

TCVN 8710-xx:2025

Xuất bản lần 1

**BỆNH THỦY SẢN – QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN –
PHẦN xx: BỆNH TRẮNG ĐUÔI Ở TÔM CÀNG XANH**

Aquatic Animal Disease - Diagnostic procedure -

Infection with Macrobrachium rosenbergii nodavirus - White tail disease

HÀ NỘI – 2025

Lời nói đầu

TCVN 8710-xx:2025 được xây dựng trên cơ sở tham khảo OIE/WOAH, 2024 *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals*. Chapter 2.2.7. *Infection with Macrobrachium rosenbergii nodavirus (White tail disease)*

TCVN 8710-xxx:2024 do Trung tâm Chẩn đoán thú y Trung ương, Cục Chăn nuôi và Thú y biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Môi trường đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 8710 *Bệnh thủy sản – Quy trình chẩn đoán* gồm các phần sau đây:

- TCVN 8710-1:2011, *Phần 1: Bệnh còi do vi rút ở tôm;*
- TCVN 8710-2:2019, *Phần 2: Bệnh hoại tử thần kinh ở cá biển;*
- TCVN 8710-3:2019, *Phần 3: Bệnh đốm trắng ở tôm;*
- TCVN 8710-4:2019, *Phần 4: Bệnh đầu vàng ở tôm;*
- TCVN 8710-5:2023, *Phần 5: Hội chứng taura ở tôm;*
- TCVN 8710-6:2019, *Phần 6: Bệnh do Koi herpesvi rút ở cá chép;*
- TCVN 8710-7:2019, *Phần 7: Bệnh xuất huyết mùa xuân ở cá chép;*
- TCVN 8710-8:2023, *Phần 8: Bệnh hoại tử cơ ở tôm (IMNV);*
- TCVN 8710-9:2012, *Phần 9: Bệnh hoại tử gan tụy ở tôm;*
- TCVN 8710-10:2015, *Phần 10: Bệnh do Perkinsus marinus ở nhuyễn thể hai mảnh vỏ;*
- TCVN 8710-11:2015, *Phần 11: Bệnh do Perkinsus olseni ở nhuyễn thể hai mảnh vỏ;*
- TCVN 8710-12:2019, *Phần 12: Bệnh vi bào tử do Enterocytozoon hepatopenaei ở tôm;*
- TCVN 8710-13:2015, *Phần 13: Bệnh gan tụy do Parvovirus ở tôm;*
- TCVN 8710-14:2015, *Phần 14: Hội chứng lở loét (EUS) ở cá;*
- TCVN 8710-15:2015, *Phần 15: Bệnh nhiễm trùng do Aeromonas hydrophila ở cá;*
- TCVN 8710-16:2016, *Phần 16: Bệnh gan thận mũ ở cá da trơn;*
- TCVN 8710-17:2016, *Phần 17: Bệnh sữa trên tôm hùm;*
- TCVN 8710-19:2019, *Phần 19: Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm;*
- TCVN 8710-20:2019, *Phần 20: Bệnh hoại tử dưới vỏ và cơ quan tạo máu ở tôm;*
- TCVN 8710-21:2019, *Phần 21: Bệnh do vi khuẩn Streptococcus agalactiae ở cá;*
- TCVN 8710-22:2022, *Phần 22: Bệnh sán lá 16 móc ở cá;*
- TCVN 8710-23:2022, *Phần 23: Bệnh hoại tử cơ quan tạo máu do IHNV ở cá hồi;*
- TCVN 8710-24:2022, *Phần 24: Bệnh do sán lá Dollfustrema sp. ở cá da trơn;*
- TCVN 8710-25:2022, *Phần 25: Bệnh do ký sinh trùng Bonamia ostreae và Bonamia exitiosa ở hào.*

TCVN 8710-XX:2025

- TCVN 8710-26:2023, *Phần 26: Bệnh hoại tử cơ quan tạo máu do EHNV ở cá*
- TCVN 8710-27:2023, *Phần 27: Bệnh do vi rút Tilapia lake (TiLV) ở cá rô phi*
- TCVN 8710-28:2023, *Phần 28: Bệnh do RSIV ở cá biển*

Bệnh thủy sản – Quy trình chẩn đoán – Phần xx: Bệnh Trắng đuôi ở tôm càng xanh

Aquatic animal disease – Diagnostic procedure –

*Part xx: Infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus*

CẢNH BÁO – Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn sức khỏe thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình phát hiện bệnh trắng đuôi ở tôm càng xanh (white tail disease - WTD).

2 Thuật ngữ, định nghĩa và các từ viết tắt

2.1 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1.1

Bệnh trắng đuôi ở tôm càng xanh (WTD)

Là bệnh truyền nhiễm do tác nhân vi rút *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) gây ra, thường kết hợp với một loại vi rút vệ tinh gọi là *Extra small virus* (XSV).

2.1.2

Vi rút gây bệnh trắng đuôi ở tôm càng xanh (WTD)

Vi rút *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) là tác nhân chính gây bệnh trắng đuôi ở tôm càng xanh. Vai trò của vi rút *Extra small virus* (XSV) trong khả năng gây bệnh chưa rõ ràng.

MrNV thuộc họ *Nodaviridae*, có hình cầu đa diện không có vỏ bọc, có đường kính từ 26-27 nm, bao gồm hai chuỗi RNA đơn (ssRNA). Bộ gen của MrNV gồm hai phân tử là RNA1 và RNA2 có kích thước tương ứng là 2.9 và 1.3 kb.

XSV là thành viên của *Macrobrachium satellite virus 1* thuộc chi *Macronovirus*, trong họ *Sarothoviridae*, XSV là vi rút vệ tinh của MrNV. Là một loại RNA vi rút, mạch đơn (ssRNA), hình đa diện không có vỏ bọc, có kích thước 14-16 nm, mã hóa cho một protein vỏ có trọng lượng khoảng 17 kDa.

2.2 Các từ viết tắt

- **WTD:** *White tail disease;*
- **XSV:** *Extra small virus;*
- **MrNV:** *Macrobrachium rosenbergii nodavirus;*
- **ADN** (Deoxyribonucleic acid): *Axit deoxyribonucleic;*
- **ARN** (Ribonucleic acid): *Axit Ribonucleic;*
- **PBS** (Phosphate buffered saline): *Dung dịch muối đệm phosphat;*
- **RT-PCR** (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction):
Phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược;
- **Real-time RT-PCR** (Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction):
Phản ứng chuỗi trùng hợp phiên mã ngược thời gian thực;
- **TAE** (Tris-acetate-EDTA): *Tris-axetat-axit etylenđiamintetraaxetic;*
- **TBE** (Tris-borate-EDTA): *Tris-borat-axit etylenđiamintetraaxetic;*
- **TE** (Tris-EDTA): *Tris-axit etylenđiamintetraaxetic;*
- **Ct** (Cycle threshold): *Chu kỳ ngưỡng.*

3 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích, sử dụng nước cất, nước khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ các trường hợp có quy định khác.

3.1 Thuốc thử và vật liệu thử dùng chung

3.1.1 Ethanol, từ 70 % đến ethanol tuyệt đối

3.1.2 Dung dịch muối đệm phosphate (PBS)

3.2 Thuốc thử và vật liệu thử dùng cho phương pháp sinh học phân tử

3.2.1 Mồi và dò (primers/probe) real-time RT - PCR, gồm mồi xuôi, mồi ngược và dò

3.2.2 Mồi (primers) Nested RT-PCR, gồm mồi xuôi và mồi ngược

3.2.3 Kít nhân gen PCR

3.2.4 Kít nhân gen RT- PCR

3.2.5 Kít nhân gen Real-time RT- PCR

3.2.6 Kít tách chiết ARN

3.2.7 Thạch agarose

3.2.8 Dung dịch đệm TAE hoặc TBE (xem A.1)

3.2.9 Chất nhuộm màu, Ví dụ: Sybr safe

3.2.10 Chất đệm tải mẫu (Loading dye 6X)

3.2.11 Thang chuẩn ADN (Ladder/ Marker)

3.2.12 Dung dịch đệm TE

3.2.13 Nước tinh khiết, không có nuclease.

4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm sinh học và những thiết bị, dụng cụ sau:

4.1 Thiết bị, dụng cụ dùng chung

4.1.1 Tủ lạnh, có thể duy trì ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C

4.1.2 Tủ lạnh âm sâu, có thể duy trì ở nhiệt độ từ âm 20 °C tới âm 80 °C

4.1.3 Buồng cấy an toàn sinh học cấp 2

4.1.4 Pipet đơn kênh các loại

4.1.5 Ống đong, dung tích 100 mL; 500 mL; 1000 mL

4.1.6 Máy ly tâm, có thể hoạt động với gia tốc 2 000 *g* đến 4 000 *g* và gia tốc 12 000 *g*

4.1.7 Máy nghiền mẫu

4.1.8 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg

TCVN 8710-XX:2025

4.1.9 Dụng cụ chứa mẫu, kín, có nắp đậy, không rò rỉ, vô trùng

4.1.10 Panh, kéo, vô trùng

4.1.11 Máy ủ nhiệt, từ 0 °C đến 100 °C

4.2 Thiết bị, dụng cụ dùng cho phương pháp sinh học phân tử

4.2.1 Máy nhân gen PCR

4.2.2 Máy real-time PCR

4.2.3 Máy tách chiết ARN/ADN

4.2.4 Máy lắc trộn Vortex

4.2.5 Máy đọc sản phẩm PCR

4.2.6 Bộ điện di, gồm bộ nguồn và bể chạy điện di

4.2.7 khay đựng đá lạnh

4.2.8 Bộ khuôn và lược đổ thạch

5 Chẩn đoán lâm sàng

5.1 Đặc điểm dịch tễ

- Bệnh xuất hiện đầu tiên vào năm 1997 tại Pháp, đến nay xuất hiện ở một số nước khu vực Châu Á.
- Bệnh chủ yếu xảy ra ở tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*). Các loài giáp xác khác có thể được coi là vật chủ trung gian mang mầm bệnh như tôm thẻ chân trắng (*P. vannamei*), tôm he Nhật Bản (*P. japonicus*), tôm he Ấn Độ (*P. indicus*), tôm sú (*P. monodon*), *artemia sp.*
- Bệnh xuất hiện ở tất cả các giai đoạn nuôi của tôm, chủ yếu ở giai đoạn ấu trùng (larvae) và hậu ấu trùng (post larvae- juvenile) làm tôm có màu trắng sữa, ở tôm lớn xuất hiện màu trắng tại phần cơ bụng.
- Bệnh lây theo chiều dọc qua trứng và theo chiều ngang qua môi trường nước.
- Tỷ lệ lưu hành của bệnh từ 10 % đến 100 %.

5.2 Triệu chứng và bệnh tích

- Tôm lột xác bất thường, khả năng kiếm ăn và bơi lội ngày càng suy yếu.
- Tôm bị nhiễm bệnh có phần đuôi (cơ đuôi và cơ bụng) trở nên trắng đục do sự hoại tử mô cơ. Sự đổi màu trắng xuất hiện đầu tiên ở đốt bụng thứ hai hoặc thứ ba và dần dần lan ra cả phía trước và phía sau. Trường hợp nghiêm trọng, có thể xảy ra thoái hóa đuôi (telson) và phần phụ (uropods).

- Tôm postlarvae (PL) nhiễm MrNV có màu trắng sữa và đục hơn, tỷ lệ chết có thể lên tới 95% khi xuất hiện triệu chứng. Các mô có dấu hiệu nhiều nhất là cơ vân của bụng, đầu ngực và đuôi.

6 Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

6.1 Lấy mẫu

Số lượng tôm trên mỗi mẫu phụ thuộc vào kích cỡ của tôm:

- Tôm giống, ấu trùng và hậu ấu trùng: Lấy nguyên con, từ 01 đến 03 gram/mẫu.
- Tôm thương phẩm: Lấy nguyên con, từ 5 con/mẫu đến 10 con/mẫu hoặc lấy mang, cơ đầu, cơ bụng, chân bơi và cơ đuôi của 5 con/mẫu đến 10 con/mẫu
- Tôm bố mẹ: Lấy nguyên con 1 con/mẫu hoặc lấy mang, chân bơi, cơ đuôi của 1 con/mẫu

Thu mẫu tôm có dấu hiệu bệnh lý, còn sống hoặc mới chết. Mẫu bệnh phẩm được lấy và để riêng biệt trong dụng cụ chứa mẫu (4.1.9).

Tất cả các mẫu phải được dán nhãn, ghi kí hiệu và gửi kèm theo phiếu gửi mẫu bệnh phẩm và thông tin dịch tễ của mẫu.

6.2 Bảo quản mẫu

Bảo quản vận chuyển: Bảo quản mẫu ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C không quá 48 h từ khi lấy mẫu đến khi vận chuyển về phòng thí nghiệm hoặc bảo quản trong ethanol từ 70 % với tỉ lệ 1:10 (mẫu : ethanol).

Bảo quản tại phòng thí nghiệm: Mẫu được được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C chuyển đến phòng thí nghiệm chưa phân tích ngay phải được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C đến âm 80 °C hoặc được bảo quản trong dung dịch PBS (3.1.2) theo tỉ lệ 1:10 (mẫu : PBS) ở nhiệt độ âm 20 °C đến âm 80 °C hoặc bảo quản trong ethanol từ 70 %.

6.3 Chuẩn bị mẫu

Dùng panh, kéo (4.1.10) vô trùng để thực hiện các thao tác: tách, cắt lấy mẫu (mang , cơ đầu, cơ bụng, chân bơi và cơ đuôi). Mẫu được chia thành hai phần: một phần cho thực hiện xét nghiệm và một phần lưu trữ.

Cho mẫu vào dung dịch PBS (3.1.2) theo tỷ lệ 1:10 (mẫu : PBS), đồng nhất mẫu bằng máy nghiền mẫu (4.1.7) hoặc bằng cối, chày nghiền mẫu để tạo thành huyền dịch 10 %. Chuyển huyền dịch vào 2 ống vô trùng đóng nắp, một ống mẫu để xét nghiệm và một ống lưu mẫu.

CHÚ Ý: Với mẫu đã bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C đến âm 80 °C cần rã đông ngoài nhiệt độ phòng trước khi thực hiện đồng nhất mẫu.

6.4 Tách chiết ARN

Sử dụng bộ kit tách chiết (3.2.6) thích hợp và an toàn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví dụ: Sử dụng kit tách chiết ARN: InviMAG®Virus DNA/RNA Mini Kit/ KF96, Cat. No: 7441050100 (xem phụ lục B1) hoặc sử dụng kit tách chiết TACO RNA/DNA extraction Kit (GeneReach Cat. No. atc-d/rna, 320 tests (xem phụ lục B2) hoặc PureLink Viral RNA/DNA mini kit (50) (Cat. No: 12280-050) xem phụ lục B3)¹⁾

6.5 Phương pháp RT- PCR và Nested RT- PCR

6.5.1 Chuẩn bị môi

Phương pháp RT-PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu MrNV2-F/ MrNV2-R hoặc XSV2-F/ XSV2-R (3.2.2) để phát hiện MrNV và XSV ở tôm postlarvae (PL) thu thập từ các ổ dịch nghi ngờ bị bệnh trắng đuôi ở tôm càng xanh. Trình tự cặp mồi (xem phụ lục C, Bảng C1).

Phương pháp Nested RT- PCR sử dụng cặp mồi bước 1: MrNV2-F/ MrNV2-R hoặc XSV2-F/ XSV2-R và cặp mồi bước 2: MrNV3-F/ MrNV3-R hoặc XSV3-F/ XSV3-R để phát hiện sàng lọc MrNV và XSV ở tôm giống và tôm bố mẹ. Trình tự cặp mồi (xem phụ lục D, Bảng D1).

Môi được chuẩn bị như sau:

- Môi ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy ly tâm (4.1.6) trong 30 s để môi lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Dùng dung dịch đệm TE (3.2.12) để hoàn nguyên môi ở nồng độ 100 µM làm gốc.
- Môi được sử dụng ở nồng độ 20 µM: Pha loãng môi gốc bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.13) (20 µl môi gốc và 80 µl nước tinh khiết không có nuclease).

6.5.2 Tiến hành phản ứng RT- PCR và Nested RT- PCR

Phản ứng RT- PCR được thực hiện trong máy nhân gen PCR (4.2.1) sử dụng cặp mồi MrNV2-F/ MrNV2-R hoặc XSV2-F/ XSV2-R, sử dụng kit nhân gen (3.2.4) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (xem phụ lục C)

Phản ứng Nested RT- PCR được thực hiện trong máy nhân gen PCR (4.2.1) sử dụng cặp mồi bước 1: MrNV2-F/ MrNV2-R và XSV2-F/ XSV2-R và cặp mồi bước 2: MrNV3-F/ MrNV3-R và XSV3-F/ XSV3-R (3.2.2), sử dụng kit nhân gen (3.2.3 và 3.2.4) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (xem phụ lục D)

6.5.3 Điện di

6.5.3.1 Chuẩn bị bản thạch

¹⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

Pha thạch agarose với nồng độ (3.2.7) từ 1,5 % đến 2 % bằng dung dịch đệm TBE 1X hoặc TAE 1X (3.2.8) vào chai thủy tinh 250 ml, lắc đều rồi đun sôi;

Khi nhiệt độ giảm xuống khoảng 40 °C đến 50 °C thì bổ sung 10 µl chất nhuộm màu (3.2.9) vào mỗi 100 ml thạch. Lắc nhẹ tránh tạo bọt để chất nhuộm màu tan đều.

Tiến hành đổ thạch vào khay điện di đã được cài lược; không nên đổ bản thạch dày quá 0,8 cm.

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

Chuyển bản thạch vào bể điện di (4.2.6), đổ dung dịch đệm (TBE 1X hoặc TAE 1X) cùng loại với dung dịch pha agarose đã đun vào bể điện di cho tới khi ngập bản thạch.

CHÚ THÍCH: Có thể dùng các sản phẩm có sẵn chất nhuộm ADN để pha chế thạch agarose (VÍ DỤ: Sybr safe DNA gel stain và sử dụng theo quy định của nhà sản xuất).

6.5.3.2 Chạy điện di

Hút 2 µl chất đệm tải mẫu (Loading dye 6X) (3.2.10) vào 8 µl sản phẩm PCR trộn đều và cho vào các giếng trên bản thạch. Thực hiện điện di trong bộ điện di, chạy kèm theo thang chuẩn ADN (3.2.11) để so sánh kích thước sản phẩm khuếch đại. Hút 10 µl thang chuẩn ADN (3.2.11) vào một giếng trên bản thạch.

Điện di ở hiệu điện thế 100 V trong thời gian 30 min.

6.5.4 Đọc kết quả

Sau khi điện di, đọc kết quả trên máy đọc sản phẩm PCR (4.2.5).

Điều kiện của phản ứng được công nhận khi:

- Đối chứng âm không có vạch sáng (không có sản phẩm khuếch đại);
- Đối chứng dương có vạch sáng kích thước như sau:: 425 bp hoặc 546 bp hoặc 205 bp hoặc 236 bp
- Thang chuẩn ADN sáng và chia vạch rõ ràng

Với điều kiện phản ứng trên kết quả được giải thích theo bảng sau:

CHÚ THÍCH:

- Trong trường hợp mẫu dương tính yếu, có thể không phát hiện được sản phẩm của bước 1.
- Khi xét nghiệm, cần tiến hành xét nghiệm riêng từng tác nhân gây bệnh.

6.6 Phương pháp real-time RT - PCR

6.6.1 Chuẩn bị mẫu

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy real-time PCR (4.2.2) theo phương pháp real-time RT-PCR khuếch đại đoạn gen đặc hiệu của vi rút MrNV sử dụng cặp mồi MrNV4-F / MrNV4 -R và đoạn dò Taqman MrNV4-P (3.2.1), vi rút XSV sử dụng cặp mồi XSV4-F/ XSV4 8-R và đoạn dò Taqman XSV4 - P. Trình tự cặp mồi được nêu trong Bảng Trình tự cặp mồi (xem phụ lục D, Bảng D1).

Mẫu được chuẩn bị như sau:

- Mẫu ở trạng thái đông khô phải được ly tâm nhanh bằng máy ly tâm (4.1.6) trong 30 s để mẫu lắng xuống đáy ống trước khi mở và hoàn nguyên. Khi hoàn nguyên, nên dùng dung dịch đệm TE (3.2.12) để hoàn nguyên mẫu ở nồng độ 100 µM làm gốc.
- Mẫu được sử dụng ở nồng độ 20 µM: pha loãng mẫu gốc bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.13) (20 µl mẫu gốc và 80 µl nước tinh khiết không có nuclease).
- Đoạn dò Taqman IMNV-p1 sử dụng nồng độ 10 µM: pha loãng đoạn dò bằng nước tinh khiết không có nuclease (3.2.13) (10 µl mẫu gốc và 90 µl nước tinh khiết không có nuclease)

6.6.2 Tiến hành phản ứng real-time RT - PCR

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy real-time PCR (4.2.2) theo phương pháp real-time RT-PCR sử dụng cặp mồi MrNV4-F / MrNV4 -R đầu dò MrNV4-P phát hiện vi rút MrNV, cặp mồi XSV4-F/ XSV4 8-R dò Taqman XSV4 –P phát hiện vi rút XSV. Sử dụng kit nhân gen real-time RT-PCR (3.2.5) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6.6.3 Đọc kết quả

Điều kiện của phản ứng được công nhận khi:

- Mẫu đối chứng âm phải cho kết quả âm tính (không có giá trị Ct).
- Mẫu đối chứng dương phải cho kết quả dương tính và có giá trị Ct so với giá trị Ct của mẫu đã được chuẩn độ trước đó có khoảng giá trị Ct = ± 2

Với điều kiện phản ứng như trên:

- 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.

CHÚ Ý:

- Những mẫu nghi ngờ, cần được thực hiện xét nghiệm lại hoặc sử dụng phương pháp xét nghiệm tương đương khác để khẳng định kết quả.
- Phản ứng real-time RT- PCR phải bao gồm: mẫu kiểm tra, mẫu kiểm chứng dương và mẫu kiểm chứng âm;
- Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng real-time RT- PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng.

7 Kết luận

Tôm càng xanh được xác định bị bệnh trắng đuôi khi có các đặc điểm dịch tễ học, triệu chứng lâm sàng, bệnh tích của bệnh và có kết quả dương tính với MrNV bằng phương pháp real-time RT- PCR và kết quả dương tính với MrNV bằng phương pháp RT- PCR hoặc nested RT PCR.

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị thuốc thử

A.1 Dung dịch đệm TAE 1X hoặc TBE 1X

A.1.1 Thành phần

Dung dịch TAE (hoặc TBE) 10X: 100 ml

Nước khử ion: 900 ml

Tổng: 1000 ml dung dịch TAE (TBE) 1X

A.1.2 Chuẩn bị

Lấy 100 ml dung dịch TAE (TBE) 10X hoà chung với 900 ml nước khử ion, khuấy và lắc đều.

Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

A.2 Dung dịch muối đệm phosphat (PBS)

A.2.1 Thành phần

Natri clorua (NaCl) 8 g

Natri hydro photphat dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2,9 g

Kali dihydro photphat (KH_2PO_4) 0,2 g

Kali clorua (KCl) 0,2 g

Nước cất 1000 ml

A.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trên vào 1000 ml nước cất, khuấy và lắc đều.

Chỉnh pH về trung tính bằng dung dịch NaOH 1N hoặc dung dịch HCl 1N. Hấp vô trùng ở 121 °C trong 30 min.

Phụ lục B

(Tham khảo)

Quy trình tách chiết ARN

CẢNH BÁO: Việc tách chiết ARN có sử dụng hoá chất nguy hiểm và có khả năng gây hại nếu thao tác không cẩn thận. Do vậy, nên tránh tiếp xúc trực tiếp với da và hít phải hơi của các hoá chất này. Luôn luôn đeo găng tay, khẩu trang, mặc quần áo bảo hộ khi thực hiện các thao tác này.

B1. Tách chiết ARN bằng bộ kit InviMAG®Virus DNA/RNA Mini Kit/ KF96**B1.1. Chuẩn bị hóa chất**

Các hóa chất cần được chuẩn bị và bảo quản theo đúng hướng dẫn của bộ kit 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 ADN/ARN Elution Buffer (EB)

Nếu chiết tách RNA 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.

B1.2. Tiến hành

- Hủy 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 min.

- 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 (HLC-MHR23). Lắc đĩa với gia tốc 750rpm/15 min, nhiệt độ 65 °C.

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

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

- Bảo quản mẫu ARN ở 4 °C trong vài giờ và âm 20 °C đến âm 80 °C trong thời gian lâu hơn.

B.2. Tách chiết ADN bằng TACO RNA/DNA extraction Kít

B.2.1 Vật liệu: Bộ kit chiết tách TACO RNA/DNA extraction Kít (GeneReach Cat. No. atc-d/rna, 320 tests)

Ethanol tuyệt đối

B.2.2 Chuẩn bị:

- Pha dung dịch đệm rửa A (washing buffer A) với 135 ml ethanol tuyệt đối

- Pha dung dịch đệm rửa B (washing buffer B) với 230 ml ethanol tuyệt đối

- Tiến hành theo sơ đồ

Thuốc Thử	Lượng (μl)	Thuốc thử	Lượng (μl)		H	G	F	E	D	C	B	A
Ethanol tuyệt đối	200	–	–	►1								
Dung dịch đệm rửa A	750	Hạt từ	50	►2								
Dung dịch đệm rửa A	750	–	–	►3								
Dung dịch đệm rửa B	750	–	–	►4								
Dung dịch đệm rửa B	750	–	–	►5								
Nước đệm	100	–	–	►6								
Ethanol tuyệt đối	200	–	–	►7								
Dung dịch đệm rửa A	750	Hạt từ	50	►8								
Dung dịch đệm rửa A	750	–	–	►9								
Dung dịch đệm rửa B	750	–	–	►10								
Dung dịch đệm rửa B	750	–	–	►11								
Nước đệm	100	–	–	►12								

B.2.3 Chuẩn bị mẫu:

- Cho 250 µL/mẫu dung dịch đệm vào các ống eppendort.
- Cho 100 µL/mẫu vào ống eppendort chứa dung dịch đệm.
- Lắc bằng máy lắc trộn vortex (4.2.4) trong 15 s.
- Ly tâm 12000 g trong 1 min.
- Cho 350 µL (mẫu và dung dịch đệm) vào các giếng ở cột 1 hoặc 7.

B.2.4 Đưa mẫu vào máy TACO

- Đặt đĩa vào máy TACO
- Đặt lược vào máy TACO.
- Sử dụng máy TACO theo hướng dẫn sử dụng: Máy TACO tự động chiết tách trong khoảng 50 min.
- Thu 100 µL ADN từ các giếng trong cột 6 hoặc 12 sang các ống eppendort mới.

CHÚ Ý: Mẫu đối chứng âm và mẫu đối chứng dương đều được tách chiết ARN trong cùng thời điểm với mẫu cần phát hiện

B.3. Tách chiết ARN bằng bộ kit Invitrogen PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit**B.3.1. Chuẩn bị hoá chất**

Các hóa chất cần được chuẩn bị và bảo quản theo đúng hướng dẫn của bộ kit Invitrogen PureLink Viral RNA/DNA mini Kit, Cat. No: 12280-050, với thể tích vừa đủ cho số lượng mẫu chiết tách, bao gồm:

- Proteinase K
- Dung dịch đệm Lysis Buffer
- Dung dịch Carrier RNA
- Dung dịch Wash buffer (W5)
- Nước RNase-free (E3)
- Cách pha hỗn hợp dung dịch Carrier và Lysis Buffer

$$N \times 0.21 \text{ mL} = A \text{ mL}$$

$$A \text{ mL} \times 28 \text{ µL/mL} = B \text{ µL}$$

Trong đó: N là số mẫu cần tách chiết

A là tổng số mL Lysis Buffer cần cho N mẫu;

B là tổng số µL Carrier RNA cần cho N mẫu.

B.3.2. Tiến Hành

1. Cho 25 μ L Proteinase K vào ống eppendorf 1,5 ml;
2. Cho 200 μ L mẫu vào ống eppendorf chứa Proteinase K;
- CHÚ Ý: nếu thể tích mẫu <200 μ L thì có thể điều chỉnh thể tích mẫu cho đủ 200 μ L bằng dung dịch PBS hoặc 0.9 % NaCl.
3. Cho hỗn hợp dung dịch Lysis Buffer và Carrier RNA vào ống chứa mẫu; đóng nắp ống và vortex 15s;
4. Ủ mẫu ở 56 °C trong 15 min;
5. Cho thêm 250 μ L ethanol 96 % đến ethanol tuyệt đối vào ống mẫu; đóng nắp và vortex 15 s;
6. Để ở nhiệt độ phòng 5 min;

CHÚ Ý: mẫu mô sau khi để ở nhiệt độ phòng 5 min thì đem ly tâm 12.000 vòng trong 2 min và lấy dịch nổi bên trên.

7. Chuyển toàn bộ mẫu tách chiết vào cột lọc;
8. Ly tâm cột lọc ở 12.000 vòng trong 2 min đến 3 min; chuyển cột lọc sang ống thu mới;
9. Cho 500 μ L nước rửa Wash buffer (W5) vào cột lọc; ly tâm 12.000 vòng trong 2 min đến 3 min; Chuyển cột lọc sang ống thu mới;
10. Lặp lại bước 9 với 500 μ L nước rửa Wash buffer (W5) một lần nữa;
11. Loại bỏ ống thu và chuyển cột lọc sang ống thu mới;
12. Ly tâm khô 12000 vòng trong 1 min cho khô sạch nước rửa W5;
13. Chuyển cột lọc sang ống eppendorf 1,5 μ L;
14. Cho 10 - 50 μ L nước RNase-free (E3) (có sẵn) vào cột lọc;
15. Để ở nhiệt độ phòng 1 min; Ly tâm cột lọc ở 12000 vòng trong 1 min đến 2 min.
16. Lấy sản phẩm dưới cột lọc; Bảo quản mẫu ARN ở 4 °C trong vài giờ và âm 20 °C đến âm 80 °C trong thời gian lâu hơn.

Phụ lục C

(Quy định)

Phương pháp RT - PCR phát hiện vi rút gây bệnh trắng đuôi ở tôm càng xanh**C.1 Trình tự cặp mồi****Bảng C.1 – Trình tự cặp mồi** ^[4,5,6]

Vi rút đích	Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm
MrNV	MrNV2-F	GCG-TTA-TAG-ATG-GCA-CAA-GG	425 bp
	MrNV2-R	AGC-TGT-GAA-ACT-TCC-ACT-GG	
XSV	XSV2-F	CGC-GGA-TCC-GAT-GAA-TAA-GCG-CAT-TAA-TAA	546 bp
	XSV2-R	CCG-GAA-TTC-CGT-TAC-TGT-TCG-GAG-TCC-CAA	

C.2 Thực hiện phản ứng RT – PCR

Kỹ thuật RT-PCR một bước:

Chuẩn bị dung dịch cho phản ứng sử dụng cặp mồi MrNV2-F/ MrNV2-R hoặc XSV2-F/ XSV2-R đã được chuẩn bị (3.2.2) và kit nhân gen (3.2.4) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

VÍ DỤ: Chuẩn bị MasterMix cho phản ứng RT-PCR theo kit SuperScript® III One-Step RT-PCR with Platinum® Taq. Cat: 12574-026³⁾ hoặc kit tương đương theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thành phần cho 1 phản ứng (xem bảng C.2).

Bảng C.2 – Thành phần phản ứng RT - PCR

Thành phần	Nồng độ (μM)	Thể tích cho 1 phản ứng (μl)
Nước không có ARN/DNA		6
Dung dịch 2x Reaction Mix		12,5
Mồi xuôi	20	0,5
Mồi ngược	20	0,5
Enzyme		0.5
Tổng thể tích dung dịch đệm thực hiện phản ứng		20

Chuyển 20 μl hỗn hợp nhân gen vào mỗi ống phản ứng:

Mẫu đối chứng dương: Cho 5 μl mẫu ARN đã được giám định hoặc sử dụng các chủng chuẩn.

Mẫu đối chứng âm: Cho 5 μl nước tinh khiết không có nuclease.

³⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương

Mẫu thử: Cho 5 µl mẫu kiểm tra vào ống phản ứng.

Tiến hành phản ứng RT - PCR bằng máy nhân gen (4.2.1) đã cài đặt chu trình nhiệt (xem Bảng C.3).

Bảng C.3 – Chu trình nhiệt của phản ứng RT - PCR

Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ (vòng)
50	30 min	1
94	2 min	1
94	15 s	40
55	30 s	
68	60 s	
68	5 min	1

CHÚ Ý:

- + Phản ứng RT- PCR phải bao gồm: mẫu kiểm tra, mẫu kiểm chứng dương (mẫu chiết tách và mẫu chạy nhân gen) và mẫu kiểm chứng âm (mẫu chiết tách và mẫu chạy nhân gen);
- + Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng RT - PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng;
- + Tùy theo kit sử dụng mà thành phần hỗn hợp phản ứng có thể khác nhau, việc thực hiện chuẩn bị hỗn hợp phản ứng nên tuân thủ theo hướng dẫn của kit được sử dụng.

Phụ lục D

(Quy định)

Phương pháp Nested RT - PCR phát hiện vi rút gây bệnh trắng đuôi ở tôm càng xanh**D.1 Trình tự cặp mồi****Bảng D.1 – Trình tự cặp mồi** ^[4,5,6]

Vi rút đích	Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm
Bước 1: One step RT-PCR (Sahul Hameed et al., 2004a, b; Sudhakaran et al., 2007a)			
MrNV	MrNV2-F	GCG-TTA-TAG-ATG-GCA-CAA-GG	425 bp
	MrNV2-R	AGC-TGT-GAA-ACT-TCC-ACT-GG	
XSV	XSV2-F	CGC-GGA-TCC-GAT-GAA-TAA-GCG-CAT-TAA-TAA	546 bp
	XSV2-R	CCG-GAA-TTC-CGT-TAC-TGT-TCG-GAG-TCC-CAA	
Bước 2: Nested RT-PCR (Sudhakaran et al., 2007a)			
MrNV	MrNV3-F	GAT-GAC-CCC-AAC-GTT-ATC-CT	205 bp
	MrNV3-R	GTG-TAG-TCA-CTT-GCA-AGA-GG	
XSV	XSV3-F	ACA-TTG-GCG-GTT-GGG-TCA-TA	236 bp
	XSV3-R	GTG-CCT-GTT-GCT-GAA-ATA-CC	

D.2 Thực hiện phản ứng Nested RT – PCR**Phương pháp Nested RT – PCR bao gồm 2 bước:**

Bước 1: Phản ứng RT-PCR (xem phụ lục C)

Bước 2: Phản ứng Nested RT-PCR

Chuẩn bị dung dịch cho phản ứng sử dụng cặp mồi MrNV3-F / MrNV3-R hoặc XSV3-F/XSV3-R đã được chuẩn bị (3.2.2) và kit nhân gen (3.2.3) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

VÍ DỤ: Chuẩn bị Master mix cho phản ứng Nested RT-PCR theo kit Thermo Scienetific Dream Taq PCR Master Mix (2X), Cat. No: K 1071⁴⁾ hoặc kit tương đương theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Thành phần cho 1 phản ứng (xem bảng D.4).

Bảng D.4 – Thành phần phản ứng Nested RT - PCR

Thành phần	Nồng độ (μM)	Thể tích cho 1 phản ứng (μl)
Nước không có ARN/DNA		6,5

⁴⁾ Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

Dung dịch Master Mix 2X		12,5
Mồi xuôi	20	0,5
Mồi ngược	20	0,5
Tổng thể tích dung dịch đệm thực hiện phản ứng		20

Chuyển 20 µl hỗn hợp nhân gen vào mỗi ống phản ứng:

Mẫu đối chứng dương: Cho 3 µl mẫu cDNA là sản phẩm bước 1.

Mẫu đối chứng âm: Cho 3 µl nước tinh khiết không có nuclease.

Mẫu thử: Cho 3 µl mẫu sản phẩm của phản ứng RT - PCR tại bước 1 vào ống phản ứng.

Tiến hành phản ứng Nested RT - PCR bằng máy nhân gen (4.2.1) đã cài đặt chu trình nhiệt (xem Bảng D.4).

Bảng D.4 – Chu trình nhiệt của phản ứng Nested RT - PCR

Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ (vòng)
95	2 min	1
95	30 s	30
55	30 s	
72	60 s	
72	10 min	1

CHÚ Ý:

+ Phản ứng Nested RT- PCR phải bao gồm: mẫu kiểm tra, mẫu kiểm chứng dương (mẫu chiết tách và mẫu chạy nhân gen) và mẫu kiểm chứng âm (mẫu chiết tách và mẫu chạy nhân gen);

+ Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng Nested RT - PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng;

+ Tùy theo kit sử dụng mà thành phần hỗn hợp phản ứng có thể khác nhau, việc thực hiện chuẩn bị hỗn hợp phản ứng nên tuân thủ theo hướng dẫn của kit được sử dụng.

Phụ lục E

(Quy định)

Phương pháp Real-time RT - PCR phát hiện vi rút gây bệnh trắng đuôi ở tôm càng xanh**E.1 Trình tự cặp mồi****Bảng E.1 – Trình tự cặp mồi ^[10]**

Gen đích	KH mồi, mẫu dò	Trình tự mồi từ đầu 5' tới 3'
MrNV	MrNV4-F	CAACTCGGTATGGAACTCAAGGT
	MrNV4 -R	AGGAAATACACGAGCAAGAAAAGTC
	MrNV4-P	FAM- ACCCTTCGACCCCAGCAATGGTG -TAMRA
XSV	XSV4-F	AGCCCACTCTCGCATCTGA
	XSV4 8-R	CTCCAGCAAAGTGCGATACG
	XSV4 -P	FAM- CATGCCCCATGATCCTCGCA- TAMRA

E.2 Thực hiện phản ứng real-time RT - PCR

Phương pháp real-time RT - PCR bao gồm:

Chuẩn bị dung dịch cho phản ứng sử dụng cặp mồi và dò phát hiện vi rút MrNV (MrNV4-F/R/P) hoặc XSV (XSV4-F/R/P) đã được chuẩn bị (3.2.1) và kit nhân gen realtime RT - PCR (3.2.5) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ví DỤ: theo kit Quanta Bio- qScript TMXLT 1 step RT-qPCR ToughMix hoặc kit tương đương theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Thành phần cho 1 phản ứng (xem bảng E.2).

Bảng E.2 – Thành phần phản ứng real-time RT - PCR

STT	Thành phần	Nồng độ (μM)	Thể tích cho 1 phản ứng (μl)
1	Nước không có RNA/ADN		5.5
2	Dung dịch 2X reaction mix		10
3	Mồi xuôi	20	0,5
4	Mồi ngược	20	0,5
5	Đoạn dò	10	0,5

Tổng thể tích dung dịch đệm thực hiện phản ứng**17**

Chuyển 20 µl hỗn hợp nhân gen vào mỗi ống phản ứng:

Mẫu đối chứng dương: Cho 3 µl mẫu ARN đã được giám định hoặc sử dụng các chủng MrNV và XSV chuẩn.

Mẫu đối chứng âm: Cho 3 µl nước tinh khiết không có nuclease.

Mẫu thử: Cho 3 µl mẫu ARN kiểm tra vào ống phản ứng.

Tiến hành phản ứng real-time RT - PCR bằng máy real-time PCR (4.2.2) đã cài đặt chu trình nhiệt được nêu trong bảng E.3.

Bảng E.3 – Chu trình nhiệt của phản ứng real-time RT - PCR

Nhiệt độ, °C	Thời gian	Số chu kỳ (vòng)
50	10 min	01
95	01 min	01
95	10 s	40
60(*)	30 s	
Giữ ở 4 °C đến khi tắt máy		

CHÚ Ý:

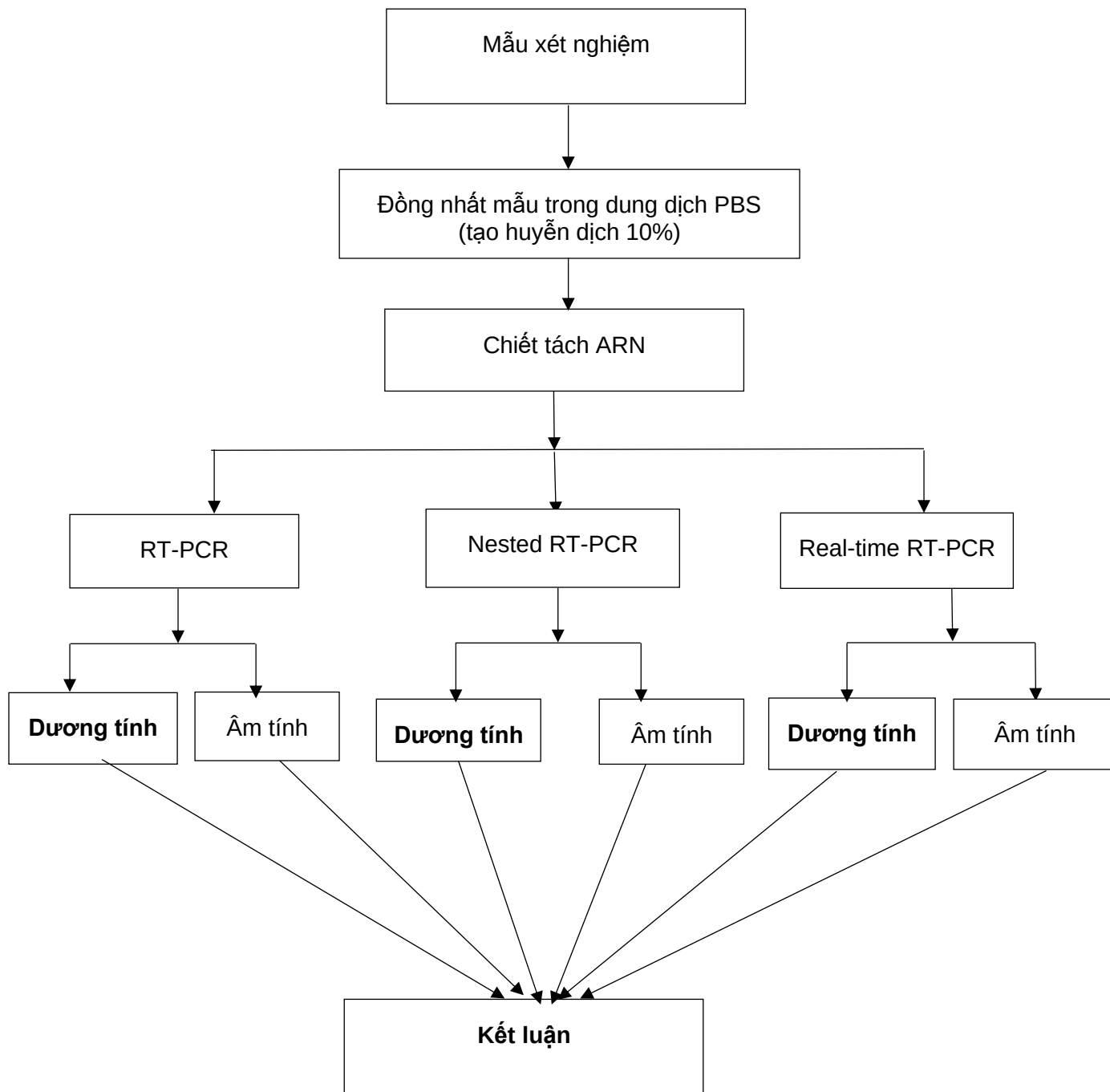
+ Phản ứng real-time RT - PCR phải bao gồm: mẫu kiểm tra, mẫu kiểm chứng dương (mẫu chiết tách và mẫu chạy nhân gen) và mẫu kiểm chứng âm (mẫu chiết tách và mẫu chạy nhân gen);

+ Mẫu và nguyên liệu cho phản ứng real-time RT - PCR cần đặt trong khay đá lạnh trong suốt quá trình chuẩn bị hỗn hợp phản ứng;

+ Tùy theo kit sử dụng mà thành phần hỗn hợp phản ứng có thể khác nhau, việc thực hiện chuẩn bị hỗn hợp phản ứng nên tuân thủ theo hướng dẫn của kit được sử dụng.

Phụ lục F

(Quy định)

Sơ đồ xét nghiệm vi rút MrNV và XSV

Thư mục tài liệu tham khảo

1. OIE. (2024). Chapter 2.2.7 Infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (White tail disease).
2. Tripathy S, P. K. Sahoo, Jkumari., B.K. Mishra., N. Sarangi., S. Ayyappan. Multiplex RT-PCR detection and sequence comparison of viruses MrNV and XSV associated with white tail disease in *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 258 (1-4):134-139.
3. Sri Widada J. & Bonami J.R. (2004). Characteristics of the monocistronic genome of extra small virus, a virus-like particle associated with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus: possible candidate for a new species of satellite virus. *Journal of General Virology* 85, 643–646.
4. Sudhakaran R., Syed Musthaq S., Haribabu P., Mukherjee S.C., Gopal C. and Sahul Hameed A.S. (2004a). Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 257 (1-4), 136-141.
5. Sahul Hameed A.S., Yoganandhan K., Sri Widada J. & Bonami J.R. (2004b). Studies on the occurrence of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *M. rosenbergii* in India by RT-PCR detection. *Aquaculture*, 238, 127–133.
6. Sudhakaran R., Ishaq Ahmed V.P., Haribabu P., Mukherjee S.C., Sri Widada J., Bonami J.R. & Sahul Hameed A.S. (2007a). 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.*, 30, 27–35.
7. Sudhakaran R., Parameswaran V. & Sahul Hameed A.S. (2007b). In vitro replication of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus (XSV) in C6/36 mosquito cell line. *J. Virol. Methods*, 146, 112–118.
8. Sudhakaran R., Syed Musthaq S., Haribabu P., Mukherjee S.C., Gopal C. & Sahul Hameed A.S. (2006). Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 257, 136–141.
9. Eissa I. A. M, Diab A. S, Ahmed A. A and Mona Zaki. Evaluation of different RT-PCR assays for diagnosis of carrier infection of nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in *Macrobrachium rosenbergii* in Egypt. *Life Science Journal* 2014.

10. Zhang et al. (2006). Quantitative relationship of two viruses (MrNV and XSV) in white-tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. Diseases of aquatic organisms, Dis Aquat Org, Vol. 71: 11-17, 2006
-