BỘ NÔNG NGHIỆP
VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
CỤC THÚ Y
Số: 934 /QĐ-TY-TS

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Hà Nội, ngày 12 tháng 12 năm 2014

QUYẾT ĐỊNH
Ban hành Tiêu chuẩn cơ sở

CỤC TRƯỞNG CỤC THÚ Y

Căn cứ Nghị định số 127/2007/NĐ-CP ngày 01/8/2007 của Chính phủ quy định chi tiết thi hành một số điều của Luật tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật;

Căn cứ Quyết định số 666/QĐ-BNN-TCCB ngày 04/4/2014 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Cục Thú y;

Căn cứ biên bản cuộc họp do Cục Thú y được tổ chức tại thành phố Hồ Chí Minh vào ngày 05/11/2014 về việc thống nhất Tiêu chuẩn cơ sở xét nghiệm phát hiện tác nhân gây bệnh đốm trắng và bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm; Công văn số 928/TYV6-TH ngày 06/8/2014 của Cơ quan Thú y vùng VI đề xuất TCCS xét nghiệm phát hiện tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp;

Xét đề nghị của Trưởng phòng Thú y Thủy sản,

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Ban hành kèm theo Quyết định này 02 Tiêu chuẩn cơ sở (TCCS):

1. TCCS xét nghiệm phát hiện vi rút gây bệnh đốm trắng ở tôm bằng kỹ thuật Real-time PCR; Ký hiệu: TCCS 01: 2014/TY-TS.

2. TCCS xét nghiệm phát hiện vi khuẩn V*ibrio parahaemolyticus* có gien độc gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm bằng kỹ thuật PCR; Ký hiệu: TCCS 02: 2014/TY-TS.

Điều 2. Đối tượng áp dụng

1. TCCS 01: 2014/TY-TS và TCCS 02: 2014/TY-TS được áp dụng tại tất cả các phòng thử nghiệm của các đơn vị trực thuộc Cục Thú y.

2. Chi cục Thú y, Chi cục Thủy sản, Chi cục Nuôi trồng thủy sản và các đơn vị liên quan căn cứ điều kiện phòng thử nghiệm của các đơn vị có thể tham khảo, áp dụng hai Tiêu chuẩn cơ sở nêu trên cho phù hợp, hiệu quả.

Điều 3. Quyết định này có hiệu lực kể từ ngày ký.

Điều 4. Trưởng phòng Thú y Thủy sản và các đơn vị liên quan chịu trách nhiệm áp dụng các tiêu chuẩn trên./.

Nơi nhận:
- Như Điều 4;
- BT. Cao Đức Phát (để b/c);
- TTr. Vũ Văn Tám (để b/c);
- Tổng cục Thủy sản;
- Lưu TS, VT.

CỤC TRƯỞNG

CỘNG HOÀ X.H.C.N VIỆT NAM
CỤC THÚ Y
BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

Phạm Văn Đông

TCCS

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ

TCCS 01: 2014/TY-TS

QUY TRÌNH PHÁT HIỆN VI RÚT GÂY BỆNH ĐỐM TRẮNG (WSSV) Ở TÔM BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR

HÀ NỘI, NGÀY 12/12/2014

Lời nói đầu: Cục Thú y ban hành Tiêu chuẩn cơ sở xét nghiệm phát hiện vi rút gây bệnh đốm trắng ở tôm. Tiêu chuẩn này được áp dụng tại tất cả các phòng thử nghiệm của các đơn vị trực thuộc Cục Thú y. Các phòng thử nghiệm khác trong hệ thống thú y thủy sản căn cứ điều kiện phòng thử nghiệm của đơn vị mình có thể tham khảo, áp dụng cho phù hợp, hiệu quả

Cơ quan biên soạn: Cục Thú y

Quyết định ban hành số 934/QĐ-TY-TS ngày 12 tháng 12 năm 2014 của Cục trưởng Cục Thú y

MỤC LỤC

I. MỤC ĐÍCH 4
II. PHẠM VI ÁP DỤNG 4
III. TRÁCH NHIỆM 4
IV. NỘI DUNG 4
4.1. Nguyên tắc 4
4.2. Nguyên liệu hóa học và sinh học 4
4.3. Thiết bị và dụng cụ 5
4.4. Cách tiến hành 6
4.4.3. Chiết tách DNA 7
4.4.4. Thực hiện phản ứng Real-time PCR 7
4.4.5. Đọc kết quả 8
Tài liệu tham khảo 9
PHỤ LỤC A: CHIẾT TÁCH DNA 10
PHỤ LỤC B: VẬT TƯ CHO MỘT MẪU XÉT NGHIỆM 12

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ
XÉT NGHIỆM PHÁT HIỆN VI RÚT GÂY BỆNH ĐỐM TRẮNG (WSSV) Ở TÔM BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR

I. MỤC ĐÍCH

Phát hiện vi rút gây bệnh đốm trắng (WSSV) ở tôm bằng kỹ thuật Real-time PCR.

II. PHẠM VI ÁP DỤNG

Quy trình này được áp dụng cho xét nghiệm phát hiện vi rút gây bệnh đốm trắng (WSSV) ở tôm bằng kỹ thuật Real-time PCR. Đối tượng áp dụng là các loài giáp xác như: tôm sú (*Penaeus monodon*), tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vanamei*)….

Mẫu được dùng để xét nghiệm là: mang, chân bơi, đuôi, giáp đầu ngực, máu, cơ bụng, ấu trùng, hậu ấu trùng của các loài nêu trên.

III. TRÁCH NHIỆM

Xét nghiệm viên, kỹ thuật viên, chẩn đoán viên phải thực hiện theo đúng quy trình. Phụ trách phòng thí nghiệm có trách nhiệm kiểm tra và đảm bảo quy trình được tuân thủ đúng, đủ và chính xác.

IV. NỘI DUNG

4.1. Nguyên tắc

Vi rút gây bệnh đốm trắng ở tôm là một vi rút giống *Whispovirus* thuộc họ *Nimaviridae,* được phát hiện bằng kỹ thuật Real-time PCR với mồi xuôi WSSV1011F, mồi ngược WSSV1079R và đoạn dò Taqman Probe WSSV-p.

4.2. Nguyên liệu hóa học và sinh học

4.2.1. Nguyên liệu hóa học

- Dung dịch Phosphate Buffered Saline (PBS):

Thành phần	Số lượng (gram)
NaC1	8,0
KC1	0,2
Na_2HPO_4	1,15
KH_2PO_4	0,2

Lượng hóa chất trên được cho vào bình thủy tinh, cho nước cất 2 lần vào vừa đúng 1 lít, khuấy tan hoàn toàn, điều chỉnh pH 7,2 ± 0,2 và đem hấp vô trùng (Autoclave) 121°C, 15 phút.

- Cồn (Ethanol) 90% và 70%

- Kít chiết tách InviMAG® Virus DNA/RNA Mini Kit/ KF96, Cat. No: 7441050100 hoặc kít tương đương.

- Kít Platinum® Quantitative PCR superMix-UDG, Cat. No: 11730-017 hoặc kít tương đương.

4.2.2. Nguyên liệu sinh học

- Đoạn mồi (primers) và đoạn dò (probe)

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

- Hệ thống đối chứng:

+ Đối chứng âm là mẫu nước không có RNA/DNA dùng để pha loãng các chất phản ứng.

+ Mẫu đối chứng dương là mẫu có chứa DNA của vi rút gây bệnh đốm trắng (WSSV) được chiết tách từ mẫu dương chuẩn, chứa trong các ống có dán nhãn rõ ràng, lập danh sách quản lý và lưu giữ -75^{o}C. Mỗi ống không rã đông quá 03 lần.

4.3. Thiết bị và dụng cụ

- Máy trộn mẫu (Vortex)

- Máy ly tâm nhỏ (Centrifuge Spin)

- Máy lắc và ủ nhiệt HLC-MHR23 hoặc tương đương.

- Máy chiết tách RNA/DNA tự động Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex; Thermo Scientific™ KingFisher™ mL hoặc tương đương.

- Máy ly tâm lạnh cho ống eppendorf 1,5 ml MIKRO 200R hoặc tương đương.

- Máy hấp khử trùng Autoclave

- Máy Real-time PCR Stratagene Mx3005P hoặc tương đương.

- Tủ an toàn sinh học cấp II

- Tủ lạnh lưu trữ ở các nhiệt độ: + 4^{o}C; –20°C và -80^{o}C

- Micropipettes và đầu típ có lọc tương ứng lấy được các thể tích: 0,5 - 10 µl; 10 -100 µl và 100 - 1000µl.

- Các đĩa nhựa 96 giếng hoặc ống nhựa chứa dung dịch tách chiết, phù hợp với máy chiết tách RNA/DNA tự động ở trên.

- Ống PCR 200 µl hoặc đĩa PCR 200 µl 96 giếng.

- Ống eppendorf thể tích 0,5 ml và 1,5 ml

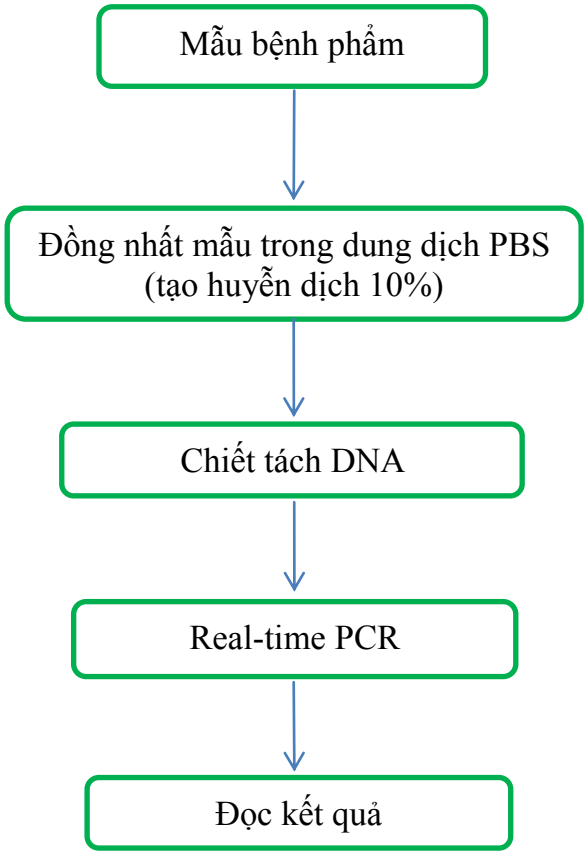
- Ống ly tâm nhựa thể tích 5 ml, 10 ml và 50 ml

- Chai thủy tinh 500-1000 ml

- Bút viết, đồng hồ chuyên dụng trong phòng thí nghiệm và các dụng cụ cần thiết khác.

4.4. Cách tiến hành

4.4.1. Sơ đồ thực hiện



4.4.2. Chuẩn bị mẫu

Loại mẫu được sử dụng để xét nghiệm với quy trình này có thể là mẫu tươi hoặc mẫu được cố định trong cồn 90%, bao gồm: mang, chân bơi, đuôi, giáp đầu

ngực, máu, cơ bụng hoặc ấu trùng, hậu ấu trùng của các loài giáp xác như: tôm sú (*Penaeus monodon*), tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vanamei*)…

Dùng pank, kéo vô trùng để thực hiện các thao tác: tách, cắt lấy mẫu. Mẫu được chia thành 2 phần: 1 phần cho thực hiện xét nghiệm và 1 phần lưu trữ.

Mẫu được nghiền nhuyễn với tỷ lệ 1 thể tích mẫu trong 9 thể tích dung dịch muối đệm PBS (Phosphate Buffered Saline), để tạo thành huyễn dịch 10% (sử dụng cân phân tích cân trọng lượng mẫu được nghiền để điều chỉnh lượng dung dịch PBS nhằm đảm bảo tạo được huyễn dịch 10%). Thu hồi huyễn dịch 10% vào ống nắp vặn vô trùng, rồi chuyển vào tủ âm sâu (-80^{o}C) trong thời gian tối thiểu 1 giờ trước khi tiến hành chiết tách DNA.

4.4.3. Chiết tách DNA

- Quy trình chiết tách DNA được thực hiện theo hướng dẫn của Công ty sản xuất kít chiết tách InviMAG® Virus DNA/RNA Mini Kit/ KF96 (Phụ lục A).

- Hoặc có thể sử dụng các loại kít chiết tách khác tương đương, phù hợp cho việc chiết tách DNA.

4.4.4. Thực hiện phản ứng Real-time PCR

- Đặt ống PCR hoặc đĩa PCR 96 giếng chứa thành phần phản ứng Real-time PCR (Master Mix) và mẫu DNA vào máy Real-time PCR. Vận hành máy theo hướng dẫn và chọn chương trình luân nhiệt đã được cài đặt.

- Chuẩn bị Master Mix và chu kỳ luân nhiệt được thực hiện theo Bảng 1 và Bảng 2.

Bảng 1: Chuẩn bị Master Mix theo kít Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG, Cat.No: 11730-017.

STT	Thành phần	Nồng độ gốc	Thể tích cho 1 phản ứng (µl)
1	Nước không có RNA/DNA		6,0
2	Dung dịch SuperMix		12,5
3	Mồi WSSV1011F	20 µM	0,5
4	Mồi WSSV1079R	20 µM	0,5
5	Đoạn dò WSSV-p	6 µM	0,5
Tổng thể tích dung dịch đệm thực hiện phản ứng			**20**
6	Mẫu DNA		5
Tổng thể tích dung dịch thực hiện phản ứng			**25**

* Tùy theo kít sử dụng mà thành phần Master Mix có thể khác nhau, việc thực hiện chuẩn bị Master Mix nên tuân thủ theo hướng dẫn của kít được sử dụng.

Bảng 2: Chu kỳ luân nhiệt đối với máy Real-time PCR Stratagene Mx3005P

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
50°C	02 phút (*)	01
95°C	02 phút (*)	01
94°C	20 giây	40
60°C	60 giây (Ghi nhận tín hiệu quang ở bước này)	

(*) Nhiệt độ và thời gian này chỉ phù hợp với kít Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG, Cat.No: 11730-017. Việc thực hiện cài đặt nhiệt độ và thời gian nên tuân thủ theo hướng dẫn của từng bộ kít được sử dụng.

4.4.5. Đọc kết quả

Kết quả của phản ứng Real-time PCR được xác định dựa vào chu kỳ ngưỡng (Cycle threshold: Ct).

Kiểm tra hệ thống mẫu đối chứng dương và đối chứng âm. Nếu hệ thống mẫu đối chứng dương và đối chứng âm là đúng thì điều chỉnh baseline theo 5% của tín hiệu huỳnh quang và đọc kết quả xét nghiệm theo baseline này.

+ Mẫu đối chứng âm phải cho kết quả âm tính.

+ Mẫu đối chứng dương phải cho kết quả dương tính và có giá trị Ct trùng khớp với giá trị Ct của mẫu đã được chuẩn độ trước đó.

Nếu hệ thống mẫu đối chứng dương và đối chứng âm là không đúng thì phải thực hiện lại xét nghiệm.

Giải thích kết quả

+ Mẫu có giá trị Ct < 35 được xem là dương tính

+ Mẫu không có giá trị Ct là âm tính

+ Mẫu có giá trị Ct trong khoảng $35 \leq Ct \leq 40$ được xem là nghi ngờ

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

Tài liệu tham khảo

1. OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2012. CHAPTER 2.2.6. White Spot Disease.

http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/

2. Tang K.F.J. and Lightner D.V., 2001. Development of real-time PCR assays for detection of White spot syndrome virus, Yellow head virus, Taura syndrome virus and Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp.

3. Invitrogen™ Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG.

PHỤ LỤC A: CHIẾT TÁCH DNA

a. Chuẩn bị hóa chất

Các hóa chất cần được chuẩn bị và bảo quản theo đúng hướng dẫn của bộ kít 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 DNA/RNA Elution Buffer (EB)

Nếu chiết tách DNA 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.

b. Tiến hành

- Huyễn 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 phút.

- 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. Lắc đĩa với gia tốc 750rpm/10 phút và ở nhiệt độ 65^{o}C.

- Lấy đĩa ra khỏi máy lắc, để nguội trong 5 phút, 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 DNA đã được cài đặt trước đó theo hướng dẫn của hãng sản xuất kít InviMAG® Virus DNA/RNA Mini Kit/ KF96.

- Sau 34 phút, quá trình chiết tách hoàn tất. Thu hồi DNA của từng giếng vào ống eppendorf 0.5 ml tương ứng đã ghi rõ ký hiệu mẫu.

- Bảo quản mẫu DNA ở 4^{o}C trong vài giờ và -70^{o}C trong thời gian lâu hơn.

PHỤ LỤC B: VẬT TƯ CHO MỘT MẪU XÉT NGHIỆM

TT	Tên Vật Tư	Đơn vị tính	Số lượng bình quân cho 01 mẫu	Diễn giải
1	Cryotube 1,8ml free RNA/DNA (nắp vặn ngoài, tự đứng)	Cái	7	1 cái: chứa mẫu 2 cái: chuẩn bị mẫu đối chứng. 1 cái: chứa Proteinase K working solution 1 cái: chứa Carrier RNA working solution 1 cái : chứa primer & probes 1 cái : chuẩn bị master mix
2	Cryotube 5ml free RNA/DNA (nắp vặn ngoài, tự đứng)	Cái	2	1 cái: chứa Elution Buffer 1 cái: chứa Binding Solution và MAP solution
3	PCR tube 0,5 ml	Cái	3	Lưu giữ mẫu RNA/DNA
4	Trip PCR có nắp 0,2ml	Cái	1	Nhân gene rRT-PCR
5	InviMag® Virus DNA/RNA Mini Kit/ KF96(480 test/ kit)	Kit	0,0069	Chiết tách RNA hoặc DNA
6	Ethanol Absolute	ml	7,15	Bổ sung vào dung dịch rửa 1, rửa 2
7	KF ml tube	Cái	3	Chiết tách RNA hoặc DNA
8	KF ml Tip Combs	Cái	1	Chiết tách RNA hoặc DNA
9	Tube ly tâm nhựa 50 ml	Cái	3	1 cái: chứa dung dịch Lysis 1 cái: chứa dung dịch rửa 1 1 cái: chứa dung dịch rửa 2
10	Finntip Multistepper 1500µl sterile	Cái	5	1 cái: cho dung dịch rửa 1 2 cái: cho dung dịch rửa 2 1 cái: cho Lysis Solution vào eppendorf 1 cái: cho Elution Buffer vào đĩa chiết xuất

TT	Tên Vật Tư	Đơn vị tính	Số lượng bình quân cho 01 mẫu	Diễn giải
11	Micropipet filter tip 1000µl	Cái	8	2 cái: Mix Proteinase K và Carrier RNA 3 cái: chuyển mẫu + Lysis Solution vào đĩa chiết xuất 1 cái: cho Binding Solution vào ống cryotube 5ml 1 cái: cho MAP Solution vào ống cryotube 5 ml 1 cái: cho Binding Solution và MAP solution vào đĩa chiết xuất
12	Micropipet filter tip 200µl	Cái	8	3 cái: cho mẫu và đối chứng vào eppendorf chứa Lysis Solution 3 cái: cho thu hoạch RNA/DNA 1 cái: chuẩn bị master mix 1 cái: phân phối Master mix vào đĩa PCR
13	Micropipet filter tip 20µl	Cái	3	Chuẩn bị master mix
14	Micropipet filter tip 10µl	Cái	6	1 cái: chuẩn bị master mix 1 cái: đưa mẫu RNA/DNA vào đĩa PCR chứa master mix 4 cái: đưa mẫu RNA/DNA đối chứng vào đĩa PCR chứa master mix
15	Quần áo bảo hộ dùng 1 lần	Bộ	2	Xử lý mẫu
16	Găng tay	Đôi	8	4 đôi: xử lý mẫu 2 đôi: chiết xuất RNA/DNA 2 đôi: chuẩn bị master mix
17	Khẩu trang N95	Cái	2	Xử lý mẫu
18	Primers và Probe WSSV (2000 test/bộ)	Bộ	0,0028	Nhân gene rPCR
19	Invitrogen™Platinum®Quantitative PCR SuperMix-UDG (100 react with 50µl/ reaction)	Kit	0,0275	Nhân gene rRT-PCR: 25 µl/ reaction

TCCS **TIÊU CHUẨN CƠ SỞ**

TCCS 02: 2014/TY-TS

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ
XÉT NGHIỆM PHÁT HIỆN VI KHUẨN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* CÓ GIEN GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TÍNH Ở TÔM BẰNG KỸ THUẬT PCR

HÀ NỘI, NGÀY 12/12/2014

Lời nói đầu:

Cục Thú y ban hành Tiêu chuẩn cơ sở xét nghiệm phát hiện vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* có gien gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm. Tiêu chuẩn này được áp dụng tại tất cả các phòng thử nghiệm của các đơn vị trực thuộc Cục Thú y. Các phòng thử nghiệm khác trong hệ thống thú y thủy sản căn cứ điều kiện phòng thử nghiệm của đơn vị mình có thể tham khảo, áp dụng cho phù hợp, hiệu quả.

Cơ quan biên soạn: Cục Thú y

Tiêu chuẩn cơ sở: Được ban hành theo Quyết định ban hành số 934/QĐ-TY-TS ngày 12/12/2014 của Cục trưởng Cục Thú y.

MỤC LỤC

I. MỤC ĐÍCH 4
II. PHẠM VI ÁP DỤNG 4
III. TRÁCH NHIỆM 4
IV. NỘI DUNG 4
4.1. Nguyên tắc 4
4.2. Môi trường nuôi cấy và thuốc thử 4
4.3. Thiết bị và dụng cụ 4
4.4. Lấy mẫu 5
4.5. Xử lý mẫu và tăng sinh 5
4.6. Chiết tách DNA của vi khuẩn 7
4.7. Thực hiện phản ứng PCR 7
4.8. Điện di và đọc kết quả 8
TÀI LIỆU THAM KHẢO 9
PHỤ LỤC A: MÔI TRƯỜNG TĂNG SINH VÀ THUỐC THỬ 10
PHỤ LỤC B: CHIẾT TÁCH DNA VI KHUẨN 11
PHỤ LỤC C: VẬT TƯ CHO MỘT MẪU XÉT NGHIỆM 13

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ
QUY TRÌNH PHÁT HIỆN VI KHUẨN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* CÓ GIEN GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TÍNH Ở TÔM BẰNG KỸ THUẬT PCR

I. MỤC ĐÍCH

Phát hiện vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* có gien gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease – AHPND) bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi sử dụng là AP3 (AHPND primer set 3), nhằm góp phần đáp ứng nhu cầu chẩn đoán, phòng chống dịch bệnh.

II. PHẠM VI ÁP DỤNG

Tiêu chuẩn cơ sở này được áp dụng để xét nghiệm phát hiện vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* có gien gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm.

III. TRÁCH NHIỆM

Xét nghiệm viên, kỹ thuật viên, chẩn đoán viên phải thực hiện theo đúng quy trình. Phụ trách phòng thí nghiệm có trách nhiệm kiểm tra và đảm bảo quy trình được tuân thủ đúng, đủ và chính xác.

IV. NỘI DUNG

4.1. Nguyên tắc

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* có gien gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm được phát hiện bằng kỹ thuật PCR. DNA của vi khuẩn được chiết tách từ mẫu tôm bệnh có triệu chứng, bệnh tích điển hình của bệnh hoại tử gan tụy cấp tính hoặc từ canh tăng sinh vi khuẩn (nuôi cấy vi khuẩn), nhưng không nhất thiết phải đợi kết quả phân lập, định danh vi khuẩn.

4.2. Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

Chi tiết được trình bày tại Phụ lục A.

4.3. Thiết bị và dụng cụ

- Tủ cấy an toàn sinh học cấp 2.
- Tủ ấm có thể điều chỉnh được ở 37 ^{o}C ± 1 ^{o}C
- Ống nghiệm có nắp vặn: 20 mm × 160 mm.
- Đĩa petri nhựa có đường kính 90 – 100 mm.

- Micropipette, đầu típ 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl.

- Microtube 1,5 ml.

- Máy lắc nhiệt điều chỉnh được nhiệt độ (37 ^{o}C, 65 ^{o}C, và 95 ^{o}C, 200 rpm).

- Máy ly tâm tube có thể tích 1,5 ml.

- Khay nước đá.

4.4. Lấy mẫu

Các mẫu cần lấy để xét nghiệm, bao gồm: Mẫu tôm tươi, mẫu nước, mẫu bùn. Mẫu cần được thu thập, bảo quản trong thùng lạnh 2-8 ^{o}C và đưa đến phòng xét nghiệm càng nhanh càng tốt để đảm bảo độ chính xác của kết quả xét nghiệm (tốt nhất là không quá 24 giờ, kể từ khi hoàn thành việc lấy mẫu).

4.5. Xử lý mẫu và tăng sinh

Xử lý mẫu có thể được tiến hành tùy theo từng loại mẫu:

4.5.1. Đối với mẫu tôm:

- Cần được vận chuyển đến phòng thí nghiệm trong điều kiện bảo quản có đá lạnh.

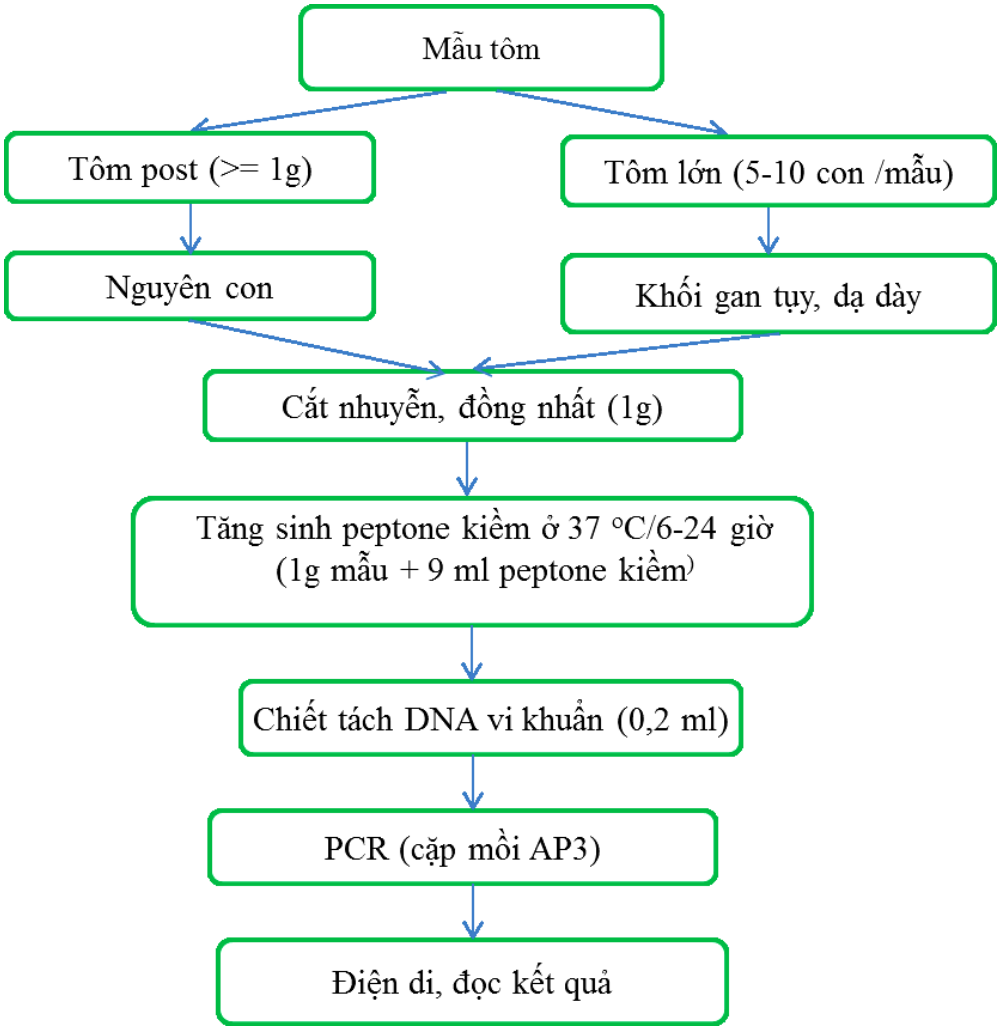
- Trường hợp không tăng sinh (nuôi cấy vi khuẩn): Chiết tách DNA của vi khuẩn trực tiếp từ mẫu tôm bệnh có triệu chứng, bệnh tích điển hình của bệnh hoại tử gan tụy cấp tính.

- Trường hợp tăng sinh (được tóm tắt tại Hình 1):

+ Nếu là tôm post (từ 1 đến 25 ngày tuổi), cần tiến hành cắt nhuyễn ít nhất khoảng 1g tôm, trộn đều, tạo thành mẫu đồng nhất. Sau đó, cho toàn bộ phần mẫu đồng nhất này vào ống nghiệm có chứa sẵn 9 ml peptone kiềm, ủ tăng sinh (nuôi cấy vi khuẩn) ở 37 ^{o}C trong khoảng 8 giờ hoặc qua đêm.

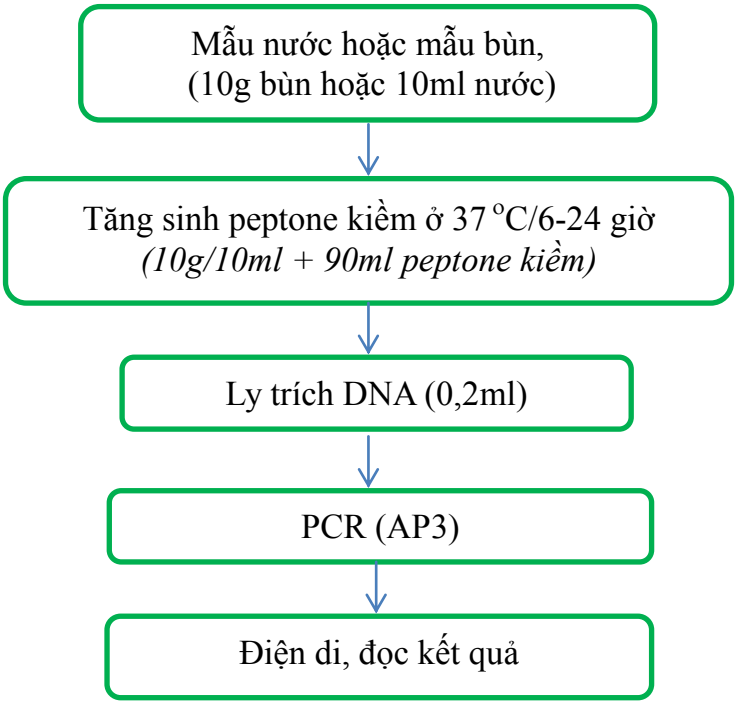
+ Nếu là tôm lớn hơn 25 ngày tuổi, lấy khối gan tụy và dạ dày của 5 - 10 con tôm được cắt nhỏ và tăng sinh trong 9 ml canh peptone kiềm, ủ tăng sinh ở 37 ^{o}C trong khoảng 8 giờ hoặc qua đêm.

+ Sau khi tăng sinh, lấy 0,2 ml dịch canh tăng sinh để chiết tách DNA của vi khuẩn.



Hình 1: Sơ đồ xử lý, tăng sinh và xét nghiệm mẫu tôm.

4.5.2. Đối với mẫu nước, mẫu bùn



Hình 2: Sơ đồ xử lý, tăng sinh và xét nghiệm mẫu nước, mẫu bùn.

Đối với mẫu nước, mẫu bùn: Mẫu cần được pha loãng và đồng nhất trong peptone kiềm theo tỷ lệ 1:10 (nên sử dụng 10 ml nước hoặc 10g bùn trong 90 ml peptone kiềm), ủ tăng sinh ở 37 ^{o}C trong khoảng 8 giờ hoặc qua đêm. Sau khi tăng sinh, lấy 0,2 ml dịch canh tăng sinh để chiết tách DNA vi khuẩn (Hình 2).

4.6. Chiết tách DNA của vi khuẩn

Quá trình chiết tách DNA của vi khuẩn được thực hiện theo hướng dẫn của kít chiết tách InviMag Bacteria DNA Mini Kit/ KFmL (code: 2433150200).

Hoặc có thể sử dụng các loại kít chiết tách khác tương đương, phù hợp cho việc chiết tách DNA (Phụ lục B).

4.7. Thực hiện phản ứng PCR

Để phát hiện vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* có gien gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm, cần thực hiện quy trình PCR, với cặp mồi là AP3-F và AP3-R (cho chiều dài sản phẩm là 336 bp). Trong đó, các thành phần phản ứng PCR trong tổng thể tích 25µl được chuẩn bị theo Bảng 1 với chu trình nhiệt theo Bảng 2.

Bảng 1: Thành phần phản ứng PCR

(theo kít *Taq* PCR Master Mix kit, Cat.No: 201443 của hãng Qiagen).

STT	Thành phần	Nồng độ gốc	Thể tích (µl)
1	Water		8.5
2	Reaction mix	2X	12.5
3	Primer AP3-F	10µM	0.5
4	Primer AP3-R	10µM	0.5
5	Template DNA or Control DNA		3

* Đối với kít có thành phần Master Mix khác, việc chuẩn bị Master Mix nên tuân thủ theo hướng dẫn của của nhà sản xuất.

* Nhiệt độ và thời gian này chỉ phù hợp với kít *Taq* PCR Master Mix kit, (Cat.No: 201443). Việc thực hiện cài đặt nhiệt độ và thời gian nên tuân thủ theo hướng dẫn của từng bộ kít được sử dụng.

Bảng 2: Chu trình nhiệt.

Nhiệt độ (^{o}C)	Thời gian	Số chu kỳ
94	5 phút (*)	1
94	30 giây	30
53	30 giây	
72	40 giây	
72	5 phút	1

4.8. Điện di và đọc kết quả

Điện di: Điện di sản phẩm PCR bằng gel agarose 1,5%, có bổ sung 1/10.000 chất nhuộm DNA là Gel Red hoặc Gel Green đều được.

Đọc kết quả điện di:

- Mẫu dương tính là mẫu được phát hiện đồng thời với đối chứng dương, có cùng đoạn băng sáng có chiều dài 336 bp so với thang chuẩn (đối với cặp mồi AP3) và đối chứng âm không xuất hiện bất kỳ đoạn băng sáng nào.

- Mẫu âm tính là mẫu không có băng sáng AP3.

***Lưu ý**: Đối chứng dương và đối chứng âm luôn được thực hiện cùng lúc trong suốt quá trình xét nghiệm (từ khâu chiết tách DNA, thực hiện phản ứng PCR, đến điện di và đọc kết quả), để đảm bảo kết quả xét nghiệm được kiểm soát chặt chẽ, chính xác*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Health Protection Agency (2007). Identification of *Vibrio* species. National Standard Method BSOP ID 19 Issue 2 (http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp).

2. Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (2014). Timothy William Flegel and *Chu-Fang Lo*, Announcement regarding free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) (http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?publication_id=1128&title=primers-for-detection-of-bacterial-isolates-that-cause-ahpnd).

3. A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. Ratchanok Sirikharin, Suparat Taengchaiyaphum, Kallaya Sritunyalucksana, Siripong Thitamadee, Timothy W. Flegel, Rapeepat Mavichak and Porranee Proespraiwong. http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2030&title=new-pcr-detection-method-for-ahpnd.

PHỤ LỤC A: MÔI TRƯỜNG TĂNG SINH VÀ THUỐC THỬ

- Môi trường tăng sinh: canh peptone kiềm.

- Hóa chất chiết tách DNA vi khuẩn: bộ kít chiết tách tự động InviMag Bacteria DNA Mini Kit/KFmL (code: 2433150200), hoặc các kít chiết tách DNA vi khuẩn có chất lượng tương đương khác.

- Mồi sử dụng là AP3, cho chiều dài của sản phẩm khuếch đại là 336 bp, với trình tự cụ thể như sau:

- **Mồi xuôi AP3-F: 5'-ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC-3'**

- **Mồi ngược AP3-R: 5'-GTGGTAATAGATTGTACAGAA-3'**

- Nguyên liệu dùng cho phản ứng PCR là *Taq* PCR Master Mix kit (code: 201443) của hãng Qiagen. Thang DNA 100bp (DNA ladder, code: 15628-019) của Invitrogen. Ngoài ra, cần có các hóa chất cơ bản khác như agarose 1,5%, dung dịch điện di TBE 1X, loading dye 6X, gel red, và ethanol 100%.

- Đối chứng dương *Vibrio parahaemolyticus* (RAHO6-AHPND-ST) của Cơ quan Thú y vùng VI là vi khuẩn được phân lập từ mẫu tôm thực địa. Mẫu tôm được thu thập từ ao tôm bị hoại tử gan tụy, và cho kết quả mô học dương tính với AHPND. Đồng thời, trình tự gen của sản phẩm PCR (AP1, AP2) trùng khớp hoàn toàn (100%) với trình tự của Timothy William Flegel đã công bố.

- Đối chứng âm có thể là một loài vi khuẩn Gram âm (ví dụ *E. coli*, hoặc bất kỳ dòng *Vibrio* spp. nào đó với điều kiện vi khuẩn đó không cho kết quả PCR dương tính với mồi AP3). Trong vài trường hợp, nước (không DNA, không RNA) cũng có thể được sử dụng như là đối chứng âm.

PHỤ LỤC B: CHIẾT TÁCH DNA VI KHUẨN

B1. Phương pháp thứ nhất: Chiết tách DNA của vi khuẩn bằng máy tách chiết tự động King Fisher

Quá trình chiết tách DNA theo kít InviMag Bacteria DNA Mini Kit/ KFmL (code:2433150200) trải qua 3 giai đoạn chủ yếu sau:

1/ Ly trích bằng máy lắc nhiệt ở 65^{o}C/10 phút: Cho thêm 200µl Resuspension buffer R vào eppendorf chứa sẵn 200 µl mẫu. Sau đó, chuyển hỗn hợp mẫu vừa có được vào extraction tube L và vortex đều trong 5 giây, rồi đem ủ bằng máy lắc nhiệt ở 65 ^{o}C/10 phút.

2/ Ly trích bằng máy lắc nhiệt ở 95^{o}C/10 phút: Đặt các extraction tube L vào máy lắc nhiệt ở 95^{o}C/10 phút để tăng hiệu quả ly trích.

Lưu ý: Trong suốt quá trình ly trích bằng máy lắc nhiệt ở 65 ^{o}C/10 phút và ở 95 ^{o}C/10 phút, xét nghiệm viên cần chuẩn bị trước các dung dịch thuộc hệ thống King Fisher để thực hiện các bước chiết tách trong máy tự động. Cụ thể bao gồm:

Tube A: 400µl Binding Buffer B6 và 20µl Map Solution A

Tube B: 800µl Wash Buffer I

Tube C: 800µl Wash Buffer II

Tube D: 800µl Wash Buffer II

Tube E: 200µl Elution Buffer

3/ Gắn DNA: Sau bước ly trích, chuyển khoảng 450 µl mẫu vừa được ly trích sang tube A của hệ thống King Fisher. Gắn các dãy tube King Fisher có đầu lọc vào bên phải của máy chiết tách tự động, gắn các tip comb vào máy. Sau đó, nhấn nút start để chạy chương trình chiết tách bằng máy chiết tách tự động. Sau khi kết thúc chương trình chạy trên máy, tube E là tube có chứa DNA chiết tách. DNA vừa chiết tách này được chuyển vào 1 eppendorf khác, và bảo quản ở - 20^{o}C. Trong trường hợp DNA còn lẫn các hạt từ, nên chuyển toàn bộ DNA đó vào tube 1,5 ml, rồi ly tâm với tốc độ tối đa trong 1 phút, hút phần nổi để làm DNA template.

Đối với những phòng thí nghiệm không trang bị máy chiết tách tự động

King Fisher, xét nghiệm viên có thể sử dụng các loại kit chiết tách DNA vi khuẩn khác, sao cho chất lượng DNA khuôn mẫu được đảm bảo là được. Ngoài ra, dịch vi khuẩn sau khi tăng sinh cũng có thể được chiết tách bằng phương pháp nhiệt.

B2. Phương pháp thứ 2: Chiết tách DNA vi khuẩn bằng phương pháp sốc nhiệt

Cụ thể, gồm các bước như sau:

+ Bước 1: hút 0,5 ml dịch tăng sinh cho vào eppendorf 1,5ml; ly tâm 13000 RCF trong 5 phút; bỏ nổi, lấy cặn.

+ Bước 2: Tiếp tục cho thêm 500 µl nước (không RNA, DNA); vortex cho tan đều; ly tâm 13000 RCF trong 5 phút; bỏ nổi, lấy cặn. Bước 2 được thực hiện tối thiểu 2 lần.

+ Bước 3: Thêm 300 µl nước (không RNA, DNA); vortex tan đều; cho vào máy ủ nhiệt nước (water bath) ở 95 ^{o}C trong 10 phút.

+ Bước 4: Tiếp tục ly tâm trong 13000 RCF trong 5 phút; hút phần nổi bên trên làm DNA khuôn mẫu (DNA template). Có thể bảo quản DNA khuôn mẫu ở ngăn mát tủ lạnh (2 - 8 ^{o}C), hoặc ở -20 ^{o}C.

Mặc dù, phương pháp sốc nhiệt đơn giản, dễ thực hiện và ít tốn chi phí. Tuy nhiên, phương pháp này ít khi được khuyến cáo áp dụng trong trường hợp có liên quan đến giải trình tự gen, hoặc các nghiên cứu khác ở mức độ sâu hơn về sinh học phân tử.

PHỤ LỤC C: VẬT TƯ CHO MỘT MẪU XÉT NGHIỆM

1. Vật tư để tăng sinh vi khuẩn

STT	Nguyên liệu sử dụng cho tăng sinh vi khuẩn	Đơn vị tính	Số lượng cần cho 1 mẫu đã tính hao hụt
1	Alkaline peptone water (peptone kiềm)	g	1,98 (mẫu bùn / nước); 0,198 (mẫu tôm)

2. Vật tư để chiết tách DNA của vi khuẩn

STT	Nguyên liệu sử dụng để chiết tách DNA của vi khuẩn	Đơn vị tính	Số lượng cần cho 1 mẫu đã tính hao hụt
1	InViMag Bacteria DNA kit/KFml (75 test/kit)	kit	0,015
2	Micropipet filter tip 1000 µl	cái	3,15
3	Micropipet filter tip 200 µl	cái	1,26
4	Graduated Microtubes 0,65ml	cái	1,05
5	Khẩu trang Surgical face mask	cái	0,42
6	Găng tay size S (TNT Blue)	đôi	0,42
7	Que cấy nhựa	cái	1,05
8	Cồn	ml	0,44

3. Vật tư để thực hiện xét nghiệm PCR

STT	Nguyên liệu sử dụng cho thực hiện PCR	Đơn vị tính	Số lượng cần cho 1 mẫu đã tính hao hụt
1	Micropipet filter tip 100-1000 µl	cái	0,66
2	Micropipet filter tip 5-200 µl	cái	1,65
3	Đầu típ 0,2-20ul	cái	1,65
4	Tube 1,8ml	cái	0,33
5	Tube PCR 0,2ml	cái	1,65
6	Khẩu trang Surgical face mask	cái	0,33
7	Găng tay size M (TNT Blue)	đôi	0,33
8	Sequence AP3F (100 nmoles/ống)	nmoles	0,01
9	Sequence AP3R (100 nmoles/ống)	nmoles	0,01
10	*Taq* PCR Master Mix (250 test/kit)	kit	0,0068
11	10x TBE Electrophoresis Buffer	ml	0,31
12	Ultra Pure Agarose	gr	0,05
13	Ladder	ul	0,06
14	6x DNA Loading Dye	ul	3,40
15	Gel Red Nucleic acid	ul	0,32

STT	Nguyên liệu sử dụng cho thực hiện PCR	Đơn vị tính	Số lượng cần cho 1 mẫu đã tính hao hụt
16	Cồn	ml	0,68
17	Distilled water DNAase, RNAse Free	ml	0,51

Ghi chú: Trong 1 lít môi trường Alkaline peptone water (peptone kiềm) gồm có 10g peptone, và 10g sodium chloride. Tuy nhiên, thông thường Alkaline peptone water được cung cấp dưới dạng tổng hợp (được bán sẵn trên thị trường), nên chỉ cần hòa tan 20g môi trường trong 1 lít nước cất tiệt trùng và hấp autoclave ở 121 ^{o}C/15 phút, pH: 8,5. Bảo quản ở nhiệt độ phòng (25 ^{o}C).