

**ỦY BAN NHÂN DÂN TỈNH ĐỒNG THÁP
TRƯỜNG CAO ĐẲNG CỘNG ĐỒNG ĐỒNG THÁP**



GIÁO TRÌNH

**MÔN HỌC: NGUYÊN LÝ VÀ KỸ THUẬT CHẨN ĐOÁN
BỆNH THUYẾT SÁN**

NGÀNH: BỆNH HỌC THUYẾT SÁN

TRÌNH ĐỘ: TRUNG CẤP

*(Ban hành kèm theo Quyết định Số: /QĐ-CD-ĐT ngày... tháng... năm 2017 của
Hiệu trưởng Trường Cao đẳng Cộng đồng Đồng Tháp)*

Đồng Tháp, năm 2017

TUYÊN BỐ BẢN QUYỀN

Tài liệu này thuộc loại sách giáo trình nên các nguồn thông tin có thể được phép dùng nguyên bản hoặc trích dùng cho các mục đích về đào tạo và tham khảo.

Mọi mục đích khác mang tính lệch lạc hoặc sử dụng với mục đích kinh doanh thiếu lành mạnh sẽ bị nghiêm cấm.

TaiLieu.vn

LỜI GIỚI THIỆU

Thuốc và hóa chất dùng trong nuôi trồng thủy sản là môn học trang bị những kiến thức cần thiết cho sinh viên ngành bệnh học thủy sản về thuốc và hóa chất. Hướng dẫn các phương pháp chẩn đoán bệnh thủy sản bao gồm: kỹ thuật quan sát và thu mẫu chẩn đoán bệnh, phương pháp chẩn đoán bệnh do vi sinh vật, phương pháp chẩn đoán bệnh ký sinh trùng, phương pháp mô bệnh học và sinh học phân tử.

Trong quá trình biên soạn nên không thể tránh khỏi những thiếu sót rất mong được sự đóng góp ý kiến của bạn đọc để Chương giảng ngày càng hoàn thiện hơn.

Xin chân thành cảm ơn!

Đồng Tháp, ngày.....tháng ... năm 2017

Chủ biên: ThS. Huỳnh Chí Thanh

TaiLieu.vn

MỤC LỤC

<i>MỤC LỤC</i>	3
<i>LỜI CẢM ƠN</i>	8
<i>GIỚI THIỆU</i>	9
<i>CHƯƠNG I: NHỮNG KIẾN THỨC TỔNG QUÁT</i>	10
I.1. SỨC KHỎE VÀ ĐỘNG VẬT THỦY SẢN	10
I.2. NHỮNG VẤN ĐỀ CHUNG TRONG CHUẨN ĐOÁN BỆNH THỦY SẢN	10
I.2.1. Sự đồng nhất trong thao tác thu, xử lý và phân tích mẫu	10
I.2.2. So sánh kết quả giữa các phòng thí nghiệm	10
I.2.2.1. Các dạng kết quả và ý nghĩa của chúng	10
I.2.2.2. Phương thức so sánh, ví dụ	11
I.2.3. Những vấn đề cần lưu ý	11
I.2.3.1. Giá trị giới hạn cho những phép phân tích	11
I.2.3.2. Tính hiệu lực của phương pháp chẩn đoán	11
I.2.3.3. Tính ổn định của phương pháp	11
I.2.3.4. Đối chứng	11
I.2.4. Phát hiện và chẩn đoán bệnh	12
I.2.4.1. Chẩn đoán lâm sàng	12
I.2.4.2. Những biện pháp sàng lọc (screening)	12
I.2.4.3. Phát hiện bệnh (detection)	12
I.2.4.4. Chẩn đoán bệnh (diagnostic)	12
I.2.4.5. Các con đường lây truyền bệnh (disease transmission)	12
I.2.5. Vai trò của chẩn đoán trong quản lý dịch bệnh thủy sản	13
I.2.6. Các mức độ trong chẩn đoán bệnh thủy sản	13
I.2.6.1. Mức 1:	13
I.2.6.2. Mức 2:	14
I.2.6.3. Mức 3:	14
I.2.7. Phân nhóm kỹ thuật phát hiện/chẩn đoán bệnh ở thủy sản	14
I.2.8. Các kỹ thuật quan sát	17
I.2.8.1. Những kỹ thuật quan sát	17
I.2.8.2. Những kỹ thuật mô học đặc biệt	17
I.2.8.3. Kỹ thuật hiển vi điện tử	17
I.2.8.4. Các kỹ thuật nuôi vi sinh vật	17
I.2.9. Các kỹ thuật huyết thanh	17
I.2.10. Các kỹ thuật phân tử	17
I.3. TÀI LIỆU THAM KHẢO CHƯƠNG 1	18
<i>CHƯƠNG II: CÁC PHƯƠNG PHÁP QUAN SÁT</i>	19
II.1. QUAN SÁT DẤU HIỆU BỆNH, MẪU GIẢI PHẪU TƯƠI VÀ MÔ BỆNH HỌC	19
II.1.1. Phương pháp quan sát dấu hiệu bệnh	19
II.1.1.1. Những vấn đề cần lưu ý khi quan sát bệnh lý thủy sản	19

II.1.1.2. Quan sát bệnh lý ở tôm.....	20
II.1.1.3. Phương pháp quan sát bệnh lý ở cá	22
II.1.2. Phương pháp quan sát mẫu giải phẫu tươi.....	25
II.1.3. Phương pháp mô học	26
II.1.3.1. Mục tiêu	27
II.1.3.2. Những điều cần lưu ý khi sử dụng phương pháp mô bệnh học:.....	27
II.1.3.3. Phương pháp mô học bao gồm các bước:.....	27
II.2. KỸ THUẬT HÓA MÔ MIỄN DỊCH	28
II.2.1. Nguyên tắc	28
II.2.2. Ứng dụng	28
II.2.3. Mẫu phân tích	29
II.2.4. Thao tác	29
II.2.5. Ưu và nhược điểm của phương pháp.....	29
II.2.5.1. Ưu điểm:	29
II.2.5.2. Nhược điểm:	30
II.3. KỸ THUẬT NUÔI VI SINH VẬT	30
II.2.1. Nuôi vi khuẩn	30
II.2.1.1. Ứng dụng	30
II.2.1.2. Phương pháp	30
II.2.1.3. Mẫu phân tích	31
II.2.1.4. Ưu và nhược điểm của phương pháp.....	31
II.2.2. Nuôi nguyên sinh động vật.....	31
II.2.2.1. Ứng dụng	31
II.2.2.2. Phương pháp	31
II.2.2.3. Mẫu phân tích	31
II.2.2.4. Ưu và nhược điểm của phương pháp.....	31
II.2.3. Nuôi vi-rút	31
II.2.3.1. Ứng dụng	31
II.2.3.2. Phương pháp	32
II.2.3.3. Mẫu phân tích	32
II.2.3.4. Đọc kết quả.....	32
II.3. TÀI LIỆU THAM KHẢO CHƯƠNG II	33
CHƯƠNG III: CÁC KỸ THUẬT HUYẾT THANH	34
III.1. PHƯƠNG PHÁP KẾT TỦA MIỄN DỊCH	34
III.1.1. Nguyên lý	34
III.1.2. Ứng dụng.....	35
III.1.3. Mẫu phân tích.....	35
III.1.4. Các dạng khuếch tán miễn dịch.....	35
III.1.4.1. Kết tủa trong môi trường lỏng.....	35
III.1.4.2. Tủa trong môi trường gel	37
III.1.4.3. Miễn dịch khuếch tán điện	38
III.1.4.4. Miễn dịch khuếch tán: Điện di với miễn dịch khuếch tán in situ.....	38
III.1.5. Ưu và nhược điểm của phương pháp	39
III.1.5.1. Ưu điểm:.....	39
III.1.5.2. Nhược điểm:	39

III.2. PHƯƠNG PHÁP NGỪNG KẾT MIỄN DỊCH.....	39
III.2.1. Nguyên lý	39
III.2.2. Xếp loại các phản ứng ngưng kết.....	40
III.2.2.1. Ngưng kết trực tiếp:	40
III.2.2.2. Ngưng kết gián tiếp:	40
III.2.2.3. Ngưng kết nhân tạo:	40
III.2.3. Ứng dụng.....	41
III.2.4. Mẫu phân tích.....	41
III.2.5. Ưu và nhược điểm của phương pháp	41
III.2.5.1. Ưu điểm:.....	41
III.2.5.2. Nhược điểm:	41
III.3. KỸ THUẬT MIỄN DỊCH HUỖNH QUANG	41
III.3.1. Nguyên lý	41
III.3.2. Phương pháp.....	42
III.3.2.1. Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang trực tiếp	42
III.3.2.2. Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang gián tiếp	42
III.3.3. Ứng dụng.....	43
III.3.4. Mẫu phân tích.....	43
III.3.5. Ưu và nhược điểm của phương pháp	43
III.3.5.1. Ưu điểm:.....	43
III.3.5.2. Nhược điểm:	43
III.4. KỸ THUẬT MIỄN DỊCH LIÊN KẾT ENZYM.....	44
III.4.1. Nguyên lý	44
III.4.2. Ứng dụng.....	45
III.4.3. Mẫu phân tích.....	45
III.4.4. Phương pháp.....	45
III.4.4.1. Kỹ thuật ELISA gián tiếp.....	45
III.4.4.2. Kỹ thuật ELISA trực tiếp	46
III.4.5. Ưu và nhược điểm của phương pháp	47
III.4.5.1. Ưu điểm:.....	47
III.4.5.2. Nhược điểm:	47
III.5. TÀI LIỆU THAM KHẢO CHƯƠNG III.....	47
CHƯƠNG 4: CÁC KỸ THUẬT PHÂN TỬ.....	48
IV.1. KỸ THUẬT PHẢN ỨNG CHUỖI TRÙNG HỢP	48
IV.1.1. Nguyên tắc	48
IV.1.1.1. Giai đoạn biến tính (denaturation):	48
IV.1.1.2. Giai đoạn lai (hybridization):.....	48
IV.1.1.3. Giai đoạn tổng hợp (hay kéo dài) (extension):	48
IV.1.2. Ứng dụng.....	49
IV.1.3. Phương pháp	50
IV.1.3.1. Ly trích DNA hay RNA từ vật chủ để sử dụng làm mạch khuôn.....	50
IV.1.3.2. Chuẩn bị	50
IV.1.3.3. Đối chứng.....	51
IV.1.4. Các hạn chế của phương pháp PCR	52
IV.1.5. Các dạng PCR	52

IV.1.5.1. PCR truyền thống.....	52
IV.1.5.2. PCR phiên mã ngược	53
IV.1.5.3. PCR thời gian thật.....	54
IV.2. KỸ THUẬT PHÂN TÍCH TÍNH ĐA DẠNG VỀ CHIỀU DÀI ĐOẠN GIỚI HẠN	54
IV.2.1. Nguyên lý	54
IV.2.2. Phương pháp	54
IV.2.3. Hệ thống phi phóng xạ DIG	55
IV.2.4. Ứng dụng của kỹ thuật lai Southern.....	56
IV.2.5. Mẫu phân tích.....	57
IV.2.6. Ưu và nhược điểm.....	57
IV.2.6.1. Ưu điểm:	57
IV.2.6.2. Nhược điểm:.....	57
IV.3. KỸ THUẬT LAI IN SITU	57
IV.3.1. Nguyên lý	57
IV.3.2. Ứng dụng.....	57
IV.3.3. Mẫu phân tích.....	57
IV.3.4. Ưu và nhược điểm của phương pháp	58
IV.3.4.1. Ưu điểm:	58
IV.3.4.2. Nhược điểm:.....	58
IV.4. TÀI LIỆU THAM KHẢO CHƯƠNG IV	58
CHƯƠNG V: MỘT SỐ QUI TRÌNH PHÁT HIỆN BỆNH Ở THỦY SẢN	59
V.1. PHÁT HIỆN VI-RÚT ĐÓM TRẮNG Ở TÔM BẰNG KỸ THUẬT PCR	59
V.1.1. Đối tượng và phạm vi áp dụng	59
V.1.2. Tài liệu tham khảo xây dựng tiêu chuẩn ngành.....	59
V.1.3. Giải thích thuật ngữ	59
V.1.4. Thiết bị, dụng cụ, môi và hóa chất	60
V.1.4.1. Thiết bị, dụng cụ.....	60
V.1.4.2. Môi, hóa chất	61
V.1.5. Chuẩn bị mẫu.....	62
V.1.5.1. Số lượng mẫu.....	62
V.1.5.2. Yêu cầu đối với mẫu để phân tích	63
V.1.6. Phương pháp tiến hành	63
V.1.6.1. Xử lý mẫu	63
V.1.6.2. Phản ứng khuếch đại PCR.....	63
V.1.6.3. Tiến hành điện di	64
V.1.7. Đọc kết quả.....	64
V.1.8. Quy định về đảm bảo an toàn	65
V.2. PHÁT HIỆN YHV VÀ GAV BẰNG KIT IQ2000 YHV/GAV	65
V.2.1. Giới thiệu.....	65
V.2.2. Thành phần	65
V.2.3. Thiết bị và hóa chất	66
V.2.4. Giới hạn phát hiện và tính nhạy.....	67
V.2.5. Chuẩn bị mẫu và ly trích RNA	67

V.2.5.1 Thao tác ly trích RNA	67
V.2.5.2. Hoà tan RNA	68
V.2.6. Qui trình khuếch đại	68
V.2.6.1. Chuẩn bị hoá chất phản ứng	68
V.2.6.2. Điều kiện phản ứng	68
V.2.6.3. Phương thức chuẩn bị phản ứng	69
V.2.7. Điện di	70
V.2.7.1. Chuẩn bị bản thạch (gel)	70
V.2.7.2. Điện di	70
V.2.7.3. Thuốc nhuộm gel và đọc kết quả.....	71
V.2.8. Đọc kết quả.....	71
V.2.9. Khắc phục sự cố kỹ thuật	73
V.3. PHÁT HIỆN VI KHUẨN Ở CÁ BẰNG PHƯƠNG PHÁP RFLP	74
V.3.1 Phương pháp thu mẫu bệnh phẩm và phân lập vi khuẩn.....	74
V.3.2 Phương pháp RFLP	74
V.3.2.1. Ly trích DNA.....	74
V.3.2.2. Cắt DNA bằng enzym giới hạn	74
V.3.2.3. Quá trình khử puria, biến tính và thẩm chuyển	75
V.3.2.4. Quá trình tiền lai và lai DNA trên màng	75
V.3.2.5. Phát hiện các vạch DNA	75
V.3.3. Xử lý thống kê	75
V.3.4. Đọc kết quả.....	76
PHỤ LỤC 1: CÁC BƯỚC THU MẪU CHẨN ĐOÁN BỆNH	77
1. Phụ lục 1a. Các bước thu mẫu chẩn đoán bệnh ở cá	77
2. Phụ lục 1b. Các bước thu mẫu chẩn đoán bệnh ở tôm	79
3. Phụ lục 1c. Các bước thu mẫu chẩn đoán bệnh ở nhuyễn thể	80
PHỤ LỤC 2: CÁC DẤU HIỆU BỆNH THƯỜNG GẶP Ở TÔM.....	83
PHỤ LỤC 3: CÁC DẤU HIỆU BỆNH THƯỜNG GẶP Ở CÁ.....	87
PHỤ LỤC 4: PHƯƠNG PHÁP NHUỘM HEMATOXYLIN VÀ PHLOXINE/EOSIN	90
1. Công thức pha thuốc nhuộm Hematoxylin và Phloxine/Eosin (H&E)	90
2. Qui trình nhuộm Mayer-Bennett Hematoxylin và Phloxine/Eosin (H&E)	90
PHỤ LỤC 5: CÔNG THỨC DUNG DỊCH DAVIDSON, S AFA CỦA HUMASON, 1972)	92
PHỤ LỤC 6: PHƯƠNG PHÁP NHUỘM NHANH PHÁT HIỆN MBV, YHV VÀ WSSV	93
A. Phát hiện MBV bằng phương pháp nhuộm Malachite Green	93
B. Phát hiện YHV bằng phương pháp nhuộm Wright - Giemsa.....	94
C. Phát hiện WSSV bằng phương pháp nhuộm Haematoxyline và Eosin.....	95

GIÁO TRÌNH MÔN HỌC

Môn học: **Nguyên lý và kỹ thuật chẩn đoán bệnh thủy sản**

Mã số môn học: TNN484

I. Vị trí, tính chất của môn học:

- Vị trí môn học: Là môn học chuyên ngành trung cấp bệnh học thủy sản. Môn học này có liên quan đến các môn học khác như: Bệnh truyền nhiễm, bệnh không truyền nhiễm. Giúp thực hiện các kỹ năng chẩn đoán bệnh được tốt hơn.

- Tính chất của môn học: Hướng dẫn các phương pháp chẩn đoán bệnh thủy sản bao gồm: kỹ thuật quan sát và thu mẫu chẩn đoán bệnh, phương pháp chẩn đoán bệnh do vi sinh vật, phương pháp chẩn đoán bệnh ký sinh trùng, phương pháp mô bệnh học và sinh học phân tử.

II. Mục tiêu môn học:

– Về kiến thức: Cung cấp cho học sinh những hiểu biết về nguyên lý, nguyên tắc và phương pháp thực hiện các kỹ thuật chẩn đoán bệnh ở động vật thủy sản.

– Về kỹ năng: Hiểu biết những kiến thức cơ bản trong chẩn đoán bệnh động vật thủy sản, Kỹ năng quan sát dấu hiệu bệnh lý lâm sàng. Kỹ năng giải phẫu và quan sát mẫu tươi

– Về năng lực tự chủ và trách nhiệm: Có khả năng nhận biết, phân tích và đánh giá các dấu hiệu bệnh lý thông qua quan sát lâm sàng và giải phẫu, Có khả năng ứng dụng một số kỹ thuật chẩn đoán bệnh động vật thủy sản trong quá trình xét nghiệm

III. Nội dung môn học:

1. Nội dung tổng quát và phân bổ thời gian

Stt	Tên chương mục	Thời gian			
		Tổng số	Lý thuyết	Thực hành, Bài tập	Kiểm tra
1	Chương 1: Các phương pháp cơ bản trong chẩn đoán bệnh thủy sản 1.1 Nguyên tắc chung 1.2 Phương pháp thu mẫu chẩn đoán bệnh	4	4		
2	Chương 2: Những kiến thức cơ bản trong chẩn đoán bệnh thủy sản 2.1 Sức khỏe động vật thủy sản 2.2 Tính hiệu lực và tính chuyên biệt của phương pháp xét nghiệm	6	5		1 LT

Stt	Tên chương mục	Thời gian			
		Tổng số	Lý thuyết	Thực hành, Bài tập	Kiểm tra
	2.3 Phát hiện và chẩn đoán bệnh 2.4 Các mức độ trong chẩn đoán bệnh thủy sản				
3	Chương 3: Kỹ thuật quan sát bệnh lý ở động vật thủy sản 3.1 Kỹ thuật quan sát dấu hiệu bệnh thủy sản 3.2 Kỹ thuật quan sát mẫu giải phẫu tươi	10	9		1 LT
4	Chương 4: Các kỹ thuật chẩn đoán bệnh thủy sản 4.1 Kỹ thuật định danh vi khuẩn gây bệnh 4.2 Kỹ thuật mô bệnh học 4.3 Kỹ thuật PCR	10	10		
	Cộng	30	28	0	2

GIỚI THIỆU

Quá trình xét nghiệm bệnh phẩm thủy sản thường có nhiều khả năng người phân tích thu được kết quả chẩn đoán là các tác nhân gây bệnh cơ hội hơn là tác nhân gây bệnh chủ yếu. Kết quả chẩn đoán bệnh phụ thuộc rất lớn vào tính sẵn có của phương pháp chẩn đoán đang được áp dụng ở phòng thí nghiệm, lĩnh vực nghiên cứu của người thực hiện việc chẩn đoán hoặc những phép chẩn đoán được phát triển trên cơ sở các loài địa phương. Nắm vững nguyên tắc của các kỹ thuật đoán và cách đọc kết quả một cách chuẩn xác có ý nghĩa rất quan trọng.

Môn học nguyên lý và kỹ thuật chẩn đoán bệnh thủy sản là môn học kỹ thuật chuyên ngành bệnh học thủy sản cung cấp cho sinh viên những hiểu biết về nguyên lý và phương pháp thực hiện các kỹ thuật chẩn đoán bệnh ở thủy sản. Đồng thời môn học cũng giới thiệu các lĩnh vực ứng dụng của các phương pháp trong chẩn đoán bệnh thủy sản. Một phương pháp có thể được ứng dụng để phát hiện/chẩn đoán nhiều mầm bệnh.

Phân thực hành của môn học cung cấp những kiến thức và kỹ năng hỗ trợ cho phân lý thuyết và cũng là cơ sở để sinh viên tiếp cận các phương pháp cơ bản trong chẩn đoán bệnh thủy sản.

Phân tài liệu tham khảo được sử dụng để xây dựng giáo trình được trình bày sau mỗi chương. Sinh viên có thể tìm thấy các tài liệu này từ trung tâm học liệu Đại học Cần thơ, thư viện Khoa Thủy sản hay tài liệu cá nhân của giảng viên.

CHƯƠNG I: NHỮNG KIẾN THỨC TỔNG QUÁT

I.1. SỨC KHỎE VÀ ĐỘNG VẬT THỦY SẢN

Khác với các vật nuôi ở trên cạn, động vật thủy sản thường đòi hỏi sự theo dõi nhiều hơn về môi trường và sức khỏe của chúng. Do sống ở dưới nước nên hoạt động của động vật thủy sản thường rất khó quan sát trừ khi chúng được bắt ra khỏi mặt nước hoặc khi bị bệnh. Động vật thủy sản lại sống trong môi trường sinh thái phức tạp và thường xuyên biến động. Thêm vào đó, thức ăn thừa, thủy sản chết và nhiều thứ khác luôn ẩn ở dưới đáy ao. Các đối tượng nuôi thủy sản rất đa dạng về loài, về môi trường sống, mức độ thâm canh của kỹ thuật nuôi và hệ thống nuôi được áp dụng. Các dạng bệnh ở động vật thủy sản cũng đa dạng và có nhiều biến đổi, trong đó có một số bệnh chưa xác định được vật chủ và có nhiều bệnh không có dấu hiệu lâm sàng riêng biệt.

Bệnh trong nuôi thủy sản thường không do một nguyên nhân riêng lẻ mà là kết quả của một loại các sự kiện/nguyên nhân có liên quan với nhau trong đó có cả sự tương tác giữa vật chủ (bao gồm các điều kiện về sinh lý, sinh sản và giai đoạn phát triển), môi trường và sự hiện diện của mầm bệnh. Sự hiện diện của một mầm bệnh trong mô tôm/cá không có nghĩa mầm bệnh đó là nguyên nhân chính gây ra bệnh. Phần lớn nguyên nhân đầu tiên gây bệnh là do những biến đổi xấu về môi trường gây tổn thương đến cơ thể hoặc làm giảm đi khả năng kháng bệnh của tôm/cá. Trong lúc đó mầm bệnh sẵn có trong môi trường sẽ nhân cơ hội này xâm nhập vào cơ thể chúng. Do vậy cần phải xem xét cả vật chủ, mầm bệnh và môi trường để xác định nguyên nhân gây bệnh nhằm có biện pháp phòng ngừa và xử lý thích hợp.

I.2. NHỮNG VẤN ĐỀ CHUNG TRONG CHUẨN ĐOÁN BỆNH THỦY SẢN

I.2.1. Sự đồng nhất trong thao tác thu, xử lý và phân tích mẫu

Thao tác thu, xử lý và phân tích mẫu là một trong những yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến kết quả của các phép chẩn đoán bệnh. Thời gian thu mẫu, khoảng cách giữa các lần thu mẫu, phương pháp cố định mẫu, nhiệt độ bảo quản mẫu, chất lượng của môi trường phân lập, thời gian sử dụng của các dung dịch hoá chất sau khi chuẩn bị, vv, đều là những vấn đề cần được cân nhắc trong quá trình phân tích mẫu. Số lần mẫu được đông lạnh rồi rã đông cũng ảnh hưởng đến kết quả phân tích. Giữa các phòng thí nghiệm và các phép phân tích được sử dụng phải đồng nhất thì kết quả đạt được mới có ý nghĩa về mặt so sánh.

I.2.2. So sánh kết quả giữa các phòng thí nghiệm

Để so sánh kết quả phân tích hay kết quả chẩn đoán từ các phòng thí nghiệm chẩn đoán bệnh thủy sản, các yếu tố sau đây cần phải được xem xét:

I.2.2.1. Các dạng kết quả và ý nghĩa của chúng

1.2.2.2. Phương thức so sánh, ví dụ:

- Mật số vi-rút so với hàm lượng kháng thể
- Giới hạn xác định kết quả dương và âm tính
- Độ nhạy của phương pháp (ví dụ như % kết quả dương tính thật trên số kết quả dương tính)
- Tính chuyên biệt (ví dụ như % kết quả âm tính thật trên số kết quả âm tính)
- Các tính toán và đọc kết quả
- Các đối chứng

1.2.3. Những vấn đề cần lưu ý

1.2.3.1. Giá trị giới hạn cho những phép phân tích

Cần phải thiết lập những giá trị giới hạn cho những phép phân tích mà kết quả thu được có tính định lượng để xác định kết quả âm tính và dương tính.

Giá trị giới hạn này sẽ ảnh hưởng đến kết quả âm tính và dương tính giả cũng như kết quả âm và dương tính thật.

1.2.3.2. Tính hiệu lực của phương pháp chẩn đoán

Một phương pháp phân tích mẫu hay thử nghiệm có tính hiệu lực là phương pháp có thể cho ra kết quả phân biệt rõ ràng giữa kết quả dương tính và âm tính hoặc giữa cá thể bị nhiễm bệnh và không bị nhiễm bệnh.

Tính hiệu lực của phương pháp biểu hiện qua hai đặc điểm là tính nhạy (khả năng xác định chính xác mẫu có nhiễm hay không) và tính chuyên biệt (khả năng phát hiện mẫu không có nhiễm bệnh).

Tính hiệu lực của phương pháp được xác định bằng cách so sánh các cá thể cùng loài trong cùng một mẫu. Trong trường hợp khác kết quả phải được kiểm định bằng các kỹ thuật mô học.

1.2.3.3. Tính ổn định của phương pháp

Một phương pháp được gọi là ổn định khi phương pháp đó cho ra kết quả tin cậy và giống nhau sau nhiều lần lặp lại. Hai yếu tố quyết định cho tính ổn định của phương pháp là: biến động giữa các cá thể phân tích và biến động giữa các lần đọc kết quả.

1.2.3.4. Đối chứng

Đối chứng phải được bố trí trong tất cả các phân tích, gồm có đối chứng dương và đối chứng âm. Lý tưởng nhất là đối chứng chuyên biệt cho loài cho tất cả các phân tích. Các xét nghiệm phân tử như trường hợp của phản ứng chuỗi trùng hợp (polymerase chain reaction-PCR) phải

có đối chứng DNA để theo dõi khả năng tạp nhiễm giữa các mẫu trong quá trình ly trích, đối chứng là DNA của vật chủ để kiểm soát khả năng khuếch đại DNA của mẫu và đối chứng PCR để kiểm soát sự tạp nhiễm trong quá trình thực hiện phản ứng.

I.2.4. Phát hiện và chẩn đoán bệnh

I.2.4.1. Chẩn đoán lâm sàng

Qua chẩn đoán lâm sàng những ảnh hưởng của bệnh được ghi nhận và mô tả, từ việc quan sát tổng quát, những thay đổi về tập tính hay hoạt động, những vết lở loét hay những vùng bị tổn thương khác ở bên ngoài cho đến những quan sát, ghi nhận và mô tả ở mức hiển vi bệnh lý của các nội quan.

I.2.4.2. Những biện pháp sàng lọc (screening)

Những biện pháp sàng lọc bao gồm tất cả những phương pháp xét nghiệm được áp dụng trên cơ thể sinh vật khoẻ nhằm để kiểm tra xem chúng có bị nhiễm những mầm bệnh truyền nhiễm có khả năng gây bệnh về sau hay không.

I.2.4.3. Phát hiện bệnh (detection)

- Xác định sự hiện diện của nhóm hay loại mầm bệnh nào đó
- Xác định mức độ cảm nhiễm (tự nhiên hoặc nhân tạo) của mầm bệnh trong mẫu phân tích

I.2.4.4. Chẩn đoán bệnh (diagnostic)

- Xác định sự hiện diện của mầm bệnh chuyên biệt ở mức loài, chủng hay các dạng biến hoá của mầm bệnh đó
- Mức độ cảm nhiễm dù ít hay nhiều của mầm bệnh qua chẩn đoán có ý nghĩa là vật chủ đang bị nguy hiểm
 - *Chẩn đoán sơ bộ (Presumptive Diagnosis)* – các chẩn đoán bước đầu dựa trên những quan sát tổng quan và những chứng cứ gián tiếp. Qua chẩn đoán sơ bộ thường thấy có nhiều tác nhân gây bệnh.
 - *Chẩn đoán xác định (Confirmatory Diagnosis)* – kết quả xét nghiệm dương tính thật của mầm bệnh với độ tin cậy của phương thức xét nghiệm cao.

I.2.4.5. Các con đường lây truyền bệnh (disease transmission)

Trong chẩn đoán và xác định nguyên nhân gây bệnh thì các con đường lây truyền bệnh thường được biết đến như là dịch tễ (epidemiology hoặc epizootiology) của bệnh đó. Những hình thức lây truyền của bệnh và các yếu tố tác động đến quá trình lây truyền bệnh (môi trường, thao tác, giai đoạn phát triển, ổ bệnh, vv.) thường phải được tìm hiểu, ghi nhận trong quá trình khảo sát, điều tra, theo dõi và nghiên cứu về bệnh.

I.2.5. Vai trò của chẩn đoán trong quản lý dịch bệnh thủy sản

Chẩn đoán có hai vai trò quan trọng trong quản lý và khống chế bệnh thủy sản. Trước hết, các kỹ thuật chẩn đoán bệnh thủy sản được ứng dụng rất hiệu quả để **sàng lọc những cá thể mang những mầm bệnh nguy hiểm nhất là trong chọn giống thủy sản hoặc chọn những cá thể khỏe mạnh để vận chuyển từ nơi này đến nơi khác**. Việc sàng lọc bệnh có hai lợi ích: (a) làm giảm rủi ro bộc phát bệnh do những cá thể mang mầm bệnh gây nên do sốc, thao tác hay do môi trường thay đổi trong quá trình vận chuyển và (b) làm giảm rủi ro lây bệnh của những cá thể mang mầm bệnh nhưng kháng được bệnh. Vai trò thứ hai của chẩn đoán bệnh là **giúp xác định nguyên nhân gây nên tình trạng sức khỏe kém hoặc những biểu hiện bất thường** về sinh sản, tăng trưởng hay hoạt động để có thể đề xuất những bước tiếp theo trong quá trình tìm ra nguyên nhân gây bệnh và đề xuất giải pháp khống chế hoặc xử lý bệnh tùy theo từng điều kiện cụ thể. Đây là vai trò trực tiếp và rõ ràng nhất của việc chẩn đoán bệnh thủy sản.

Chẩn đoán chính xác một bệnh thường được xem xét một cách không đúng là do quá phức tạp và tốn kém. Điều này có thể chỉ đúng trong trường hợp phải đối phó với những bệnh khó chẩn đoán hoặc với những bệnh mới xuất hiện. **Chẩn đoán bệnh không chỉ đơn thuần là thực hiện các xét nghiệm trong phòng thí nghiệm**. Kết quả xét nghiệm giúp xác định sự hiện diện của một mầm bệnh nào đó, hoặc có thể loại trừ sự có mặt của mầm bệnh tùy vào mức độ phát hiện của phương pháp được sử dụng. Chẩn đoán sai dẫn đến phòng và trị bệnh không hiệu quả và thậm chí là rất tốn kém. Ví dụ như có một tác nhân gây bệnh mới xuất hiện ở một vùng nuôi thủy sản trọng điểm nào đó hay đối tượng thủy sản được thả nuôi chết hàng loạt trong quá trình vận chuyển hay thao tác trong trại như chuyển ao, đóng túi để vận chuyển, vv. Việc chẩn đoán phải được thực hiện bằng những quan sát, theo dõi liên tục bắt đầu từ trại sản xuất, thật ra đây là việc cần làm trước khi bệnh xảy ra.

I.2.6. Các mức độ trong chẩn đoán bệnh thủy sản

Theo tài liệu hướng dẫn chẩn đoán bệnh ở thủy sản nuôi ở Châu Á (Asia Diagnostic guide for aquatic animal disease. FAO fisheries technical paper 402/2) thì chẩn đoán bệnh thủy sản được chia thành ba mức độ (xem chi tiết ở bảng 1) với những bước thực hiện và yêu cầu tùy theo mỗi mức độ chẩn đoán. Các mức độ chẩn đoán không có ý nghĩa từng mức độ riêng lẻ mà mang tính liên hoàn bổ sung dữ liệu và thông tin cho nhau để đạt được một chẩn đoán hoàn hảo. Mức độ 1 cung cấp những thông tin căn bản làm cơ sở cho chẩn đoán mức 2 và 3 do việc chẩn đoán ở các mức độ cao hơn chỉ có thể được xác định chính xác khi có sự liên kết với những quan sát và kết quả thu được ở những mức độ chẩn đoán thấp hơn.

I.2.6.1. Mức I:

Gồm những quan sát về trại nuôi, thông tin về sản xuất, những ghi nhận trong quá trình nuôi và việc quản lý sức khỏe. Những thông tin này cho biết về các nhân tố kích thích sự bộc phát bệnh để làm cơ sở cho mức độ chẩn đoán 2 và 3.

I.2.6.2. Mức 2:

Gồm những xét nghiệm chuyên biệt về ký sinh trùng, mô bệnh học, vi khuẩn hay nấm. Những xét nghiệm này có những yêu cầu nhất định về kinh phí cho dụng cụ, thiết bị và hoá chất cũng như đào tạo cán bộ chuyên môn. Nhìn chung chẩn đoán mức hai không thể thực hiện ở trại nuôi.

I.2.6.3. Mức 3:

Gồm những dạng chẩn đoán có tính chuyên biệt cao yêu cầu có sự đầu tư thích đáng về kinh phí cho dụng cụ, thiết bị và hoá chất cũng như đào tạo cán bộ chuyên môn. Chẩn đoán mức 3 bao gồm những kỹ thuật phân tử và kỹ thuật miễn dịch. Mặc dù hiện tại có một vài bộ kit được phát triển cho việc chẩn đoán nhanh tại các trại nuôi (mức 1) hay sử dụng trong các phòng thí nghiệm vi sinh vật và mô học (mức 2).

Một trong số các vấn đề quan trọng để đạt hiệu quả chẩn đoán cao nhất ở cả ba mức độ chẩn đoán bệnh là phải đảm bảo rằng những người làm công việc chẩn đoán ở mức 1 phải có liên lạc và biết cách liên lạc với các phòng thí nghiệm thực hiện chẩn đoán mức 2 và 3 và ngược lại các phòng thí nghiệm mức 2 và 3 cũng phải có mối liên lạc với những người thực hiện chẩn đoán mức 1. Chẩn đoán mức 3 thường cung cấp những thông tin thuần túy về mặt xét nghiệm trong phòng thí nghiệm nên cần phải có những thông tin về các điều kiện thực tế ở trại nuôi thì việc chẩn đoán mới thật sự mang lại hiệu quả thực tế.

Như vậy, chẩn đoán mức 1 là nhằm mục đích chẩn đoán bước đầu về bệnh và được xem như là cái mốc của quá trình chẩn đoán. Các chẩn đoán xác định (mức 2 và 3) chỉ có thể được thực hiện khi mà khả năng chẩn đoán bước 1 đã được thiết lập. Việc thành lập các phòng thí nghiệm cho chẩn đoán mức 2 và 3 thường là tùy thuộc vào tình hình và mức độ nghiêm trọng của dịch bệnh mà những người thực hiện việc chẩn đoán mức 1 phải đối phó và giải quyết.

I.2.7. Phân nhóm kỹ thuật phát hiện/chẩn đoán bệnh ở thủy sản

Các kỹ thuật phát hiện/chẩn đoán bệnh ở thủy sản có thể được phân nhóm theo nhiều cách dựa vào dạng mầm bệnh (ví dụ: kỹ thuật vi khuẩn, kỹ thuật vi-rút...) hoặc dựa vào phương pháp được sử dụng (ví dụ: kỹ thuật hiển vi điện tử, kỹ thuật miễn dịch...). Trong giáo trình này các kỹ thuật chẩn đoán bệnh thủy sản được chia thành 3 dạng chính dựa theo tài liệu của IAAAM (International Association of Aquatic Animal medicine, <http://www.iaaam.org>): (1) các kỹ thuật quan sát bằng mắt thường và bằng kính hiển vi; (2) các kỹ thuật huyết thanh và (3) các kỹ thuật phân tử.

Bảng 1. Các mức độ chẩn đoán bệnh và các điều kiện liên quan

Mức độ	Những việc cần làm	Kiến thức cần phải có	Người thực hiện	Yêu cầu về mặt kỹ thuật
I	Quan sát vật nuôi và môi trường Xét nghiệm lâm sàng tổng quát	Hiểu biết về phương thức cho ăn, quan sát hoạt động và sự tăng trưởng của thủy sản nuôi Thường xuyên theo dõi ao nuôi Thường xuyên ghi nhận thông tin về môi trường và những diễn biến của ao nuôi để hỗ trợ cho các chẩn đoán ở mức 2 và 3 Hiểu biết các bước cần thực hiện để liên lạc và gửi mẫu xét nghiệm mức 2 và 3 ở các PTN bệnh thủy sản.	Người nuôi thủy sản/quản đốc trại nuôi Cán bộ khuyến ngư Cán bộ hỗ trợ về ngư y Cán bộ phụ trách kỹ thuật nuôi thủy sản	Những hiểu biết về chính về quan sát thực địa Mẫu theo dõi các thông tin về trại nuôi Các dụng cụ cần thiết Mẫu quan sát lâm sàng Mẫu theo dõi ao nuôi Lưu trữ mẫu/vận chuyển mẫu đến phòng thí nghiệm phân tích mức 2 Các bước quan sát, theo dõi phát hiện bệnh. <i>Tài liệu hướng dẫn chẩn đoán bệnh thủy sản</i>
II	Ký sinh trùng Vi khuẩn Nấm Mô bệnh học	PTN được trang bị cơ bản về thiết bị và dụng cụ phục vụ cho việc phát hiện/chẩn đoán mầm bệnh cũng như cán bộ có trình độ chuyên môn về bệnh thủy sản. Lưu giữ, ghi nhận đầy đủ và duy trì bài bản và chính xác kết quả chẩn đoán. Có khả năng lưu giữ và duy trì nguồn mẫu	Cán bộ chuyên môn về sinh học thủy sản Cán bộ chuyên môn về bệnh Cán bộ chuyên môn về ký sinh trùng Cán bộ chuyên môn	Hệ thống lưu trữ mẫu Lưu trữ mẫu/vận chuyển mẫu đến phòng thí nghiệm phân tích mức 3 Thiết bị và hoá chất cho xét nghiệm mức 2 Quy trình xét nghiệm và cán bộ có trình độ xét nghiệm ở mức 2

		đạt tiêu chuẩn cho chẩn đoán mức 3. Hiểu biết sự cần thiết khi phải chẩn đoán mức 3 và cách liên lạc, chuẩn bị mẫu và chuyển mẫu để chẩn đoán mức 3	về nấm Cán bộ chuyên môn về vi khuẩn Cán bộ chuyên môn về mô bệnh học	<i>Các tài liệu hướng dẫn chẩn đoán bệnh thủy sản</i>
III	Vi-rút Hiện vi điện tử Sinh học phân tử Miễn dịch	Đòi hỏi PTN có trang bị thiết bị và dụng cụ hiện đại cũng như cán bộ kỹ thuật phải có trình độ chuyên môn cao. Lưu giữ, ghi nhận đầy đủ và duy trì bài bản và chính xác kết quả chẩn đoán. Có khả năng lưu giữ và duy trì nguồn mẫu đạt tiêu chuẩn cho các mục đích nghiên cứu Duy trì sự liên hệ với những người có trách nhiệm và các cơ quan chức năng gửi mẫu xét nghiệm.	Cán bộ chuyên môn về vi-rút Cán bộ chuyên môn về mô bệnh học Chuyên gia và kỹ thuật viên về sinh học phân tử	Thiết bị và hoá chất cho xét nghiệm mức 3 Quy trình xét nghiệm và cán bộ có trình độ xét nghiệm ở mức 3 Quy trình lưu giữ mẫu và các thao tác chuẩn hoá/đồng nhất phương pháp với các phòng thí nghiệm khác <i>Các tài liệu hướng dẫn chẩn đoán bệnh thủy sản</i> Tài liệu chẩn đoán bệnh bằng phương pháp phân tử

I.2.8. Các kỹ thuật quan sát

I.2.8.1. Những kỹ thuật quan sát

Gồm những kỹ thuật quan sát mẫu bệnh phẩm bằng mắt thường, quan sát tiêu bản tươi bằng kính hiển vi giải phẫu. Qua những thủ thuật quan sát này người chẩn đoán có thể ghi nhận những thông tin ban đầu về bệnh như các dấu hiệu lâm sàng, ký sinh trùng và tình trạng các mô của cơ thể trước và sau khi tử vong.

Mẫu cũng có thể được cố định bằng những dung dịch cố định thích hợp để quan sát bằng kỹ thuật mô bệnh học.

I.2.8.2. Những kỹ thuật mô học đặc biệt

Một số kỹ thuật mô học đặc biệt như kỹ thuật hóa mô miễn dịch hay hóa huỳnh quang miễn dịch, sử dụng các kỹ thuật miễn dịch trực tiếp trên tiêu bản mô bệnh, được sử dụng trong chẩn đoán mức 2 và 3.

I.2.8.3. Kỹ thuật hiển vi điện tử

Kính hiển vi điện tử được sử dụng ở những phòng thí nghiệm mức 3 để quan sát vi sinh vật. Qua kính hiển vi điện tử người ta có thể quan sát cấu tạo bề mặt của các vi sinh vật, hình thái bên ngoài của chúng, hoặc cấu tạo bên trong ở mức độ mô và vi mô.

I.2.8.4. Các kỹ thuật nuôi vi sinh vật

Các kỹ thuật nuôi vi sinh vật (như vi khuẩn, vi-rút, ký sinh trùng và nấm) bằng các môi trường chọn lọc chuyên cho một số mầm bệnh cũng được một số phòng thí nghiệm dùng trong chẩn đoán.

I.2.9. Các kỹ thuật huyết thanh

Gồm có những xét nghiệm sử dụng kháng thể hoặc sử dụng kháng nguyên. Những xét nghiệm sử dụng kháng thể giúp xác định đáp ứng của kháng thể vật chủ với kháng nguyên. Tuy nhiên những xét nghiệm này không có tính xác định tình trạng nhiễm bệnh. Trong khi đó những xét nghiệm sử dụng kháng nguyên giúp phát hiện những phân tử kháng nguyên bề mặt của vi sinh vật nên có vai trò trong chẩn đoán xác định.

I.2.10. Các kỹ thuật phân tử

Những kỹ thuật phân tử giúp xác định sự hiện diện của tác nhân gây bệnh bằng cách phát hiện DNA hay RNA của mầm bệnh. Các kỹ thuật này cho phép phát hiện mầm bệnh trên cả mẫu bệnh phẩm còn sống lẫn mẫu đã chết.