong khoảng 5 hay 6 ngày sau khi xuất hiện các dấu hiệu đại thể đầu tiên. Rất ít sau ấu trùng sống sót

được với WTD sau 15 ngày trong một ổ dịch, và sau ấu trùng sống sót được có thể phát triển đến kích thước thương mại giống như mọi sau ấu trùng bình thường khác.

Ấu trùng, sau ấu trùng và thiếu trùng của *M. rosenbergii* có miễn cảm cao với WTD, thường gây tỷ lệ tử vong cao trong giai đoạn sống này. Tỷ lệ tử vong có thể đạt đến tối đa trong khoảng 5 đến 6 ngày sau khi xuất hiện các dấu hiệu đại thể. Rất ít sau ấu trùng bị WTD sống sót được sau 15 ngày trong một ổ dịch, và sau ấu trùng sống sót được có thể phát triển đến kích thước thương mại giống như các sau ấu trùng bình thường. Các tôm trưởng thành có đề kháng với WTD, nhưng đóng vai trò là các mang trùng (10, 13).

### **2.3.5. Các yếu tố môi trường**

Không biết được nhiều về các yếu tố môi trường. Tuy nhiên, các ổ dịch WTD có thể xảy ra bởi các thay đổi nhanh chóng về độ mặn, nhiệt độ và pH (1, 10).

## **2.4. Kiểm soát và phòng ngừa**

Không có nghiên cứu nào được tiến hành trong kiểm soát và phòng ngừa WTD. Tuy nhiên, các biện pháp phòng ngừa thích hợp, như theo dõi đàn giống và sau ấu trùng, và các thực hành quản lý tốt có thể giúp ngăn ngừa WTD trong các hệ thống chăn nuôi. Do vòng đời của *M. rosenbergii* là hoàn toàn đặt dưới các điều kiện được kiểm soát, đàn giống sạch bệnh (specific pathogen free – SPF) và sau ấu trùng sạch bệnh có thể tạo ra được bằng cách theo dõi với các phương pháp chẩn đoán như áp dụng phản ứng chuỗi phân tử sử dụng enzyme giải mã đảo ngược (reverse-transcription polymerase chain reaction – RT-PCR) và xét nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzyme (enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA) (12, 16, 26).

### **2.4.1. Sử dụng vaccin**

Hiện không có vaccin.

### **2.4.2. Hóa trị liệu**

Không có tác nhân hóa trị liệu nào được báo cáo đối với WTD.

### **2.4.3. Kích thích tạo miễn dịch**

Không có báo cáo nào hiện nay về kích thích tạo miễn dịch đối với WTD.

### **2.4.4. Giống đề kháng**

Không có báo cáo.

### **2.4.5. Tái đàn với các loài có đề kháng**

Không có báo cáo về có mặt các loài có đề kháng.

### **2.4.6. Các tác nhân ngăn chặn (blocking agents)**

Không biết.

### **2.4.7. Sát trùng trứng và ấu trùng**

Các phương pháp thủ tục được tuân thủ đối với kiểm soát bệnh do virus ở loài giáp xác đã được chỉ định. Thí dụ, sử dụng formalin hay iodophor để giúp tiêu diệt virus (4).

### **2.4.8. Các thực hành chăn nuôi thông thường**

Thực nghiệm gây nhiễm xác nhận khả năng truyền lây ngang và truyền lây dọc của WTD trong các hệ thống chăn nuôi (10, 13, 18). Các thực hành chăn nuôi tốt, như sát trùng đảm bảo cho các bồn nuôi, nguồn nước và đàn giống, và sử dụng đàn giống có RT-PCR âm tính trong các hồ ấp nở - nuôi lớn, có thể giúp ngăn ngừa WTD trong các hệ thống chăn nuôi (4, 16, 17). Ở đây không có bằng chứng ngăn ngừa WTD bằng quay vòng vụ mùa (crop rotation) cả với trồng lúa hay chăn nuôi đa dạng với cá. Một số trang trại đã quan tâm đến hoặc là chăn nuôi trộn chung tôm (*P. monodon*) với *M. rosenbergii* hay quay vòng vụ mùa với hai loài này như là chọn lựa thực tế cho nuôi dưỡng và khả năng kinh tế. Tình trạng này tạo nên khả năng truyền lây các vi sinh vật gây bệnh nặng nề từ các ký chủ tự nhiên sang các ký chủ không tự nhiên, như quan sát của Sudhakaran và cộng sự (20) và Ravi và cộng sự (11) trong các nghiên cứu của họ. Dựa vào các kết quả của họ, cho thấy rằng cần ngăn cấm việc nuôi trộn chung *M. rosenbergii* với *P. monodon* trước khi ban hành mọi biện pháp ngăn ngừa trong quản lý đối với WTD.

### **3. Lấy mẫu**

#### **3.1. Chọn lựa các cá thể lấy mẫu**

WTD của tôm càng nước ngọt chủ yếu được chẩn đoán do biến màu trắng ở cơ bụng và cơ đuôi (1, 12, 14). Tuy nhiên, dấu hiệu lâm sàng này không đặc hiệu đối với WTD và các chẩn đoán là không dễ dàng, đặc biệt là trong các giai đoạn sớm của bệnh nhiễm. Sau ấu trùng bị nhiễm WTD thường có màu trắng sữa và mờ đục hơn. Một khi các dấu hiệu lâm sàng đã xuất hiện, thường có kèm theo tử vong; các tỷ lệ tử vong thường biến thiên và đạt đến 95%. Các mô thường bị nhiễm nhất trong sau ấu trùng/thiếu trùng giai đoạn đầu đang hấp hối là các cơ vân của vùng bụng, vùng đầu ngực và đuôi. Các sau ấu trùng với cơ trắng là thích hợp cho các mục đích chẩn đoán (13).

#### **3.2. Bảo quản các mẫu để gửi đi**

Ấu trùng/sau ấu trùng bị nhiễm với các dấu hiệu rõ ràng về trắng cơ thịt trong vùng bụng được thu thập từ các vùng có dịch. Các mẫu được rửa trong nước muối vô trùng, được chuyển vào các ống vô trùng, chuyển đến phòng thí nghiệm trong nước đá khô và được bảo quản ở -70°C cho đến khi sử dụng (14, 16, 26). Các mẫu đông lạnh có thể được sử dụng cho phân lập virus và phát hiện bằng RT-PCR hay ELISA (12). Các mẫu cho phát hiện virus bằng RT-PCR có thể được chuyển đến phòng thí nghiệm sau khi cố định trong 70% ethanol (14, 16, 26). Cũng xem Chương 2.2.0.

#### **3.3. Gom chung các mẫu**

Ấu trùng hay sau ấu trùng bị nhiễm (từ 5 đến 10 con) có thể được gom chung cho các xét nghiệm theo dõi. Cũng xem Chương 2.2.0.

#### **3.4. Các cơ quan và mô tốt nhất**

Thích hợp là nguyên xác của sau ấu trùng (14, 16, 26). Tất cả các cơ quan, ngoại trừ eyestalk và gan tụy, của *M. rosenbergii* trưởng thành đều tốt cho theo dõi virus bằng RT-PCR. Chân bơi (pleopod) sẽ là nguồn tiện lợi cho theo dõi RNA của *MNV* và *XSV* mà không làm chết và không gây stress cho tôm giống (13).

#### **3.5. Các mẫu/mô không thích hợp**

Eyestalk và gan tụy (hepatopancreas) của tôm càng trưởng thành thì không thích hợp (13, 16).

### **4. Các phương pháp chẩn đoán**

#### **4.1. Các phương pháp chẩn đoán ở thực địa**

##### **4.1.1. Các dấu hiệu lâm sàng**

Sau ấu trùng bị nhiễm trở nên mờ đục và phát triển thể hiện màu trắng, đặc biệt trong vùng bụng. Sự biến màu trắng xảy ra trước ở đốt bụng thứ nhì hoặc thứ ba, và dần dần lan đến cả phía trước lẫn phía sau. Trong các trường hợp nặng nề, sự thoái hóa của **telson và chân tiết niệu (uropod)** có thể xảy ra. Tỷ lệ tử vong có thể đạt đến tối đa trong khoảng 5 ngày sau khi xuất hiện các dấu hiệu đại thể đầu tiên.

#### 4.1.2. Các thay đổi tập tính

Các sau ấu trùng có mẫn cảm cao đối với WTD và tỷ lệ tử vong đạt đến tối đa trong khoảng 5 ngày sau khi xuất hiện biến màu trắng. Vỏ xác nổi lên (lột xác) trong bồn thể hiện bất thường và giống như “vảy mica” (1). Sau ấu trùng bị nhiễm thể hiện yếu ớt dần về khả năng ăn và bơi lội (13).

### 4.2. Các phương pháp chẩn đoán lâm sàng

#### 4.2.1. Bệnh tích đại thể

WTD ở *M. rosenbergii*, do bị nhiễm *MrNV* và *XSV*, chủ yếu được chẩn đoán bằng màu trắng của cơ thịt vùng bụng. Tuy nhiên, dấu hiệu lâm sàng này không đặc trưng đối với WTD, nhưng ở đây có liên quan đến các tỷ lệ tử vong cao.

#### 4.2.2. Hóa chất dùng trong lâm sàng

Không có.

#### 4.2.3. Vi thể bệnh học (microscopic pathology)

Mô bị ảnh hưởng nhất trong sau ấu trùng bị nhiễm là cơ vân của vùng đầu ngực, bụng và đuôi. Các đặc trưng mô bào học bao gồm hoại tử Zenker cấp tính của các cơ vân, có đặc điểm là thoái hóa kính (hyaline degeneration) nặng nề, hoại tử và dung giải cơ thịt. Cũng thấy có phù trung bình và bất thường ở các khoảng hở của các tế bào cơ bị nhiễm, do sự hiện diện của các thể vùi ưa kiềm trong bào tương có hình oval hay không đều, trong các cơ thịt bị nhiễm (1, 7). Các thể vùi ưa kiềm trong bào tương có hình oval hay không đều là thể hiện bệnh học (pathognomonic), chứng minh được trong các mô mực tiêu bằng mô bào học (1, 7).

Sự hiện diện của *MrNV* trong các tế bào bị nhiễm có thể chứng minh được từ các lát cắt mô bào học, sử dụng đoạn thăm dò (probe) DNA đặc hiệu với *MrNV*, có gắn nhãn DIG, để lai ghép *trong phòng thí nghiệm (in-situ hybridisation)* (16).

#### 4.2.4. Tiêu bản ướt (wet mounts)

Hiện nay không áp dụng.

#### 4.2.5. Tiêu bản khô (smears)

Hiện nay không áp dụng.

#### 4.2.6. Soi kính hiển vi điện tử (electron microscopy)/mô bệnh học (cytopathology)

Sử dụng kính hiển vi chuyển điện tử (transmission electron microscopy – TEM), các tế bào bị nhiễm thể hiện hoại tử, cho thấy bào tương bị mất tổ chức. Các nghiên cứu với TEM phát hiện sự hiện diện của các hạt virus giả hình cầu không có vỏ bao ngoài (non-enveloped para-spherical virus particles) với các kích thước khác nhau trong bào tương của các tế bào mô liên kết và tế bào cơ thịt. Các hạt virus cỡ lớn có kích thước gấp năm đến sáu lần các hạt khác, với đường kính 26 – 27 nm, và được phân loại là *MrNV*. Các hạt virus nhỏ hơn có cấu trúc tương tự (nhỏ hơn năm đến sáu lần), với đường kính từ 14 – 16 nm, được phân loại là *XSV* (10).

### 4.3. Các phương pháp phát hiện và nhận diện tác nhân gây bệnh

#### 4.3.1. Các phương pháp phát hiện trực tiếp

Các phương pháp chẩn đoán dựa vào gen di truyền và kháng thể hiện sẵn có cho phát hiện *MnNV/XSV* (12, 16, 26).

##### 4.3.1.1. Các phương pháp soi kính hiển vi

###### 4.3.1.1.1. Tiêu bản ướt

Hiện không áp dụng.

###### 4.3.1.1.2. Tiêu bản khô

Hiện không áp dụng

###### 4.3.1.1.3. Các lát cắt mẫu đã làm cố định

Xem Đoạn 4.2.3.

##### 4.3.1.2. Phân lập (isolation) và nhận diện (identification) tác nhân gây bệnh

###### 4.3.1.2.1. Tế bào nuôi cấy (cell culture)/môi trường nhân tạo (artificial media)

*MnNV/XSV* có thể dễ dàng cho sinh sôi trong lớp tế bào nuôi C6/36 có nguồn gốc từ muỗi *Aedes albopictus* (19) và lớp tế bào này có thể được nuôi tạo dễ dàng trong môi trường Leibovitz L-15 có chứa 100 đơn vị quốc tế (International Units)  $0 \text{ ml}^{-1}$  penicillin,  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  streptomycin và  $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  fungizone, được bổ sung với 10% huyết thanh phôi bò, ở  $28^\circ\text{C}$  (19). Một lớp tế bào nuôi khác, gọi là lớp tế bào SSN-1 có nguồn gốc từ cá, có hỗ trợ phần nào cho sinh sôi của các virus này (6).

###### 4.3.1.2.2. Các phương pháp phát hiện kháng nguyên dựa vào kháng thể

Các phương pháp chẩn đoán dựa vào kháng thể đối với *MnNV* bao gồm ELISA được mô tả bởi Romestand & Bonami (11) hay ELISA chồng lớp ba kháng thể (triple-antibody sandwich [TAS] ELISA) dựa vào một kháng thể đơn giá (9).

###### 4.3.1.2.2.1. Giao thức ELISA (12)

i) Nghiền nhuyễn (homogenise) các mẫu sau ấu trùng tôm bị bệnh hay khỏe mạnh với dịch đệm phosphate (phosphate buffered saline – PBS) và đem ly tâm ở  $10.000 \text{ g}$  trong 15 phút. Thu thập và bảo quản dịch phù nổi ở  $-20^\circ\text{C}$  để đem chẩn đoán.

ii) Khoác phủ các phiến ELISA với  $50 \mu\text{l}$  mẫu dịch phù nổi mỗi giếng và đem ủ qua đêm ở  $4^\circ\text{C}$ .

iii) Làm kết khối (block) với  $250 \mu\text{l}$  albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin – BSA) pha 1% với PBS, để kết khối trong 1 giờ ở  $37^\circ\text{C}$ .

iv) Thêm vào  $50 \mu\text{l}$  IgG kháng *MnNV* pha với 1% BSA và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng.

v) Thêm  $50 \mu\text{l}$  hợp chất IgG kháng chuột kết hợp với peroxidase ở  $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$  và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

vi) Thêm  $50 \mu\text{l}$  chất màu orthophenylene diamine ở  $0,4 \text{ mg ml}^{-1}$  trong dịch đệm chất nền (substrate buffer: citric acid 0,1 M, sodium acetate 0,1 M, pH 5,4,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ở hàm lượng cuối cùng là 0,33%).

vii) Làm ngưng phản ứng sau 15 phút bằng thêm  $25 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  vào từng giếng.

viii) Đo lường mật độ quang học (optical density – OD) ở 492 nm bằng máy đọc phiến ELISA (ELISA plate reader).

LƯU Ý: hai lần xả rửa với PBS sẽ được thực hiện giữa từng bước được mô tả trên.

#### 4.3.1.2.2.2. Giao thức TAS-ELISA (9)

i) Khoác phủ các phiến ELISA với kháng thể đa giá của thỏ sinh ra kháng *MnNV* và ủ trong 2 giờ ở 37°C và bảo quản ở 4°C trước khi sử dụng.

ii) Làm kết khối (block) với 250 µl BSA 1% pha với PBS trong 1 giờ ở 37°C.

iii) Nghiền nhuyễn các mẫu sau ấu trùng tôm bị nhiễm hay khỏe mạnh trong 0,5 ml PBS và đem ly tâm ở 10.000 *g* trong 15 phút. Thu thập và bảo quản dịch phù nổi ở -20°C cho mục đích chẩn đoán.

iv) Thêm 100 µl mẫu vào từng giếng và ủ qua đêm ở 4°C.

v) Thêm 50 µl kháng thể đơn giá sinh ra kháng *MnNV* pha với 1% BSA và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng.

vi) Thêm 50 µl hợp chất IgG kháng chuột đã kết hợp với peroxidase ở 0,4 µg ml<sup>-1</sup> và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

vii) Thêm vào 50 µl chất màu orthophenylene diamine ở 0,4 mg ml<sup>-1</sup> pha trong dịch đệm chất nền (substrate buffer: citric acid 0,1 M, sodium acetate 0,1 M, pH 5,4, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ở hàm lượng cuối cùng là 0,33%).

viii) Làm ngưng phản ứng sau 15 phút bằng thêm vào từng giếng 25 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

ix) Đo lường OD ở 492 nm với máy đọc phiến ELISA.

LƯU Ý: hai lần xả rửa với PBS sẽ được thực hiện giữa mỗi bước mô tả trên.

#### 4.3.1.2.3. Các kỹ thuật phân tử

##### 4.3.1.2.3.1. Phản ứng chuỗi phân tử sử dụng enzyme giải mã đảo ngược (reverse-transcription polymerase chain reaction – RT-PCR)

Giao thức cho RT-PCR để phát hiện *MnNV*/XSV được phát triển bởi Sri Widada và cộng sự (16) và Sahul Hameed và cộng sự (13, 14) được khuyến áp dụng cho mọi tình trạng. *MnNV* và XSV có thể phát hiện được bằng RT-PCR một cách riêng biệt, sử dụng các bộ đoạn mồi (primer) đặc trưng hay hai virus này có thể được phát hiện cùng lúc bằng áp dụng RT-PCR phức hợp một bước một ống nghiệm (single-tube one-step multiplex RT-PCR) (26). RT-PCR kết ổ (nested RT-PCR hay nRT-PCR) cũng hiện sẵn có trong thương mại và được khuyến áp dụng cho theo dõi đàn giống (broodstock) và con giống (seed) (18).

##### Chiết xuất RNA toàn phần (total RNA)

i) Thu thập 50 mg sau ấu trùng hay 100 mg cơ quan (mô mang, cơ bụng, cơ đuôi hay các chân bơi) từ tôm càng trưởng thành và đem nghiền nhuyễn trong 300 µl dịch đệm TN (20 mM Tris/HCl, 0,4 M NaCl, pH 7,4).

ii) Ly tâm huyền dịch này ở 12.000 *g* trong 15 phút ở nhiệt độ phòng và thu thập dịch phù nổi.

iii) Lấy ra 150 µl dịch phù nổi và pha vào 1 ml TRIzol. Trộn đều và ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.

iv) Sau 5 phút, thêm 200  $\mu$ l chloroform vào mẫu này, trộn đều và ly tâm ở 12.000 **g** trong 15 phút ở nhiệt độ phòng.

v) Thu thập dịch lỏng và chuyển vào một ống nghiệm sạch, làm ngưng kết RNA bằng trộn với 500  $\mu$ l isopropanol.

vi) Ủ mẫu này trong 10 phút ở nhiệt độ phòng và đem ly tâm ở 12.000 **g** trong 10 phút ở 4°C.

vii) Hòa tan phần RNA trầm lắng trong 50  $\mu$ l dịch đệm TE (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA [ethylene diamine tetra-acetic acid], pH 7,5) sau khi đã rửa với 75% ethyl alcohol.

viii) Định lượng RNA bằng đo lường độ hấp phụ quang học ở 260 nm, sử dụng quang phổ kế (spectrophotometer) và kiểm tra độ tinh khiết bằng đo lường tỷ lệ của  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ .

### Giao thức RT-PCR

Ba phương pháp RT-PCR được mô tả để phát hiện *MrNV* và XSV. Giao thức đầu tiên là RT-PCR một bước được điều chỉnh bởi Sri Widada và cộng sự (16) và Sahul Hameed và cộng sự (14), và phương pháp này có thể áp dụng được để xác nhận *MrNV* và XSV trong sau ấu trùng của tôm càng được thu thập từ các ổ nghi ngờ dịch WTD. Giao thức thứ nhì là giao thức nRT-PCR có độ nhạy được mô tả bởi Sudhakaran và cộng sự (18). Xét nghiệm này có thể áp dụng được cho theo dõi về virus cho sau ấu trùng, thiếu trùng và tôm giống khỏe mạnh. Giao thức thứ ba là một RT-PCR phức hợp được điều chỉnh bởi Yoganandhan và cộng sự (26). Giao thức này có thể áp dụng cho cùng lúc phát hiện *MrNV* và XSV trong các ổ dịch hay để theo dõi con giống (seed) và đàn giống (broodstock). Trong tất cả các giao thức được mô tả ở đây đều sử dụng một bộ kit RT-PCR thương mại cho phép giải mã đảo ngược và khuếch đại trong một ống nghiệm phản ứng đơn lẻ.

**Giao thức 1:** RT-PCR cho phát hiện đặc hiệu *MrNV* hay XSV trong sau ấu trùng hay thiếu trùng đã bị nhiễm (14, 16, 21):

Các đối chứng sau đây sẽ được bao gồm trong từng xét nghiệm phân tích RT-PCR đối với *MrNV* hay XSV: a) một mẫu mô đã biết âm tính với *MrNV*/XSV; b) một mẫu đã biết dương tính với *MrNV*/XSV (mô hay virus đã tinh lọc); và c) một đối chứng “không là khuôn mẫu”.

Với RT-PCR, sử dụng một bộ kit RT-PCR thương mại. Phản ứng được thực hiện trong 50  $\mu$ l dịch đệm RT-PCR có chứa 20 pmol của từng đoạn mỗi đặc hiệu với *MrNV* hay XSV và khuôn mẫu RNA (10 – 100 ng), áp dụng các chu kỳ sau: giải mã đảo ngược (RT) ở 52°C trong 30 phút; làm thoái hóa ở 95°C trong 2 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ của làm thoái hóa ở 94°C trong 40 giây, tối luyện ở 55°C trong 40 giây, và duỗi dài ở 68°C trong 1 phút, kết thúc với bước duỗi dài thêm trong 10 phút ở 68°C. Phân tích các sản phẩm RT-PCR bằng điện di (electrophoresis) trên keo agarose 1% được nhuộm với ethidium bromide và một thang độ DNA thích hợp, và đọc bằng máy chiếu tia cực tím (ultraviolet transilluminator).

Một phản ứng dương tính sẽ được chỉ thị bằng sản phẩm 425 bp với *MrNV* và sản phẩm 546 bp với XSV. Độ nhạy của phân tích là khoảng 2,5 fg của RNA toàn phần.

Kết chuỗi của đoạn mồi PCR cho *MrNV* (nhiệt độ tối luyện 55°C; kích thước sản phẩm 425 bp):

Chiều đi (forward): 5'-GCG-TTA-TAG-ATG-GCA-CAA-GG-3'  
Chiều về (reverse): 5'-AGC-TGT-GAA-ACT-TCC-ACT-GG-3'

Kết chuỗi của đoạn mồi PCR cho XSV (nhiệt độ tối luyện 55°C; kích thước sản phẩm 546 bp):

Chiều đi (forward): 5'-CGC-GGA-TCC-GAT-GAA-TAA-GCG-CAT-TAA-TAA-3'  
Chiều về (reverse): 5'-CCG-GAA-TTC-CGT-TAC-TGT-TCG-GAG-TCC-CAA-3'

**Giao thức 2:** nRT-PCR này là nhạy hơn và có ích cho theo dõi con giống và đàn giống (18):



Với nRT-PCR, bước đầu của RT-PCR, như được mô tả ở giao thức 1, sẽ được thực hiện với các đoạn mồi bên ngoài (external primers) và nPCR sẽ được thực hiện mà sử dụng sản phẩm của RT-PCR làm khuôn mẫu. Với nRT-PCR, cho 2 ml sản phẩm vào một ống nghiệm PCR có chứa 20 µl hỗn hợp phản ứng (10 mM Tris/HCl, pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X-100, 200 µM của từng dNTP, 20 pmol của từng đoạn mồi bên trong [internal primer], 1,25 đơn vị [units] DNA polymerase loại bền nhiệt). Giao thức nRT-PCR cho cả hai virus này bao gồm một khối đầu ở 95°C trong 10 phút, sau đó là 30 chu kỳ trong 1 phút ở 94°C, 1 phút ở 55°C và 1 phút ở 72°C với đuôi dài cuối cùng ở 72°C trong 5 phút. Phân tích sản phẩm của nRT-PCR bằng điện di trên keo agarose 1%, nhuộm với ethidium bromide và có một thang độ DNA thích hợp, đọc bằng máy chiếu tia cực tím.

Nếu số lượng virus đủ cao, một DNA có 425 bp sẽ được khuếch đại đối với *MrNV* và DNA có 546 bp đối với *XSV* trong PCR bước đầu. Trong bước nPCR, một sản phẩm 205 bp chỉ thị cho phát hiện *MrNV* và một sản phẩm 236 bp chỉ thị cho phát hiện *XSV*. Độ nhạy của phát hiện của nRT-PCR là khoảng 1000 lần cao hơn so với RT-PCR một bước.

Kết chuỗi của các đoạn mồi bên ngoài cho *MrNV* và *XSV* được nêu trong giao thức 1 và kết chuỗi của các đoạn mồi bên trong được nêu dưới đây:

Kết chuỗi của các đoạn mồi bên trong đối với *MrNV* (nhiệt độ tối ưu 55°C; kích thước sản phẩm 205 bp):

Chiều đi: 5'-GAT-GAC-CCC-AAC-GTT-ATC-CT-3'  
Chiều về: 5'-GTG-TAG-TCA-CTT-GCA-AGA-GG-3'

Kết chuỗi của các đoạn mồi bên trong đối với *XSV* (nhiệt độ tối ưu 55°C; kích thước sản phẩm 236 bp):

Chiều đi: 5'-ACA-TTG-GCG-GTT-GGG-TCA-TA-3'  
Chiều về: 5'-GTG-CCT-GTT-GCT-GAA-ATA-CC-3'

*Giao thức 3*: xét nghiệm RT-PCR phức hợp cho phát hiện cùng lúc *MrNV* và *XSV* (26).

Để tránh thực hiện cùng lúc hai phản ứng RT-PCR riêng biệt, có thể áp dụng một phương pháp cải tiến cho cùng lúc phát hiện *MrNV* và *XSV* trong một xét nghiệm RT-PCR phức hợp một bước, một ống nghiệm. Phản ứng được thực hiện trong 50 µl dịch đệm RT-PCR có chứa 20 pmol từng đoạn mồi đặc hiệu đối với *MrNV* và *XSV*, và khuôn mẫu RNA (10 – 100 ng), áp dụng các chu kỳ sau: giải mã đảo ngược ở 52°C trong 30 phút; làm thoái hóa ở 95°C trong 2 phút, sau đó là 30 chu kỳ làm thoái hóa ở 94°C trong 40 giây, tối ưu ở 55°C trong 40 giây, và đuôi dài ở 68°C trong 1 phút, kết thúc với bước đuôi dài thêm trong 10 phút ở 68°C. Phân tích các sản phẩm RT-PCR bằng điện di trên keo agarose 1% được nhuộm với ethidium bromide và một thang đo DNA thích hợp, đọc bằng máy chiếu tia cực tím.

Nếu *MrNV* và *XSV* hiện diện trong mẫu, một DNA có 681 bp đối với *MrNV* và DNA có 500 bp đối với *XSV* sẽ được khuếch đại. Sự hiện diện của cả hai sản phẩm 681 bp và 500 bp chỉ thị sự hiện diện của *MrNV* và *XSV*. Độ nhạy phát hiện của xét nghiệm RT-PCR phức hợp này là khoảng 25 fg (đoạn) của RNA toàn phần.

Các kết chuỗi đoạn mồi PCR đối với *MrNV* (nhiệt độ tối ưu 55°C; kích thước sản phẩm 681 bp):

Chiều đi: 5'-GAT-ACA-GAT-CCA-CTA-GAT-GAC-C-3'  
Chiều về: 5'-GAC-GAT-AGC-TCT-GAT-AAT-CC-3'

Các kết chuỗi đoạn mồi PCR đối với *XSV* (nhiệt độ tối ưu 55°C; kích thước sản phẩm 500 bp):

Chiều đi: 5'-GGA-GAA-CCA-TGA-GAT-CAC-G-3'  
Chiều về: 5'-CTG-CTC-ATT-ACT-GTT-CGG-AGT-C-3'

#### Giao thức 4: xét nghiệm RT-PCR định lượng

Xét nghiệm RT-PCR định lượng (RT-qPCR) có thể thực hiện để định lượng *MnNV*/*XSV* trong các mẫu bị nhiễm, sử dụng màu xanh lá SYBR, dựa vào phương pháp được mô tả bởi Hernandez-Herrera *et al.* và Zhang *et al.* (6, 27).

i) Chiết xuất RNA toàn phần từ các mẫu như phương pháp được nêu phần trên.

ii) Ủ các mẫu RNA ở 37°C trong 1 giờ trong hỗn hợp RT (150 ng RNA toàn phần, 8 U  $\mu\text{l}^{-1}$  M-MLV RT trong dịch đệm, 20 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  hexaprimers [đoạn mỗi cấp tám] và 0.2 mM dNTP) để thu được cDNA toàn phần và định lượng cDNA bằng đo lường độ hấp phụ ở 260 nm.

iii) Thực hiện RT-qPCR với sử dụng hỗn hợp q-PCR (1  $\mu\text{l}$  cDNA [10 ng], 6  $\mu\text{l}$  nước cất, 0,5  $\mu\text{l}$  từng đoạn mỗi đặc hiệu với *MnNV* và *XSV* [hàm lượng 25 mM] và 2  $\mu\text{l}$  hỗn hợp phản ứng có chứa Fast Start *Taq* polymerase, hỗn hợp dNTP, màu SYBR Green, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  và 1  $\mu\text{l}$  dung dịch màu).

iv) Chương trình PCR gồm kích hoạt ban đầu cho *Taq* polymerase trong 10 phút ở 95°C, sau đó là 40 chu kỳ trong 15 giây ở 95°C, 5 giây ở 60°C và 10 giây ở 72°C. Các nhiệt độ làm tan chảy sẽ được đo lường bằng chuyển lại thành 70°C trong 30 giây và dần dần gia nhiệt đến 95°C trong 10 phút. Các đối chứng phản ứng âm tính sẽ gồm nước thay cho cDNA khuôn mẫu trong từng lượt chạy để đảm bảo không có virus.

v) Số lượng các bản sao của cDNA trong mẫu sẽ được xác định bằng áp dụng phương pháp so vị trí Chu kỳ Chiếu sáng (Light Cycler fit point method).

Kết chuỗi của các đoạn mồi cho *MnNV* (nhiệt độ tối ưu 60°C; kích thước sản phẩm 211 bp):

Chiều đi: 5'-AGG-ATC-CAC-TAA-GAA-CGT-GG-3'  
Chiều về: 5'-CAC-GGT-CAC-AAT-CCT-TGC-G-3'

Kết chuỗi của các đoạn mồi cho *XSV* (nhiệt độ tối ưu 58°C; kích thước sản phẩm 68 bp):

Chiều đi: 5'-AGC-CAC-ACT-CTC-GCA-TCT-GA-3'  
Chiều về: 5'-CTC-CAG-CAA-AGT-GCG-ATA-CG-3'

#### 4.3.1.2.3.2. Phương pháp lai ghép trong phòng thí nghiệm (In-situ hybridisation) (16, 28)

i) Cố định sau ấu trùng bị nhiễm với hóa chất làm cố định được đệm trung hòa của Davidson mà không chứa acid acetic (hóa chất làm cố định thích hợp với RNA) (5).

ii) Thấm nhập paraffin vào các mô này theo các phương pháp chuẩn (2) và cắt thành các lát dày 7  $\mu\text{m}$ . Đặt các lát cắt này lên các phiến kính hiển vi có điện tích dương.

iii) Để khô các phiến trong lò ở 60°C. Loại bỏ paraffin và tái hợp nước qua một chuỗi xử lý bằng ethanol và nước.

iv) Ủ các lát cắt hai lần trong 5 phút với diethylpyrocarbonate (DEPC) đã được xử lý với Tris/HCl (0,2 M, pH 7,4) và 10 phút với DEPC đã được xử lý với Tris/HCl có chứa 100 mM glycine.

v) Xử lý các lát cắt trong 5 phút ở 37°C với dịch đệm TE (10 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, pH 8,0) có chứa 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  proteinase K không chứa RNase (RNase-free proteinase K).

vi) Cố định sau (post-fix) các lát cắt với DEPC đã xử lý với PBS có chứa 4% formaldehyde trong 5 phút.

vii) Các lát cắt này được acetyl hóa (acetylated) trong 10 phút với dịch đệm 0,1 M triethanolamine (TEA), pH 8, có chứa 0,25% (v/v) acetyl anhydride (acetyl khan).

viii) Sau khi tái hợp nước, ủ các phiến ở 42°C trong 16 giờ trong buồng ẩm với dịch đệm lai ghép (hybridisation buffer) có chứa 40% formamide đã khử ion (deionised formamide), 10% dextran sulphate, dung dịch 1 x Denhart, 4 x SSC (citrate natri chuẩn – standard saline citrate), 10 mM dithiothreitol (DDT), 1 mg ml<sup>-1</sup> tRNA của nấm men (yeast tRNA), 1 mg ml<sup>-1</sup> DNA của tinh dịch cá hồi đã được làm thoái hóa và phân đoạn và 40 ng ml<sup>-1</sup> đoạn thăm dò DNA đã làm thoái hóa có gắn nhãn digoxigenin, đặc hiệu với *MrNV*.

ix) Rửa các phiến kính ở 37°C trong 10 phút với 1 x SSC, trong 10 phút với 0,5 x SSC và hai lần trong 5 phút với dịch đệm III (100 mM Tris/HCl [pH 7,5], 150 mM NaCl).

x) Ủ trong 20 phút trong dịch đệm IV (dịch đệm III, 1% huyết thanh dê bình thường) ở nhiệt độ phòng.

xi) Ủ các phiến trong 1 giờ trong buồng ẩm với dịch đệm III có chứa 1% huyết thanh dê bình thường và 0,1% phosphatase kiềm của cừu kháng DIG (sheep anti-DIG alkaline phosphatase).

xii) Rửa các phiến cẩn thận trong 10 phút, ba lần với dịch đệm III và hai lần trong 5 phút với dịch đệm IV (100 mM Tris/HCl [pH 9,5], 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>).

xiii) Phát triển phản ứng bằng ủ các phiến trong dịch đệm V có chứa NTB và BCIP trong bóng tối và buồng ẩm, thời gian tối thiểu 2 giờ hay qua đêm. Làm ngưng phản ứng bằng ủ các phiến trong dịch đệm III 2 x trong 15 phút.

xiv) Đệm màu cho các phiến với 1% Nâu (Brown) Bismarck, đậy lam kính lên và kiểm tra với kính hiển vi nền sáng.

xv) Lai ghép dương tính thể hiện là ngưng kết xanh dương đậm đến đen trên nền đệm màu có màu vàng đến nâu.

#### 4.3.1.2.3.3. Khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng lặp (loop-mediated isothermal amplification) (8)

Pillai và cộng sự (8) đã áp dụng khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng lặp (LAMP) để chẩn đoán nhanh *MrNV* và XSV trong tôm càng nước ngọt. Một bộ gồm bốn đoạn mồi, hai bên ngoài và hai bên trong, đã được thiết kế một cách riêng biệt để phát hiện *MrNV* và XSV. Ngoài ra, một cặp đoạn mồi vòng lặp (loop primer) đặc hiệu với *MrNV* và XSV đã được sử dụng để thúc đẩy phản ứng LAMP.

i) Chiết xuất RNA toàn phần từ các mẫu như phương pháp được mô tả phần trên.

ii) Thực hiện phản ứng RT-LAMP trong hỗn hợp phản ứng (2 μM từng đoạn mồi FIP và BIP, 0,2 μM của từng đoạn mồi bên ngoài F3 và B3, 1400 μM của hỗn hợp dNTP, 0,6 M betaine, 6 mM MgSO<sub>4</sub>, 8 U Bst DNA polymerase kèm theo 1 x dung dịch bổ sung, 0,125 U của AMV Rtase và lượng chỉ định của khuôn mẫu RNA, trong thể tích cuối cùng là 25 μl), ở 55, 60, 63 và 65°C cho mỗi lần, tiếp theo là làm bất hoạt bằng nhiệt ở 80°C trong 2 phút để kết thúc phản ứng. Các mẫu không bị nhiễm và hỗn hợp phản ứng không chứa khuôn mẫu sẽ được sử dụng làm đối chứng âm tính.

iii) Phân tích các sản phẩm LAMP bằng điện di trên keo agarose 2%, nhuộm với ethidium bromide và một thang độ đánh dấu DNA, đọc kết quả bằng máy chiếu tia cực tím.

#### 4.3.1.2.3.4. Phân tích kết chuỗi

Để xác nhận các ký chủ mới có nghi ngờ về *MrNV*/XSV, đoạn DNA đã được khuếch đại từ PCR sẽ được phân tích kết chuỗi theo các giao thức chuẩn (15).

#### 4.3.1.2.4. Tinh lọc tác nhân gây bệnh

MrNV và XSV có thể làm tinh khiết được theo giao thức được mô tả bởi Bonami và cộng sự (3). Phương pháp chi tiết cho tinh lọc virus được trình bày như sau:

i) Thu thập đủ lượng sau ấu trùng tôm đã bị nhiễm và nghiền nhuyễn với dịch đệm PBS (pH 7,4), sử dụng máy xay mô (tissue blender).

ii) Ly tâm huyền dịch này ở 10.000 **g** trong 25 phút ở 4°C. Thu thập dịch phù nổi và ly tâm lần nữa ở 160.000 **g** trong 4 giờ ở 4°C.

iii) Hòa tan phần trầm lắng trong PBS và chiết xuất hai hoặc ba lần với freon (1,1,2-trichloro-2,2,1-trifluoroethane).

iv) Thu thập lớp dịch lỏng và đem ly tâm ở 160.000 **g** trong 4 giờ ở 4°C.

v) Hòa tan phần trầm lắng với dịch đệm TN và phân tách hai virus với thẩm thấu (gradient) qua sucrose 15 – 30% (w/v pha với PBS), sau đó là thẩm thấu bằng CsCl.

vi) Kiểm tra tính tinh khiết của các virus bằng kính hiển vi chuyển điện tử (TEM), sử dụng các lưới carbon khoắc phủ kết dính (collodion-carbon-coated), nhuộm màu âm với 2% PTA (phosphotungstic acid), pH 7,0.

#### 4.3.2. Các phương pháp huyết thanh học

Không có phương pháp nào được phát triển.

### 5. So sánh các xét nghiệm theo mục đích sử dụng

Các phương pháp hiện nay sẵn có cho giám sát tập trung (targeted surveillance) và chẩn đoán đối với WTD được liệt kê trong Bảng 5.1. Ký hiệu sử dụng trong Bảng là: a = phương pháp được khuyến áp dụng vì các lý do về khả năng sẵn có, tính tiện dụng, có độ nhạy và tính đặc hiệu của chẩn đoán; b = phương pháp là chuẩn với độ nhạy và tính đặc hiệu tốt cho chẩn đoán; c = phương pháp đã được áp dụng trong một số hoàn cảnh, nhưng chi phí, tính chính xác hay các yếu tố khác làm hạn chế nhiều ứng dụng của phương pháp; và d = phương pháp hiện nay không được khuyến áp dụng cho mục đích này. Các phương pháp này có một số nghi ngờ về khả năng thích hợp có liên quan đến độ tin cậy, độ nhạy, tính đặc hiệu và tính tiện dụng. Tuy nhiên không phải tất cả các xét nghiệm được liệt kê trong nhóm a và b đều đã được trải qua thử nghiệm chuẩn hóa và đánh giá, nhưng bản chất thủ tục và thực tế là đã được áp dụng rộng rãi mà không cho ra các kết quả nhầm lẫn, đã làm cho các phương pháp này được chấp nhận.

**Bảng 5.1.** Các phương pháp xét nghiệm cho giám sát tập trung và chẩn đoán

Phương pháp	Giám sát tập trung				Chẩn đoán ban đầu	Chẩn đoán xác nhận
	Âu trùng	Sau ấu trùng	Thiếu trùng	Trường thành		
Các dấu hiệu đại thể	d	c	c	d	c	d
Phân tích sinh học	d	c	d	d	c	c
Soi kính hiển vi quang học trực tiếp	d	c	c	d	c	c
Mô bệnh học (histopathology)	d	c	c	c	b	b
Soi kính hiển vi chuyển điện tử	d	d	d	d	d	a
Các xét nghiệm phân tích dựa vào kháng thể	d	c	d	d	b	b
Thăm dò DNA – trong phòng thí nghiệm (DNA probes – in situ)	c	b	b	c	a	a
Phản ứng chuỗi phân tử (PCR)	a	a	a	a	a	a
Phân tích kết chuỗi	d	d	d	a	d	a

### 6. (Các) xét nghiệm được khuyến áp dụng cho giám sát tập trung để tuyên bố sạch bệnh trắng đuôi

Phương pháp cho giám sát tập trung để tuyên bố sạch bệnh trắng đuôi là nRT-PCR.

## 7. Tiêu chí kết hợp chẩn đoán

### 7.1. Định nghĩa trường hợp nghi ngờ

Sự xuất hiện của cơ thịt màu trắng kèm theo tỷ lệ tử vong là trường hợp nghi ngờ về bệnh trắng đuôi. Bệnh thường ảnh hưởng đến các giai đoạn ấu trùng, sau ấu trùng và thiếu trùng của tôm càng *M. rosenbergii* và có thể thể hiện là ngưng ăn, giảm hoạt động bơi và biến màu trắng của các cơ vùng bụng và đuôi. Tỷ lệ tử vong đạt đến tối đa 95% vào 5 ngày sau khi xuất hiện biến màu trắng. Tiêu chí kết hợp chẩn đoán được tóm tắt trong Đoạn 4.2 phần trên.

### 7.2. Định nghĩa trường hợp đã xác nhận

Các trường hợp nghi ngờ được kiểm tra trước bằng RT-PCR và được xác nhận bằng nRT-PCR, phân tích kết chuỗi, soi kính hiển vi chuyển điện tử và thăm dò DNA.

## 8. Tham khảo

1. ARCIER J.-M., HERMAN F., LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., MARI. J. & BONAMI J.-R. (1999). A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 177–181.
2. BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 1–114.
3. BONAMI J.R., SHI Z., QIAN D. & SRI WIDADA J. (2005). White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of *MrNV* as a new type of nodavirus. *J. Fish Dis.*, **28**, 23–31.
4. CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of monodon baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, HI, USA, pp 177–184.
5. HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probe. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.
6. HERNANDEZ-HERRERA R.I., CHAPPE-BONNICHON V., ROCH P., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2007). Partial susceptibility of the SSN-1 fish cell line to a crustacean virus: a defective replication study. *J. Fish Dis.*, **30**, 673–679.
7. HSIEH C.Y., WU Z.B., TUNG M.C., TU C., LO S.P., CHANG T.C., CHANG C.D., CHEN S.C., HSIEH Y.C. & TSAI S.S. (2006). *In situ* hybridization and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **29**, 665–671.
8. PILLAI D., BONAMI J.-R. & SRI WIDADA J. (2006). Rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus (XSV), the pathogenic agents of white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), by loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.*, **29**, 275–283.
9. QIAN D., LIU W., JIANXIANG W. & YU L. (2006). Preparation of monoclonal antibody against *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus and application of TAS-ELISA for virus diagnosis in post-larvae hatcheries in east China during 2000–2004. *Aquaculture*, **261**, 1144–1150.

10. QIAN D., SHI Z., ZHANG S., CAO Z., LIU W. LI L., XIE Y., CAMBOURNAC I. & BONAMI J.R. (2003). Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Fish Dis.*, **26**, 521–527.
11. RAVI M., NAZEER BASHA A., SARATHI M., ROSA IDALIA H.H., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2009). Studies on the occurrence of white tail disease (WTD) caused by *MrNV* and XSV in hatchery-reared post-larvae of *Penaeus indicus* and *P. monodon*. *Aquaculture*, (In Press).
12. ROMESTAND B. & BONAMI J.R. (2003). A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of *MrNV* in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *J. Fish Dis.*, **26**, 71–75.
13. SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004). Experimental transmission and tissue tropism of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus like-particles in *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 191–196.
14. SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004). Studies on the occurrence and RTPCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* in India. *Aquaculture*, **238**, 127–133.
15. SAMBROOK J. & RUSSELL D.W. (2001). Chapter 12 DNA Sequencing. *In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Editions. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, USA, P 12.1–12.120.
16. SRI WIDADA J., DURAND S., CAMBOURNAC QIAN D., SHI Z., DEJONGHE E., RICHARD V. & BONAMI J.R. (2003). Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, in situ hybridization and RT-PCR. *J. Fish Dis.*, **26**, 583–590.
17. SUDHAKARAN R., HARIBABU P., RAJESH KUMAR S., SARATHI M., ISHAQ AHMED V.P., VENKATESAN C. & SAHUL HAMEED A.S. (2008). Natural aquatic insect carriers of *Macrobrachium rosenbergii* noda virus (*MrNV*) and extra small virus (XSV). *Dis. Aquat. Org.*, **79**, 141–145.
18. SUDHAKARAN R., ISHAQ AHMED V.P., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2006). Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*. *J. Fish Dis.*, **29**, 1–9.
19. SUDHAKARAN R., PARAMESWARAN V. & SAHUL HAMEED A.S. (2007). *In vitro* replication of *Macrobrachium rosenbergii* Noda virus (*MrNV*) and extra small virus (XSV) in C6/36 cell line. *J. Virol. Methods*, **146**, 112–118.
20. SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., GOPAL C. & SAHUL HAMEED A.S. (2006). Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* noda virus (*MrNV*) and extra small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). *Aquaculture*, **257**, 136–141.
21. SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., RAJESH KUMAR S., SARATHI M. & SAHUL HAMEED A.S. (2007). Cloning and sequencing of capsid protein of Indian isolate of extra small virus from *Macrobrachium rosenbergii*. *Virus Res.*, **131**, 283–287.
22. SUDHAKARAN R., YOGANANDHAN K., ISHAQ AHMED V.P. & SAHUL HAMEED A.S. (2006). *Artemia* as a possible vector for *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus transmission (XSV) to *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. *Dis. Aquat. Org.*, **70**, 155–160.
23. VAN REGENMORTEL M.H.V., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L., CARTENS E.B., ESTES M.K., LEMON S.M., MANILOFF J., MAYO M.A., MCGEOCH D.J., PRINGLE C.R. & WICKNER R.B. (2000). Virus

Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego.

24. WANG C.S. & CHANG J.S. (2006). RT-PCR amplification and sequence analysis of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus (XSV) associated with white tail disease of *M. rosenbergii* (de Man) cultured in Taiwan. GenBank Direct Submission.

25. YOGANANDHAN K., LEARTVIBHAN M., SRIWONGPUK S. & LIMSUWAN C. (2006). White tail disease of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand. *Dis. Aquatic. Org.*, **69**, 255–258.

26. YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2005). Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay. *J. Fish Dis.*, **28**, 1–5.

27. ZHANG H., WANG J., YUAN J., LI L., ZHANG J., BONAMI J.-R. & SHI Z. (2006). Quantitative relationship of two viruses (*MrNV* and XSV) in white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquatic. Org.*, **71**, 11–17.

28. ZSIKLA V., BAUMANN M. & CATHOMAS G. (2004). Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. *J. Clin. Pathol.*, **57**, 54–656.

\*

\* \*

**NB:** There is an OIE Reference Laboratory for White tail disease (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE Web site for the most up-to-date list: [www.oie.int](http://www.oie.int)).