

THÔNG BÁO KHOA HỌC

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG GÂY BỆNH CỦA *Vibrio* sp. PHÂN LẬP TỪ TÔM THẺ BỊ BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TÍNH TẠI NINH THUẬN

EVALUATION OF PATHOGENICITY OF *Vibrio* sp. ISOLATED FROM WHITE SHRIMP WITH ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE (AHPND) IN NINH THUAN

**Dư Ngọc Tuấn¹, Trần Kiến Đức²,
Nguyễn Văn Có³, Nguyễn Văn Minh^{3*}**

Ngày nhận bài: 21/8/2019; Ngày phản biện thông qua: 23/9/2019; Ngày duyệt đăng: 30/9/2019

TÓM TẮT

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND – Acute hepatopancreatic necrosis disease) hay bệnh chết sớm EMS (early mortality syndrome) xuất hiện đầu tiên từ năm 2009 ở Trung Quốc trước khi lan sang Việt Nam và gây chết hàng loạt tôm nuôi ở Ninh Thuận vào năm 2010. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập được 56 chủng *Vibrio* sp. từ 30 mẫu tôm thẻ chân trắng bệnh hoại tử gan tụy tại các ao nuôi tôm ở Ninh Thuận. Từ kết quả khảo sát LD₅₀ cho thấy 12 chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. có độc lực gây chết cao trong đó chủng NT2.5 có độc lực cao nhất (LD₅₀ = 8,98x10³ CFU/mL). Tôm bệnh ở thí nghiệm này đã được kiểm tra bằng phương pháp mô học. Bằng kỹ thuật PCR, sử dụng cặp mồi đặc hiệu phát hiện gene độc tố PirA_{vp} và PirB_{vp}, kết quả các chủng NT2.5; NT2.8; NH5.3c; NH8.4 và NT4.5 có chứa gene độc tố PirB_{vp}, chủng NT6a có chứa gene độc tố PirA_{vp}. Đã định danh sinh hóa 6 chủng *Vibrio* sp. đều tương đồng trên 80% với *Vibrio parahaemolyticus*. Chủng có độc lực mạnh nhất được định danh bằng phương pháp PCR, giải trình tự dựa trên vùng gen 16S rDNA, kết quả cho thấy NT2.5 thuộc loài *Vibrio parahaemolyticus*.

Từ khóa: bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, tôm thẻ, *Vibrio parahaemolyticus*, PirA_{vp}, PirB_{vp}

ABSTRACT

The disease was first seen in China in 2009, before it spread to Viet Nam in 2010

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), also called early mortality syndrome (EMS) in shrimp was first seen in China in 2009, before it spread to Viet Nam and cause serial death of shrimp in Ninh Thuan in 2010. In this study, we isolated 56 strains of *Vibrio* sp. from 30 samples of white shrimp were infected AHPND in shrimp ponds in Ninh Thuan. From the result of LD₅₀ testing showed 12 strains of *Vibrio* sp. has high lethal virulence in which *Vibrio* sp. NT2.5 has the highest virulence (LD₅₀ = 8.98x10³ CFU / mL). The shrimp disease in this experiment were tested by histological methods. In PCR technique, by using specific primers to detect PirA_{vp} and PirB_{vp} toxin genes, 6 *Vibrio* sp. strains were identified that contain the toxin genes PirA_{vp} and PirB_{vp}, NT 2.5 ; NT2.8 ; NH5.3c ; NH8.4 và NT4.5 have PirB_{vp} gene, NT6a has PirA_{vp} gene. The biochemical methods for identification of 6 strains was performed, it homologous over 80% with *Vibrio parahaemolyticus*. The highest virulent NT2.5 was identified by PCR method, sequencing based on the 16S rDNA region, showed that NT2.5 was identified as *Vibrio parahaemolyticus*.

Keywords: Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), white shrimp, *Vibrio parahaemolyticus*, PirA_{vp}, PirB_{vp}

¹ Chi Cục Thủy sản Ninh Thuận

² Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

³ Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Mở Tp. Hồ Chí Minh

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam có tiềm năng lớn về nuôi trồng thủy sản, trong đó nghề nuôi tôm chiếm vị trí quan trọng. Theo Tổng cục Thủy sản, ước tính giá trị sản xuất thủy sản năm 2014 đạt gần 188 nghìn tỷ đồng. Trong đó, giá trị nuôi trồng thủy sản ước đạt hơn 115 nghìn tỷ đồng (Tổng cục thủy sản 2014b).

Tuy nhiên, hiện nay tình trạng dịch bệnh ở tôm đang hoành hành trên nhiều vùng nuôi tôm ở nước ta. Đặc biệt là hội chứng tôm chết sớm Early Mortality Syndrome (EMS) hay còn gọi là hội chứng hoại tử gan tụy Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) (Flegel và cs., 2012).

Ở Việt Nam, căn bệnh này đã được quan sát thấy từ năm 2010, nhưng sự tàn phá trên diện rộng do EMS chỉ được báo cáo kể từ tháng 3 năm 2011 ở đồng bằng sông Cửu Long. Dịch bệnh gây ảnh hưởng đến khu vực sản xuất tôm chính của tỉnh Tiền Giang, Bến Tre, Kiên Giang, Sóc Trăng, Bạc Liêu và Cà Mau với tổng diện tích ao nuôi tôm khoảng 98.000 ha (Mooney, 2012). Theo báo cáo của Cục Thú y, trong 11 tháng đầu năm 2014 ở nước ta dịch bệnh hoại tử gan tụy đã xảy ra tại 22 tỉnh/ thành phố với diện tích nuôi tôm bị bệnh là 5591 ha, gây thiệt hại hàng nghìn tỷ đồng cho người dân và ngân sách Nhà nước (Tổng cục thủy sản, 2014a).

Bệnh gây ra nhiều thiệt hại nghiêm trọng cho các nước nuôi tôm trên thế giới, như ở Trung Quốc năm 2009 (NACA-FAO, 2011), Malaysia năm 2011 (Lightner và cs., 2012, Mooney và cs., 2012); Thái Lan năm 2012 (Tran và cs., 2013) và xuất hiện ở Mexico năm 2013 (Schryver và cs., 2014).

Vào đầu năm 2013, nhóm nghiên cứu của GS. Lightner (phòng nghiên cứu Bệnh học thủy sản Đại học Arizona) đã phân lập và xác định tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy trong môi trường nhân tạo là do dòng đặc biệt của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có độc lực cao thông qua kiểm tra mô học, sử dụng bộ kit API Rapid NE và giải trình tự 16S rRNA (Tran và cs., 2013). *V. parahaemolyticus* xâm hại đường tiêu hóa của tôm và sinh ra độc tố gây phá hủy mô, làm rối loạn chức năng của gan tụy, cơ

quan tiêu hóa của tôm (Lightner và cs., 2012; FAO, 2013). Năm 2014, Kondo và cộng sự khi phân tích trình tự bộ gen của các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy ở Thái Lan cũng phát hiện gen độc tố *PirA* và *PirB* đồng thời lại không phát hiện trong chủng *V. parahaemolyticus* không gây bệnh. Điều này chứng tỏ gen độc tố *PirA* và *PirB* là tác nhân gây bệnh AHPND. (Kondo và cs., 2014).

Hiện tại tác nhân gây nên AHPND vẫn còn đang được các nhà khoa học tập trung nghiên cứu. Theo Lightner (2012), tôm bệnh thường có một số đặc điểm mô bệnh học đặc trưng như: (i) thoái hóa cấp tính của các ống gan tụy với sự rối loạn về chức năng của tế bào E, R và F; (ii) nhân tế bào trương to, tế bào bị hoại tử rơi vào trong lòng ống gan tụy. Trong giai đoạn sau phát hiện có hiện tượng tập trung của các tế bào máu và sự phát triển của tác nhân vi khuẩn thứ cấp chủ yếu là nhóm vi khuẩn *Vibrio* trong vùng gan tụy, đặc biệt là ở những ống gan tụy bị hoại tử và thoái hóa (Flegel, 2012). Trong bài báo cáo này, chúng tôi trình bày kết quả phân lập và xác định khả năng gây hoại tử gan tụy của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ tôm bệnh thu tại các ao nuôi tôm ở Ninh Thuận.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu tôm bệnh hoại tử gan tụy thu nhận ở các ao nuôi tại thị trấn Khánh Hải, huyện Ninh Hải, tỉnh Ninh Thuận và chủng *V. parahaemolyticus* NT7 phân lập từ mẫu tôm có biểu hiện bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) tại ao nuôi tôm thôn Từ Thiện, xã Phước Vinh, tỉnh Ninh Thuận được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh.

Tôm thẻ chân trắng giống khỏe mạnh và không mang các mầm bệnh được cung cấp từ Trung tâm giống hải sản cấp I tỉnh Ninh Thuận.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phân lập *Vibrio sp.* từ mẫu tôm bệnh hoại tử gan tụy

Các mẫu tôm thẻ có biểu hiện bệnh hoại tử gan tụy còn sống được thu tại thị trấn Khánh

Hải, huyện Ninh Hải, tỉnh Ninh Thuận. Lưu giữ mẫu ở 4 °C và vận chuyển về PTN Công nghệ Vi sinh để tiến hành phân lập. Mẫu được khử trùng bề mặt bằng cồn 70°, tách bỏ phần giáp đầu ngực. Gan tụy tôm được tăng sinh trong dung dịch peptone kiềm, ủ ở 37 °C. Sau 24 giờ, mẫu đã tăng sinh được cấy ria lên đĩa môi trường Thiosulfate Citrate Bile Salt Agar (TCBS) và Chromagar, ủ 24 giờ ở 37 °C. Chọn khuẩn lạc điển hình (có dạng hình tròn, hơi lồi, tâm nhô cao, hình nón, màu xanh lá), tiến hành làm thuần và nhuộm Gram. (Nguyễn Trọng Nghĩa và cs., 2015).

2.2. Thử nghiệm sàng lọc sơ bộ khả năng gây bệnh AHPND và khảo sát khả năng gây chết 50- LD₅₀ của các chủng *Vibrio* s

Từ các chủng *Vibrio* sp. đã được phân lập, tiến hành gây nhiễm các chủng *Vibrio* sp. nồng độ 10⁶ và 10⁷ CFU/ml lên tôm, quan sát số lượng tôm chết sau 96 giờ để sàng lọc sơ bộ khả năng gây bệnh AHPND.

Từ kết quả sàng lọc sơ bộ, các vi khuẩn *Vibrio* sp. được tăng sinh trong môi trường canh peptone kiềm (bổ sung 3 % NaCl), ủ 24 giờ/ 37 °C. Các nghiệm thức được bố trí 25 lít/ thùng, với 30 con tôm khoảng 1 g, sạch bệnh và được lặp lại 3 lần. Tôm được gây nhiễm với *Vibrio* sp. ở các mật độ: 10⁴, 10⁵, 10⁶, CFU/ml, đối chứng không bổ sung vi khuẩn. Mật độ vi khuẩn *Vibrio* sp. thử nghiệm được xác định thông qua đường tương quan giữa giá trị OD₆₁₀ và mật độ tế bào vi khuẩn *Vibrio* sp. thử nghiệm (Trần Linh Thuốc, 2010). Tôm nhịn đói trong 12 giờ sau khi cảm nhiễm. Ghi nhận số tôm chết hằng ngày cho đến khi tôm ngưng chết liên tục trong 3 ngày hoặc chết hoàn toàn. Lethal Dose 50 (LD₅₀) được tính dựa vào công thức của Reed và Muech (1938):

$$LD_{50} = 10^{a-PD}$$

Trong đó: a: nồng độ gây chết nhỏ nhất nhưng trên 50%

PD (Proportionate Distance) = tỉ lệ tôm chết thấp nhất nhưng trên 50% - 50%)/(tỉ lệ tôm chết thấp nhất nhưng trên 50% - tỉ lệ tôm chết cao nhất nhưng dưới 50%).

Tôm chết được kiểm tra dấu hiệu bệnh lý và tái kiểm tra vi khuẩn trong gan tụy của tôm trên

môi trường TCBS. Sau đó, các mẫu gan tôm bệnh được cố định bằng dung dịch Davidson's và gửi đến Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II để kiểm tra mô học.

2.3. Xác định gene độc tố của các chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. gây bệnh AHPND bằng kỹ thuật PCR.

Xác định gene độc tố *PirAvp* và *PirBvp* bằng kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction), thí nghiệm được gửi làm dịch vụ tại Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy Sản II, Thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu thí nghiệm được tách chiết DNA bằng phương pháp Phenol/Chloroform, thí nghiệm PCR được thực hiện với cặp mồi đặc hiệu cho gen *PirAvp* và *PirBvp*, sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di, đoạn gen độc tố *PirAvp* và *PirBvp* được khuếch đại lần lượt có kích thước sản phẩm 284 bp và 392 bp. Mục đích xác định gene độc tố để giúp chúng mình tôm bệnh ở thí nghiệm LD₅₀ là do *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy AHPND (Han và cs., 2015a).

2.4. Định danh các chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. bằng phương pháp sinh hoá và sinh học phân tử

Tiến hành nhuộm Gram và định danh sơ bộ bằng các thử nghiệm sinh hóa theo khóa phân loại Bergey's (Holt và cs., 1994).

Chủng có độc lực mạnh nhất được định danh bằng phương pháp PCR và giải trình tự dựa trên vùng gen *16S rDNA*.

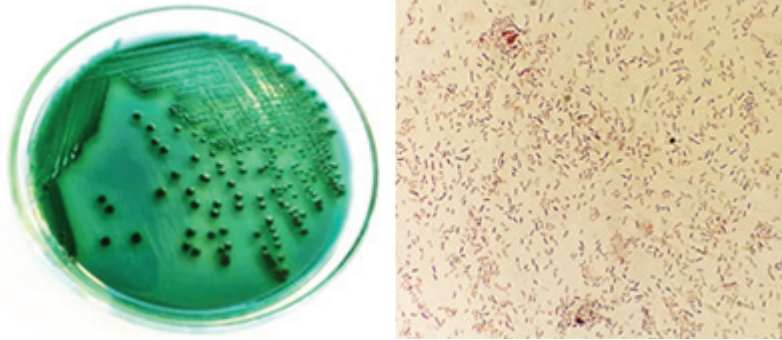
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân lập *Vibrio* sp. từ mẫu tôm bệnh hoại tử gan tụy

Từ 30 mẫu tôm bệnh, chúng tôi phân lập và làm thuần được 56 chủng có khuẩn lạc màu xanh, hình nón, lồi tròn trên môi trường TCBS. Tiến hành nhuộm Gram, thử nghiệm oxidase các chủng trên, chúng tôi thu được 56/56 chủng thuộc nhóm Gram (-), hình que ngắn, sắp xếp riêng lẻ và oxidase (+).

2. Kết quả xác định khả năng gây bệnh (LD₅₀) của các chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. có khả năng gây bệnh AHPND trên tôm thẻ.

Sau khi tiến hành 2 lần gây nhiễm sơ bộ 56 chủng với nồng độ 10⁶ và 10⁷ CFU/mL, chúng tôi chọn lọc được 11 chủng vi khuẩn *Vibrio* sp.



Hình 1. Chủng *Vibrio* sp. NT 2.5. phân lập từ tôm thẻ nuôi tại Ninh Thuận.

A-khuẩn lạc trên môi trường TCBS, B-vi thể vi khuẩn nhuộm Gram

và 1 chủng *V. parahaemolyticus* NT7 có khả năng gây bệnh hoại tử gan tụy mạnh trên tôm thẻ chân trắng.

Chúng tôi tiến hành xác định khả năng gây bệnh (LD₅₀) của 12 chủng vi khuẩn: *Vibrio* sp.

NT2.5, NT2.8, NT6a, NT4.5, NH8.4, NH5.3c, NT7.3, NT17a, NH3.3a, NT3.2, NH6.3c và *V. parahaemolyticus* NT7 có khả năng gây bệnh AHPND trên tôm thẻ, kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Nồng độ gây chết 50 của các chủng *Vibrio* sp. qua khảo sát LD₅₀

Tên chủng <i>Vibrio</i> sp.	NT2.5	NT6a	NT4.5	NH8.4	NT2.8	NH5.3c
LD ₅₀ (CFU/mL)	8,98x10 ³	4,19x10 ⁴	5,91x10 ⁴	6,15x10 ⁴	6,79x10 ⁴	7,63x10 ⁴
Tên chủng <i>Vibrio</i> sp.	NT17a	NT7.3	NH6.3c	NT3.2	<i>V. parahaemolyticus</i> NT7	NH3.3a
LD ₅₀ (CFU/mL)	7,80x10 ⁴	8,67x10 ⁴	8,79 x 10 ⁴	1,15 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁵	1,68 x 10 ⁵

Qua kết quả khảo sát LD₅₀ ở bảng 1, chúng tôi thu nhận được 2 chủng *Vibrio* sp. NT2.5 với LD₅₀ = 8,98 x 10³ CFU/ mL và *Vibrio* sp. NT6a với LD₅₀ = 4,19 x 10⁴ CFU/ mL có độc lực cao nhất và cao hơn các chủng *Vibrio parahaemolyticus* trong nghiên cứu của Nguyễn Trọng Nghĩa và cộng sự (2015) (10⁵ CFU/mL và 10⁶ CFU/ mL). Chúng tôi nhận thấy rằng: chủng NT2.5 có độc lực gây chết cao nhất và được sử dụng vào thí nghiệm tiếp theo.

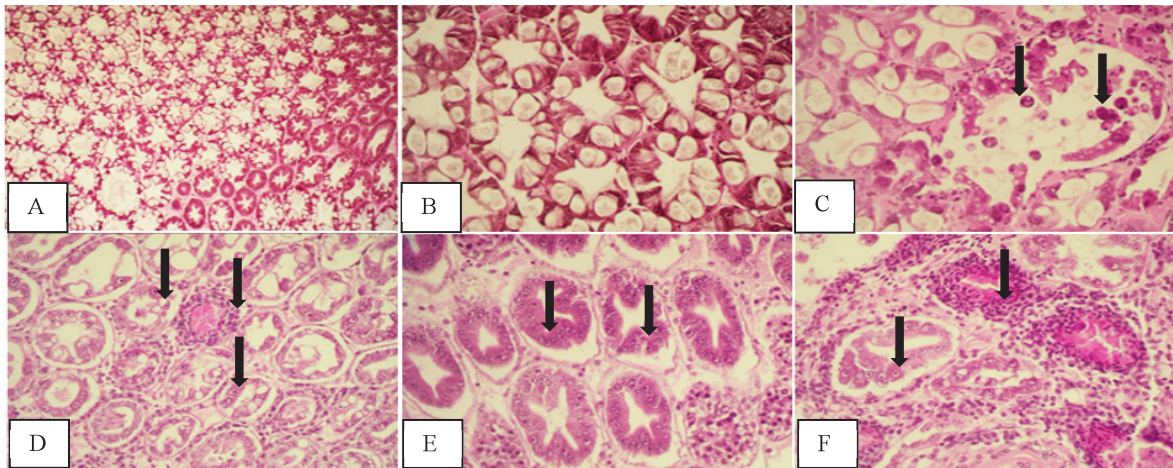
Sau khi gây cảm nhiễm trên tôm thẻ ở thí nghiệm LD₅₀, tiến hành theo dõi tôm biểu hiện hoạt động chậm chạp, bỏ ăn, gan tụy teo, dai và nhợt nhạt, ruột rỗng của bệnh AHPND. Kết quả kiểm tra chủng vi khuẩn trong gan tụy trên môi trường TCBS cũng cho thấy các đặc điểm khuẩn lạc màu xanh, hình nón, lồi tròn tương tự vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Chúng tôi tiến hành lấy mẫu gan tụy của chủng *Vibrio* sp. NT2.5 có biểu hiện bệnh AHPND sớm và đặc

trung so với các chủng *Vibrio* sp. còn lại, sau đó các mẫu gan tôm bệnh được kiểm tra mô học, kết quả được trình bày ở hình 2.

Đặc điểm mô bệnh học tương tự như tôm mắc phải AHPND theo định nghĩa của Lightner và cộng sự, (2012) là cấu trúc của mô gan tụy bị biến đổi, ống gan tụy không có tế bào B, F và R và một số tế bào biểu mô của ống gan tụy có nhân to khác thường, các tế bào gan thoái hóa và rơi vào lòng ống, xuất hiện hiện tượng melamin hóa ở vùng gan hoại tử và xuất hiện của các tế bào máu quanh các cụm vi khuẩn trong vùng bị hoại tử (hình 2). Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Trọng Nghĩa và cộng sự (2015).

3. Kết quả xác định gene độc tố của các chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. gây bệnh AHPND bằng kỹ thuật PCR

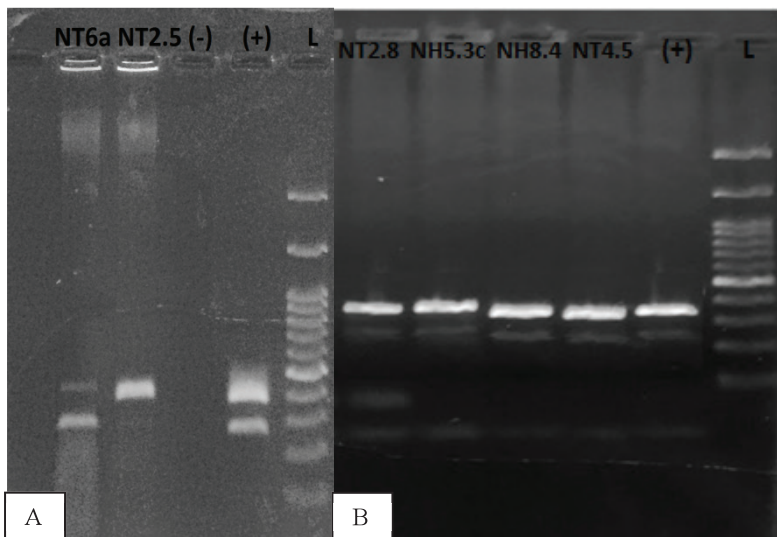
Các chủng *Vibrio* sp. được nuôi cấy trong môi trường peptone kiềm bổ sung 3% NaCl sau đó được gửi đến Viện Nghiên Cứu Nuôi



Hình 2. Biến đổi mô học gan của tôm gây cảm nhiễm với chủng *Vibrio* sp NT2.5. (A & B) Gan tụy tôm ở nghiệm thức đối chứng (A: 40x & B: 100x). (C) Các tế bào của ống gan tụy bong tróc (D) dấu hiệu teo ống gan tụy, số lượng tế bào B, F và R giảm nhiều. (E) cấu trúc của mô gan tụy biến đổi, ống gan tụy không có tế bào B, F và R, các tế bào gan thoái hóa, rơi vào lòng ống và tế bào biểu mô có nhân to bất thường (F) các tế bào gan thoái hóa, xuất hiện hiện tượng melamin hóa và các tế bào máu tập trung quanh các cụm vi khuẩn trong vùng bị hoại tử

Trông Thủy Sản II, Thành phố Hồ Chí Minh để xác định gene độc tố gây bệnh AHPND bằng kỹ thuật PCR được trình bày hình 3A và 3B.

Kết quả điện di từ hình 3A sử dụng hai cặp mồi đặc hiệu *PirA_{vp}* và *PirB_{vp}* cho thấy ở mẫu đối chứng dương xuất hiện 1 băng có kích



Hình 3. (A) Kết quả xác định gene độc tố chủng *Vibrio* sp. NT 2.5; NT6a và (B) các chủng *Vibrio* sp. NT2.8; NH5.3c; NH8.4 và NT4.5.

thước sản phẩm là 284 bp (cặp mồi *PirA_{vp}*) và 1 băng có kích thước sản phẩm 392 bp (cặp mồi *PirB_{vp}*). Mẫu đối chứng âm không xuất hiện băng. Mẫu *Vibrio* sp. NT2.5 xuất hiện 1 băng có kích thước 392 bp, chứng tỏ có chứa gene độc tố *PirB_{vp}*. Mẫu *Vibrio* sp. NT6a xuất

hiện 1 băng có kích thước 284 bp, chứng tỏ NT6a có chứa gene độc tố *PirA_{vp}*.

Kết quả điện di từ hình 3B sử dụng hai cặp mồi đặc hiệu *PirA_{vp}* và *PirB_{vp}* cho thấy ở mẫu đối chứng dương xuất hiện một băng nhạt có kích thước sản phẩm là 284 bp (cặp

mỗi *PirA_{vp}*) và một băng đậm có kích thước sản phẩm 392 bp (cặp mỗi *PirB_{vp}*). Mẫu *Vibrio* sp. NT2.8 ; NH5.3c ; NH8.4 và NT4.5 xuất hiện băng có kích thước 392 bp, chúng tỏ có chứa gene độc tố *PirB_{vp}*. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Han và cộng sự (2015).

4. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn *Vibrio* sp.

Sau khi quan sát đại thể và vi thể các chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. NT2.5, NT2.8, NT6a, NT4.5, NH8.4, NH5.3c. Chúng tôi tiến hành định danh theo khoá phân loại Bergey (Holt và cs., 1994). Kết quả định danh các chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. được trình bày trong bảng 2 và 3.

Bảng 2. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. bằng phương pháp sinh hóa

Thử nghiệm	NT2.5	NT2.8	NT6a	NT4.5	NH8.4	NH5.3c
Catalase	+	+	+	+	+	+
Di động	+	+	+	+	+	+
Sinh H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Simmon's Citrate	-	-	+	+	+	-
Gelatine	+	+	+	+	+	+
Urea	+	-	+	+	+	+
Tạo Nitrate	+	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-
Voges – Proskauer (VP)	-	-	-	-	-	-
Hiếu khí	+	+	+	+	+	+
Kỵ khí	+	+	+	+	+	+
Lên men đường Glucose	+	+	+	+	+	+
Lên men đường Sucrose	-	-	-	+	+	-
Lên men đường L – Arabinose	-	+	-	-	-	-
Lên men đường Sorbitol	-	-	-	-	-	-
Lên men đường Mantiol	+	+	+	+	+	+
Lên men đường Rafinose	-	-	-	-	-	-
Lên men đường Melibiose	+	-	-	-	-	-
Lên men đường Lactose	+	-	-	-	-	-
Phát triển ở 0 % NaCl	-	-	-	-	-	-
Phát triển ở 1 % NaCl	+	+	+	+	+	+
Phát triển ở 6 % NaCl	+	+	+	+	+	+
Phát triển ở 8 % NaCl	+	+	+	+	+	+

Ghi chú: (+) dương tính, (-) âm tính

Từ kết quả xác định khả năng gây bệnh (LD₅₀), phát hiện gen độc tố và định danh sinh hóa từ bảng 2 và 3 các chủng vi khuẩn *Vibrio* sp., chúng tôi chọn chủng có độc lực mạnh nhất gửi giải trình tự dựa trên vùng gen *16S rDNA*. Kết quả BLAST cho thấy, chủng *Vibrio* sp. NT2.5 tương đồng cao nhất với *Vibio*

parahaemolyticus, chỉ số tương đồng (Ident) đạt 99,8%, độ bao phủ 100% và giá trị mong đợi E-value 0.0. Kết quả dựng cây phả hệ phân tử bằng phần mềm MEGA6.0 cho thấy *Vibrio* sp. NT2.5 có mức độ gần gũi nhất với *Vibio parahaemolyticus*, chỉ số bootstrap đạt 90, thể hiện mối quan hệ gần gũi, mức độ tin cậy rất

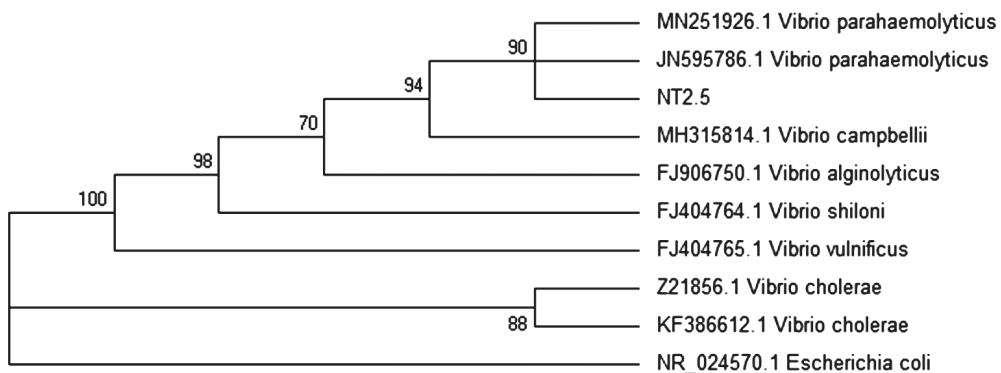
Bảng 3. Tỷ lệ tương đồng về các thử nghiệm sinh hóa của các chủng *Vibrio* sp

STT	Tên chủng	Số lượng thử nghiệm sinh hóa tương đồng*	Tỷ lệ tương đồng*
1	<i>Vibrio</i> sp. NT2.5	19/23	82,61 %
2	<i>Vibrio</i> sp. NT2.8	20/23	86,96 %
3	<i>Vibrio</i> sp. NT6a	22/23	95,65 %
4	<i>Vibrio</i> sp. NT4.5	19/23	82,61 %
5	<i>Vibrio</i> sp. NH8.4	20/23	86,96 %
6	<i>Vibrio</i> sp. NH5.3c	21/23	91,30 %

Ghi chú: tỷ lệ tương đồng được xác định theo % thử nghiệm phù hợp trên tổng thử nghiệm được tiến hành. Một số thử nghiệm không thực hiện được do điều kiện phòng thí nghiệm.

cao (Hình 4). Kết hợp với kết quả định danh sinh hóa, kết quả phân tích mô học bệnh hoại tử gan tụy và xác định gen độc tố, chúng tôi

kết luận *Vibrio* sp. NT2.5 thuộc loài *Vibrio parahaemolyticus*.



Hình 4. Xây dựng cây phả hệ phân tử chủng NT2.5

V. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

Từ 56 chủng *Vibrio* sp. được phân lập, chúng tôi xác định được 12 chủng có khả năng gây bệnh hoại tử gan tụy mạnh lên tôm thẻ chân trắng. 12 chủng *Vibrio* sp. thử nghiệm xác định nồng độ gây chết LD₅₀ đều có độc lực gây chết cao, trong đó có 2 chủng có độc lực gây chết cao nhất là NT2.5 với LD₅₀ = 8,98 x 10³ CFU/mL và NT6a với LD₅₀ = 4,19 x 10⁴ CFU/mL. Kiểm tra mô học cho thấy các mẫu gan tụy của tôm thí nghiệm đều bị bệnh AHPND. Quan sát và phân tích cấu trúc của mô gan tụy bị biến đổi, ống gan tụy không có tế bào B, F và R và một số tế bào biểu mô của ống gan tụy có nhân to khác thường, các tế bào gan thoái hóa và rơi vào lòng ống, xuất hiện hiện tượng melanin hóa ở vùng gan hoại tử và xuất hiện các tế bào máu quanh các cụm vi khuẩn trong vùng bị

hoại tử. Các chủng *Vibrio* sp. NT2.5; NT2.8; NH5.3c; NH8.4 và NT4.5 có chứa gene độc tố *PirBvp*. Chủng *Vibrio* sp. NT6a có chứa gene độc tố *PirAvp*. Kết quả định danh các chủng *Vibrio* sp. trên bằng phương pháp sinh hóa theo khóa phân loại của Bergey đều có chỉ số tương đồng trên 80 % trên tổng các thử nghiệm sinh hoá tiến hành. Từ kết quả xác định NT2.5 có độc lực mạnh nhất, kết hợp kết quả phân tích mô học bệnh hoại tử gan tụy, xác định gen độc tố, kết quả định danh sinh hóa, chúng tôi đã định danh sinh học phân tử, dựng cây phát sinh loài và kết luận chủng vi khuẩn NT2.5 thuộc loài *Vibrio parahaemolyticus*.

2. Kiến nghị

Tiếp tục giải trình tự định danh các chủng *Vibrio* còn lại để lưu trữ bộ sưu tập *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy ở tôm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Tổng cục Thủy sản, 2014a. Hội thảo Khoa học bệnh Đốm trắng và bệnh Hoại tử gan tụy cấp trên tôm nuôi nước lợ.
2. Tổng cục thủy sản, 2014b. Tình hình sản xuất thủy sản năm 2014.
3. Nguyễn Trọng Nghĩa, Đặng Thị Hoàng Oanh, Trương Quốc Phú và Phạm Anh Tuấn (2015), phân lập và xác định khả năng gây hoại tử gan tụy của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ tôm nuôi ở bạc liêu, Tạp chí Nghiên cứu Khoa học Trường Đại Học Cần Thơ, số 39 trang 99-107.
4. Trần Linh Thước, 2010. *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. NXB Giáo Dục Việt Nam, 70 trang.

Tiếng Anh

5. FAO, 2013. Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304) Hanoi, Vietnam, on 25–27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053.
6. Flegel T.W. 2012, “Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia”, *Journal of Invertebrate Pathology*, 110, pp. 166-173.
7. Han J.E., Mohny L.L., Tang K.F.J., Pantoja C.R., Lightner D.V., 2015. Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquaculture* 2,17–21.
8. Han J.E., Tang K.F.J., Tran L.H., Lightner D.V., 2015a. Photorhabdus insect-related (Pir) toxin- like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 113, pp. 33–40.
9. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th edition, Chapper V, 816 pages.
10. Kondo H., Tinwongger S., Proespraiwong P., Mavichak R., Unajak S., Nozaki R., Hirono I., 2014. Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Early Mortality Syndrome/Acute Hepato- pancreatic Necrosis Disease shrimp in Thailand. *Genome Announc*, 2(2), (e00221-14).
11. Lightner D.V., Loc T., Linda N., Rita M. R., Leone L. M., Carlos R. P., Kevin F. 2013, “Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp”, *Diseases Of Aquatic Organisms*, 105, pp. 45–55.
12. Lightner D.V., Redman R.M., Pantoja C.R., Noble B.L., Tran L.H., 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, 40 pages.
13. Mooney A., 2012. An emerging shrimp disease in Vietnam, microsporidiosis or liver disease? Available at: <http://aquatichealth.net/issues/38607> (accessed 24 Feb 2012).
14. NACA-FAO, 2011. Quarterly Aquatic Animal Disease Report (Asia and Pacific Region), 2011/2, April–June 2011, *NACA, Bangkok*.
15. Schryver P., Defoirdt T., Sorgeloos P., 2014. Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming?. *Pathogens magazines*, Ghent University, Gent, Belgium.
16. Reed J.L., Muench H., 1938. A simple method of estimating fifty percent Endpoints. *The American journal of hygiene* 27, 493-497.