

Số: 1128 /TY-TS

Hà Nội, ngày 19 tháng 7 năm 2012

HƯỚNG DẪN

Thu mẫu xét nghiệm Hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm nuôi (AHPNS)

Tiếp theo công văn số 970/TY-TS ngày 21/6/2012 hướng dẫn về dấu hiệu nhận biết Hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính (Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome - AHPNS) trên tôm nuôi, để đảm bảo tính thống nhất và hiệu quả trong việc thu mẫu bệnh phẩm, Cục Thú y hướng dẫn biện pháp thu mẫu để chẩn đoán, xét nghiệm AHPNS trên tôm nuôi như sau:

Do việc thu mẫu giữ lạnh chuyển về phòng thí nghiệm không đáp ứng được cho kỹ thuật mô bệnh học. Chính vì vậy, mẫu thu phải được cố định tại chỗ hoặc có điều kiện thì vận chuyển mẫu sống về phòng thí nghiệm rồi tiến hành thu mẫu. Cơ quan tiêu hoá chủ yếu của tôm (gan tụy) rất quan trọng trong chẩn đoán bệnh nhưng lại bị phân huỷ rất nhanh ngay sau khi tôm chết. Đối với tôm đã chết hoặc đã được bảo quản trong đá (hoặc đông lạnh) thì cũng không dùng để cố định mẫu tiếp tục. Để đảm bảo chất lượng tiêu bản và tránh trường hợp chẩn đoán sai thì việc thu mẫu phải tiến hành nhanh và phải đảm bảo dung dịch cố định ngấm tốt vào mẫu vật. Vì vậy, mẫu vật phải được ngâm hoặc tiêm dung dịch cố định ngay khi vẫn còn sống.

1. Thu mẫu xét nghiệm mô bệnh học:

a) *Đối với mẫu ấu trùng (larvae) và hậu ấu trùng (postlarvae-PL):* Ngâm trực tiếp vào dung dịch cố định mẫu với tỷ lệ tối thiểu là 10 thể tích dung dịch cố định so với 1 thể tích mô tôm nhằm đảm bảo lượng dung dịch cố định ngấm tốt vào mẫu cần cố định.

b) *Đối với PL có chiều dài lớn hơn 20mm:* Dùng kéo hoặc dao rạch một đường ở phần đầu (đường giữa, mặt bụng) để dung dịch cố định dễ dàng ngấm vào khối gan tụy.

c) *Đối với các mẫu tôm từ 2g trở lên:* Tiêm dung dịch cố định trực tiếp vào phần đầu ngực và phần bụng. Số chỗ và liều lượng tiêm tùy thuộc vào kích cỡ tôm nhưng phải đảm bảo toàn bộ cơ ngấm đều với dung dịch cố định. Quan sát thấy màu sắc cơ thay đổi nhanh chóng sang màu hồng sau khi tiêm dung dịch cố định.

Thay dung dịch cố định sau 24-72 giờ bằng 70% ethanol để bảo quản trong thời gian dài.

Công thức pha 1 lít dung dịch Davidson dùng cho cố định mẫu mô học như sau:

330 ml 95% ethanol;
220 ml 100% formalin (37% formaldehyde);
115 ml acid acetic;
335 ml nước cất.

2. Thu mẫu xét nghiệm bằng kỹ thuật PCR:

Đối với mẫu tôm ấu trùng và hậu ấu trùng thu nguyên con và cố định trong dung dịch cồn 70%. Cũng giống như phương pháp mô học, thể tích cồn và mô tôm phải đảm bảo ít nhất là 10:1.

Đối với mẫu tôm từ 2g trở lên nên tách riêng phần mang, gan tụy và phân cơ.

3. Thu mẫu nuôi cấy, phân lập và định danh vi khuẩn:

Tốt nhất là chuyển mẫu tôm còn sống được chứa trong túi nylon có bơm oxy về phòng thí nghiệm. Trong trường hợp không thể vận chuyển tôm sống thì thực hiện như sau:

Vô trùng bề ngoài của tôm bằng cồn 70%, giữ trong điều kiện lạnh (2-8°C) và vận chuyển về phòng thí nghiệm càng sớm càng tốt nhưng không quá 12 tiếng (có thể tách riêng phần gan tụy cho vào eppendorf vô trùng để chuyển về phòng thí nghiệm) hoặc dùng tăm bông vô trùng lấy mẫu gan tụy hoặc máu cấy vào môi trường chuyên chở (do phòng thí nghiệm cung cấp) rồi giữ ở điều kiện lạnh (2-8°C) vận chuyển về phòng thí nghiệm trong thời gian không quá 12 tiếng

Cách thu mẫu phết trên lam kính xem sự hiện diện của vi khuẩn:

- Khử trùng bên ngoài tôm bằng cồn 70% rồi rửa lại bằng nước muối sinh lý vô trùng. Tách phần vỏ giáp đầu ngực, lấy một mẫu nhỏ mô gan tụy phết lên lam kính. Trường hợp tôm trên 5g có thể lấy một lượng nhỏ máu từ tim hoặc từ mạch máu phết trên lam kính.

- Nhuộm Gram hoặc Giemsa, quan sát sự hiện diện của vi khuẩn.

Cách thu mẫu cấy trên môi trường phân lập vi khuẩn

- Khử trùng bên ngoài tôm bằng cồn 70% rồi rửa lại bằng nước muối sinh lý vô trùng. Tách phần vỏ giáp đầu ngực, dùng que cấy hoặc tăm bông vô trùng lấy mẫu gan tụy (hoặc máu) cấy trực tiếp lên môi trường TSA hoặc TCBS (trong trường hợp cần phân lập nhóm *Vibrio*). Đối với mẫu đã cấy vào môi trường vận chuyển mang về phòng thí nghiệm cũng làm động tác tương tự.

4. Thu mẫu xét nghiệm bằng kỹ thuật kính hiển vi điện tử:

Yêu cầu thu mẫu cho phương pháp kính hiển vi điện tử là mẫu bệnh phẩm phải được ngâm dung dịch cố định tốt. Cũng giống như mẫu cho phương pháp mô học, mẫu thu cho kính hiển vi điện tử phải đảm bảo mẫu sống. Mẫu mô được cắt thành từng mảnh nhỏ khoảng 1-2 mm.

Dung dịch cố định mẫu gồm:

PBS (6,0g NaCl + 0,15g KCl + 0,1725g NaH₂PO₄ + 1,08g Na₂HPO₄ + 750 ml nước cất;

Paraformaldehyt (13,5g Paraformaldehyt + 90 ml nước cất);

120 ml Glutaraldehyde;

45g Sacharose;

Điều chỉnh pH: 7,2-7,4.

Tùy theo thể tích cần sử dụng mà các đơn chất sẽ được tính giảm hoặc tăng theo tỷ lệ. Ngoài ra mẫu cho kính hiển vi điện tử có thể cố định trong 4% glutaraldehyde pha trong cacodylate buffer.

5. Thu mẫu cho kỹ thuật sinh học phân tử Metagenomics:

Thu toàn bộ phần đầu tôm và ruột, mỗi mẫu thu từ 80 đến 100g đầu tôm. Mỗi đầu tôm được lấy và cho riêng vào một ống eppendorf 2 ml đậy kín và bọc parafilm. Phương pháp thu này mất khá nhiều thời gian vì thu và bảo quản từng cá thể. Cách khác là mẫu thu được giữ chung trong 1 chai sạch, tránh để mẫu bị thấm nhiều nước từ bên ngoài vào sẽ gây nhiễm khuẩn không mong muốn. Mẫu được bảo quản ở -20°C hoặc -80°C (nếu có điều kiện). Sau đó chuyển các mẫu thu được về phòng thí nghiệm để phân tích.

Trong quá trình thực hiện có gì vướng mắc, đề nghị liên hệ với Phòng Thú y Thủy sản - Cục Thú y, số 15/78 Giải Phóng, Đống Đa, Hà Nội, điện thoại 04-36290284, fax: 04-36290286./.

Nơi nhận:

- Như trên;
- Bộ trưởng (để b/c);
- TT. Diệp Kinh Tân (để b/c);
- TT. Vũ Văn Tám (để b/c);
- BCĐ PCDB tôm nuôi;
- Tổng cục Thủy sản;
- Vụ KHCN&MT;
- Viện NC NTTS 1, 2, 3;
- CQTY vùng I, II, III, IV, VI, VII;
- CCTY, CCTS các tỉnh ven biển;
- Lãnh đạo Cục;
- Lưu: VT, TS.

**KT. CỤC TRƯỞNG
PHÓ CỤC TRƯỞNG**

(Đã ký)

Đàm Xuân Thành