

# NGHIÊN CỨU ĐỘC LỰC CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN *Vibrio parahaemolyticus* GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP (AHPND) TRÊN TÔM CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*) NUÔI TẠI THỪA THIÊN HUẾ

Nguyễn Ngọc Phước<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Xuân Hồng<sup>1</sup>, Nguyễn Công Chung<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm Huế

<sup>2</sup>Chi cục thú y vùng 3

\*Tác giả liên hệ: nguyenngocphuoc@huanf.edu.vn

Ngày nhận bài: 13.03.2020

Ngày chấp nhận đăng: 24.04.2020

## TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích xác định một số yếu tố độc lực và khả năng gây bệnh gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease - AHPND) của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* trên tôm chân trắng nuôi tại Thừa Thiên Huế. Trong nghiên cứu này, 8 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đã được phân lập từ tôm chân trắng bị bệnh có triệu chứng điển hình của AHPND như gan tụy teo nhỏ, nhạt màu, tôm bị mềm vỏ, ruột rỗng và xuất hiện các đốm đen trong khối gan tụy. Các chủng vi khuẩn được định danh là *V. parahaemolyticus* bằng kit API 20E (BioMerieux). Bốn trong 8 chủng vi khuẩn phân lập được xác định gây bệnh AHPND bằng kit IQ Plus™ AHPND/EMS Plasmid Kit. Kết quả khảo sát các yếu tố độc lực cho thấy khả năng di động của các chủng gây bệnh AHPND, cũng như khả năng sản sinh caseinase, phospholipase, haemolysin cao hơn so với chủng vi khuẩn không mang gen độc lực. Kết quả gây bệnh thực nghiệm cho thấy liều gây chết 50% (LD50) của các chủng vi khuẩn gây bệnh AHPND phân lập được là 105 cfu/mL. Ngược lại, tôm không có triệu chứng lâm sàng và không xảy ra tỷ lệ chết ở nghiệm thức cảm nhiễm chủng vi khuẩn không mang gen độc lực. Kết quả nghiên cứu cho thấy các yếu tố độc lực có liên quan chặt chẽ đến khả năng gây bệnh hoại tử gan tụy cấp của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm.

Từ khoá: *Vibrio parahaemolyticus*, độc lực vi khuẩn, tôm chân trắng, hoại tử gan tụy cấp, AHPND.

## Study on the Virulence Factors of *Vibrio parahaemolyticus* Caused Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Farmed White Leg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Thua Thien Hue Province

## ABSTRACT

The aim of this study was to identify the virulence factors and the pathogenesis of *Vibrio parahaemolyticus* in farmed white leg shrimp in Thua Thien Hue province. In this study, 8 isolates of *V. parahaemolyticus* were recovered from diseased white leg shrimp that showed typical clinical signs of AHPND such as pale-to-white hepatopancreas (HP), significant atrophy of the HP, softshells, guts with discontinuous, or no contents, black spots or streaks visible within the HP. The bacteria were identified as *V. parahaemolyticus* by using API 20E kit (BioMerieux). Four of 8 isolates have been detected that caused AHPND by using IQ Plus™ AHPND/EMS Plasmid Kit. Data of this study showed that the production of caseinase, phospholipase, haemolysin and mobility of these isolates were significantly stronger than others. The LD50 of isolate that caused AHPND was 105 cfu/mL. By contrast, experimental shrimp were healthy without any clinical signs and no mortality was observed in the treatment immersed in the isolate lacking toxin genes. This study showed strong relationship between virulence factors and pathogenesis of *V. parahaemolyticus* caused AHPND in shrimp.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, white shrimp, virulence factor, Acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mục tiêu phát triển NTTS của chính phủ Việt Nam đến năm 2020 với tổng diện tích nuôi

trồng đạt 1.200.000ha và tổng sản lượng thủy sản nuôi trồng nước mặn, lợ đạt 1.408.000 tấn. Trong đó, diện tích nuôi tôm chân trắng là 60.000ha và sản lượng đạt 310.000 tấn (Tổng

cục Thủy sản, 2012). Tuy nhiên, dịch bệnh trong NTTS đang là thách thức lớn hiện nay cho sự phát triển bền vững ngành thủy sản.

Thiệt hại do vi khuẩn *Vibrio* gây ra vẫn tiếp tục gia tăng trong những năm gần đây trên nhiều đối tượng nuôi trồng thủy sản, trong đó *V. parahaemolyticus* được xem là tác nhân chính gây ra nhiều dịch bệnh trên tôm nuôi và là tác nhân chính gây ra bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease - AHPND) hay còn gọi là Hội chứng chết sớm (Early Mortality Syndrome - EMS) trên tôm nuôi trong giai đoạn dưới 1 tháng tuổi (Lightner & cs., 2012) gây thiệt hại lớn cho nghề nuôi tôm ở Việt Nam và trên thế giới. Tuy vậy, không phải tất cả các dòng *V. parahaemolyticus* đều có khả năng gây bệnh EMS trên tôm mà chỉ có một số dòng có độc lực gây ra (Loc & cs., 2013). Nghiên cứu trên toàn bộ hệ gen giữa các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND và không gây bệnh AHPND, các nhà khoa học đã xác định các chủng vi khuẩn gây bệnh AHPND có mang plasmid chứa gen độc lực Pir gồm gen PirA và PirB (Kondo & cs., 2014; Lo & cs., 2014; Tinwongger & cs., 2014; Lightner, 2014; Lee & cs., 2014; Tinwongger & cs., 2014; Yang & cs., 2014; Kondo & cs., 2015; Han, 2016). Các gen PirA/B mã hoá hai loại protein độc tố có kích thước proteins lần lượt là 12,7kDa và 50,1kDa. Plasmid có thể chuyển thông tin di truyền từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác dẫn đến hiện tượng độc lực được kích hoạt và sản sinh độc tố khiến dịch bệnh AHPND lan rộng trong ngành công nghiệp nuôi tôm trên thế giới (Corteel, 2016). AHPND đã gây ra hiện tượng tôm nuôi chết hàng loạt tại một số nước có sản lượng tôm nuôi lớn như Trung Quốc (2009), Việt Nam (2010), Malaysia (2011), Thái Lan (2012) (FAO, 2013), Mexico (2013) (De Schryver & cs., 2014; Zorriehzahra & Banaederakhshan, 2015). Tại Việt Nam, AHPND ảnh hưởng đến hầu hết các vùng nuôi tôm trên cả nước với tổng diện tích tôm nuôi bị ảnh hưởng khoảng 28.000ha vào năm 2012. Theo báo cáo của Chi cục Thú y, mặc dù diện tích vùng nuôi tôm bị ảnh hưởng bởi AHPND giảm từ năm 2012 đến năm 2016, số lượng vùng

nuôi bị ảnh hưởng tăng từ 192 xã lên 299 xã (Cục Thú y, 2014; 2015; 2016).

Vì vậy, việc phân lập và khảo sát độc lực các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm chân trắng tại Thừa Thiên Huế sẽ cung cấp cơ sở khoa học cho các nghiên cứu sâu hơn về phòng và trị bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm và cho các bệnh do *Vibrio* gây ra trên các đối tượng nuôi thủy sản khác.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Thu và phân lập vi khuẩn từ tôm chân trắng

Mẫu tôm chân trắng với các dấu hiệu bệnh lý điển hình như dạt bờ, gan tụy nhạt màu, teo nhỏ, ruột màu trắng nhạt không có thức ăn được thu từ các ao nuôi tại xã Điền Hương, huyện Phong Điền và xã Phú Thuận huyện Phú Vang từ tháng 2 đến tháng 9 năm 2019.

Dùng cồn 70° khử trùng mặt ngoài cơ thể tôm, rồi dùng dao mổ tiệt trùng rạch một đường trên khối gan tụy. Sử dụng que cấy nhựa vô trùng lấy mẫu bệnh phẩm từ khối gan tụy và cấy lên đĩa môi trường Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) Agar (HiMedia, Ấn Độ). Đĩa cấy được ủ ở 28°C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc phát triển trên môi trường TCBS Agar được ghi nhận về màu sắc, hình dạng và kích thước, sau đó các khuẩn lạc màu xanh được cấy chuyển sang môi trường CHROMagar. Các chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường CHROMagar giữ ở -80°C trong môi trường 15% glycerol để dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 2.2. Định danh vi khuẩn

#### 2.2.1. Xác định một số chỉ tiêu về hình thái, sinh lý, sinh hoá

Hình dạng của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram. Đặc điểm sinh lý và sinh hóa được xác định dựa theo cẩm nang của Cowan và Steels (Barrow & Feltham, 1993) và sử dụng kit API 20E (BioMerieux, Pháp). Chủng *V. parahaemolyticus* STIR0012014 từ Đại học Stirling, Vương quốc Anh được sử dụng để so sánh.

Nghiên cứu độc lực của một số chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) nuôi tại Thừa Thiên Huế

### **2.2.2. Định danh vi khuẩn bằng môi trường phân lập đặc trưng CHROMagar™ Vibrio**

Các khuẩn lạc phát triển trên môi trường TCBS, được lựa chọn để cấy chuyên sang môi trường CHROMagar™ Vibrio (CHROMagar Microbiology, Pháp) để xác định màu sắc, hình dạng và được định danh theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### **2.3. Khảo sát các yếu tố độc lực của vi khuẩn trong điều kiện *in vitro***

#### **2.3.1. Sàng lọc các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp**

Các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* tạo khuẩn lạc màu tím hoa cà trên môi trường CHROMagar được sàng lọc có khả năng gây bệnh hoại tử gan tụy cấp bằng bộ test IQ Plus™ AHPND/EMS Plasmid Kit trên máy PCR Pockit Express (GeneReach Biotechnology Corporation, Đài Loan) theo hướng dẫn sản phẩm của nhà sản xuất dùng để xác định các chủng *V. parahaemolyticus* có mang AHPND/EMS plasmid chứa gen PirA và PirB phá huỷ khối gan tụy tôm.

#### **2.3.2. Khả năng di động của vi khuẩn**

Tính di động của vi khuẩn được thực hiện trên đĩa peptone nước đậu nành có chứa môi trường Tryptocasein soy broth (TSB) và 0,3% agar (Natrál & cs., 2011). 10µL huyền phù vi khuẩn (ở mật độ 10<sup>6</sup> cfu/mL) được nhỏ ở giữa đĩa thạch và đường kính di động của vi khuẩn được đo sau 24h (giờ) ủ ở 28°C.

#### **2.3.3. Hoạt tính thủy phân của enzyme: caseinase, haemolysin và phospholipase**

Tất cả các thí nghiệm được thực hiện theo hướng dẫn của Natrah & cs. (2011).

Hoạt tính thủy phân của enzyme caseinase, phospholipase và hoạt tính dung huyết được thực hiện bằng cách nhỏ 10µL huyền phù vi khuẩn lần lượt lên môi trường Tryptone casein soy agar (TSA) có chứa 4% bột sữa tách béo (Woolworths, Úc) hoặc môi trường TSA có bổ sung 1% egg yolk emulsion (Sigma-Alrich) hoặc đĩa thạch máu (5% máu cừu). Các đĩa thạch thí

th nghiệm ủ ở 28°C, xác định đường kính khuẩn lạc và vòng thủy phân sau 48-72 giờ. Các thí nghiệm được bố trí với 6 lần lặp lại cho mỗi hoạt tính nghiên cứu.

### **2.3.4. Xác định khả năng tan máu tôm trên môi trường Rose-Bengal**

Khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn phân lập được xác định dựa trên hoạt động thủy phân tế bào máu tôm trên môi trường Rose-Bengal (Chang & cs., 2000). Cho 1mL máu tôm vào 15mL Rose Bengal agar (Himedia, Ấn Độ) đã được hấp tiệt trùng và để nguội 45-50°C, lắc nhẹ sau đó cấy vi khuẩn *Vibrio*, ủ ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. Khi không có sự xuất hiện của các vòng dung huyết (mất màu đỏ của môi trường) xung quanh khuẩn lạc chứng tỏ vi khuẩn không có khả năng dung giải các tế bào máu tôm.

### **2.4. Xác định khả năng gây bệnh trong điều kiện *in vivo* và liều gây chết 50% tôm cảm nhiễm**

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí trong bể nhựa (80L) đã được khử trùng. Sau đó cấp nước mặn 20‰ vào khoảng 2/3 thể tích và sục khí liên tục.

Tôm thí nghiệm: Tôm chân trắng có trọng lượng 2-2,5 g/con, kích cỡ đồng đều, màu sắc tươi sáng, và đã được kiểm dịch không mang mầm bệnh AHPND, bệnh đốm trắng (White spot disease- WSD), bệnh đầu vàng (Yellow head diseases- YHD) tại Trạm xá Thú y, Chi cục Chăn nuôi và Thú y Thừa Thiên Huế. Trước khi tiến hành thí nghiệm, 10 con tôm được chọn ngẫu nhiên để kiểm tra vi khuẩn bằng cách lấy mẫu gan tụy cấy trực tiếp trên môi trường TSA (có bổ sung 2% NaCl) và môi trường TCBS.

Chuẩn bị vi khuẩn: chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TTH010101001 được phân lập từ các ao nuôi ở huyện Phong Điền (chủng gây bệnh AHPND) và chủng vi khuẩn TTH020201001 (chủng không gây bệnh AHPND) phân lập từ ao nuôi tôm ở xã Phú Thuận được dùng để nghiên cứu khả năng gây

bệnh và liều gây chết LD<sub>50</sub>. Vi khuẩn được nuôi tăng sinh 24 giờ ở 28°C trong môi trường TSB (có bổ sung 2% NaCl), sau đó ly tâm và rửa 2 lần bằng dung dịch NaCl 0,85%. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy so màu quang phổ (bước sóng 600 nm) kết hợp với đếm số khuẩn lạc trên môi trường TSA+ 2% NaCl. Thí nghiệm xác định giá trị LD<sub>50</sub> được bố trí trên 7 nghiệm thức bao gồm: 6 nghiệm thức thí nghiệm (tôm được ngâm với một trong sáu mật độ các chủng vi khuẩn trên từ 1 × 10<sup>8</sup> đến 1 × 10<sup>3</sup> cfu/mL trong 60 phút) và 1 nghiệm thức đối chứng (tôm được ngâm với nước muối sinh lý (0,85% NaCl) vô trùng trong 30 phút). Mật độ nuôi 20 con/bể. Tôm sau khi cảm nhiễm được nuôi với hệ thống nước chảy tốc độ 14 L/phút, nhiệt độ 28-30°C. Cho ăn hàng ngày với khối lượng tương đương 2% trọng lượng thân bằng thức ăn CP (Việt Nam). Sục khí liên tục 24 giờ/ngày. Tỷ lệ chết được theo dõi trong 14 ngày. Giá trị LD<sub>50</sub> được xác định theo phương pháp của Reed & Muench (1938).

Dựa vào số lượng tôm chết ở các nghiệm thức để tính LD<sub>50</sub> theo công thức sau:

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

Trong đó: a là số lũy thừa mà tại đó vi khuẩn gây tôm chết thấp nhất (trên 50%)

x được tính dựa vào công thức:  $x = (P_a - 50)/(P_a - P_u)$

Với: P<sub>a</sub> là tỷ lệ chết cận trên và P<sub>u</sub> là tỷ lệ chết cận dưới của liều gây chết 50%.

## 2.5. Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel 2016 để tính giá trị trung bình và độ

lệch chuẩn. Phân tích ANOVA một nhân tố trong phần mềm SPSS 20.0 để so sánh các giá trị trung bình ở mức p < 0.05 bằng phép thử Duncan.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả nuôi cấy, phân lập vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm chân trắng

*Vibrio* thường gây tác hại lớn cho tôm ở giai đoạn nuôi dưới 30 ngày tuổi, có trường hợp gây chết 100%, ở giai đoạn sau 30 ngày tuổi, *Vibrio* chỉ gây chết tôm khi các yếu tố môi trường trong ao nuôi không tốt hay biến động lớn do mưa hay sự biến động của tảo (Loc Tran & cs., 2013; Flegel, 2012), chính vì vậy, trong nghiên cứu này tập trung nghiên cứu độc lực của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm chân trắng giai đoạn 30-40 ngày tuổi.

Ba mươi (30) mẫu tôm với dấu hiệu mềm vỏ, gan tôm nhạt màu được thu từ 5 ao thuộc xã Diên Hương và Phú Thuận với chiều dài và trọng lượng được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả phân lập vi khuẩn từ 30 mẫu tôm bệnh trên môi trường TCBS cho 2 dạng khuẩn lạc với màu sắc khác nhau: khuẩn lạc vàng và khuẩn lạc xanh. Tuy nhiên, khi cấy 30 chủng này lên môi trường CHROMagar thì chỉ có 8/30 chủng cho khuẩn lạc có màu tím hoa cà và kết quả định danh bằng kit API 20E (BioMerieux) cho kết luận 8 chủng này là *V. parahaemolyticus*. Không thấy có sự xuất hiện các khuẩn lạc màu khác. Điều này cho thấy không phân lập được *V. alginolyticus* hay *V. vulnificus/Vibrio cholera* trong mẫu tôm bị bệnh gan tụy ở Thừa Thiên Huế.

**Bảng 1. Kích thước (chiều dài, và trọng lượng) của mẫu tôm ở các đợt thu mẫu**

Đợt thu mẫu	Thời gian thu mẫu	Địa điểm thu mẫu	Giai đoạn (ngày tuổi)	Số lượng	Chiều dài (cm) (TB ± SD)	Trọng lượng(g) (TB ± SD)
1	12/3/2019	Diên Hương	Postarvae (30-35)	06	5,4 ± 0,8	2,2 ± 0,8
		Phú Thuận		04	5,5 ± 0,7	2,6 ± 0,6
2	12/7/2019	Diên Hương	Postarvae (30-35)	05	4,6 ± 0,6	2,1 ± 0,5
		Phú Thuận		04	6,5 ± 0,7	3,3 ± 0,4
3	13/8/2019	Diên Hương	Tôm thương phẩm (40)	06	9,6 ± 0,8	6,6 ± 0,4
		Phú Thuận		05	10,2 ± 0,7	8,3 ± 0,3

Nghiên cứu độc lực của một số chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) nuôi tại Thừa Thiên Huế

### 3.2. Đặc điểm sinh hoá các chủng vi khuẩn *V. parahamolyticus* phân lập được

Các chủng vi khuẩn *V. parahamolyticus* phân lập khá đồng nhất về đặc điểm sinh hoá (Bảng 2) và trùng với đặc điểm sinh hoá của chủng đối chứng STIR0012014. Các chủng vi khuẩn này đều có khả năng di động, cho phản ứng dương tính với Oxidase, Lysine Decarboxylase, Glucose, Indol, có khả năng khử Nitrate thành Nitrite và đều tạo khuẩn lạc có màu xanh trên môi trường TCBS và màu tím hoa cà trên môi trường CHROMagar.

### 3.3. Kết quả khảo sát các yếu tố độc lực của các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập được trong điều kiện *in vitro*

Kết quả sàng lọc các chủng *V. parahamolyticus* phân lập được có khả năng gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm bằng bộ test IQ Plus™ AHPND/EMS Plasmid Kit được thể hiện ở bảng 3 và hình 1.

Trong 8 chủng *V. parahaemolyticus* phân lập được chỉ có 4 chủng TTH010101001, TTH010201003, TTH010202003, TTH010103002 là có khả năng gây bệnh AHPND (Hình 1). Hai chủng *V. parahaemolyticus* TTH020201001 và TTH020202001 không gây bệnh AHPND trên tôm nuôi.

Một số yếu tố độc lực như khả năng sản sinh các loại enzyme (caseinase, phospholipase), khả năng di động, hoạt tính dung huyết trên các loại môi trường thạch máu của các chủng vi khuẩn được trình bày ở bảng 4.

Kết quả khảo sát một số yếu tố độc lực của 8 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập được cho thấy 4 chủng vi khuẩn TTH010101001, TTH010201003, TTH010202003, TTH010103002 là những chủng mang gen độc lực trên plasmid có khả năng phá huỷ gan tụy tôm đều sản sinh caseinase (Hình 3A), phospholipase, di động (Hình 3B) và khả năng tan huyết (Hình 4A) cao hơn các chủng còn lại ( $P < 0,05$ ) (Bảng 5), chứng tỏ độc lực của các chủng này cao hơn các chủng còn lại.

**Bảng 2. Đặc điểm sinh hóa của các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập được từ mẫu tôm bệnh và chủng STIR0012014 (Đại học Stirling, Vương quốc Anh) được sử dụng làm kết quả so sánh**

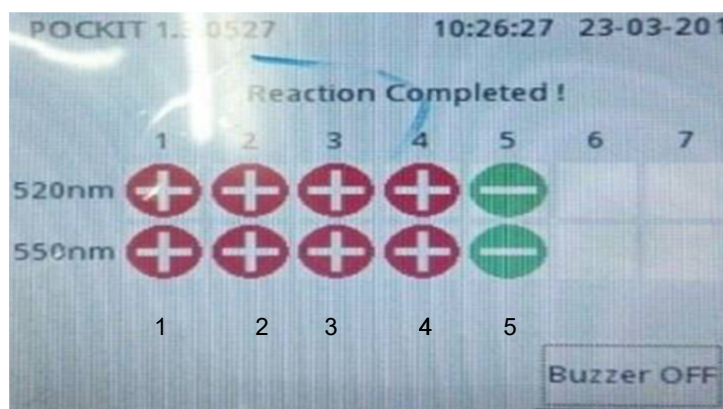
STT	Chỉ tiêu hình thái, sinh lý, sinh hoá	<i>V. parahaemolyticus</i> STIR0012014	Tỷ lệ % chủng vi khuẩn phân lập	
			Dương tính	Âm tính
1	Gram	-	100	0
2	Hình dạng	Que ngắn	Que ngắn	
3	Phát triển trên TCBS	Xanh	100	
4	Phát triển CHROMagar	Tím	100	0
5	Di động	+	100	
6	Oxidase	+	100	
7	Lysine Decarboxylase	+	100	
8	Glucose	+	87,5	12,5
9	Nitrate thành Nitrite	+	87,5	12,5
10	ONPG	-		100
11	Sinh Urease	-		100
12	Phenyl Alanine Deaminase	-		100
13	Citrate	-		100
14	Esculine	-		100
15	H <sub>2</sub> S	-		100
16	Indol	+	100	0
17	Voges - Proskauer	-		100
18	Sử dụng Malonate	-	12,5	87,5

Ghi chú: (+): phản ứng dương tính; (-) phản ứng âm tính.

**Bảng 3. Kết quả sàng lọc các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử cấp trên bằng phương pháp PCR**

Địa điểm thu mẫu	Đợt thu mẫu	Chủng vi khuẩn	Kết quả định danh trên môi trường CHROMagar	Gây bệnh AHPND	
Điền Hương	1	TTH010101001*	<i>V. parahaemolyticus</i>	+	
		TTH010201003*	<i>V. parahaemolyticus</i>	+	
		TTH010301001	<i>V. parahaemolyticus</i>	-	
	2	TTH010202003*	<i>V. parahaemolyticus</i>	+	
		3	TTH010103002*	<i>V. parahaemolyticus</i>	+
			TTH010203001	<i>V. parahaemolyticus</i>	-
Phú Thuận	1	TTH020201001	<i>V. parahaemolyticus</i>	-	
	2	TTH020202001	<i>V. parahaemolyticus</i>	-	

Ghi chú: (+): kết quả dương tính- gây bệnh AHPND; (-): kết quả âm tính - không gây bệnh AHPND; (\*): Chủng độc lực.



Ghi chú: (+): dương tính; (-): âm tính; 1: chủng TTH010101001, 2: chủng TTH010201003, 3: chủng TTH010202003, 4: chủng TTH010103002, 5: đối chứng âm.

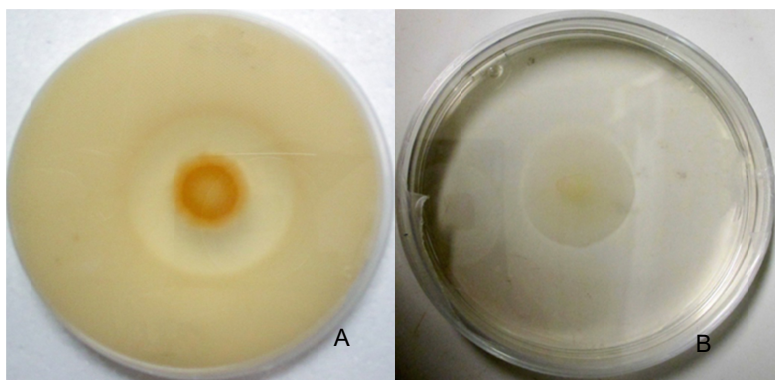
**Hình 1. Kết quả xác định gen (PirA và PirB) gây hoại tử gan tụy bằng bộ test IQ Plus™ AHPND/EMS Plasmid Kit trên máy PCR cầm tay Pockit**

**Bảng 4. Một số yếu tố độc lực của các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập được trong thí nghiệm *in vitro***

Chủng	Đường kính vùng hoạt động (mm) (giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn)				
	Caseinase	Phospholipase	Di động	Tan huyết trên thạch máu cừu	Tan máu tôm trên Rose- Bengal
TTH010101001*	22,0 <sup>a</sup> ± 1,0	17,0 <sup>c</sup> ± 0,5	37,0 <sup>e</sup> ± 0,5	17,0 <sup>g</sup> ± 0,5	(-)
TTH010201003*	22,0 <sup>a</sup> ± 0,6	18,0 <sup>c</sup> ± 0,6	37,0 <sup>e</sup> ± 0,5	18,0 <sup>g</sup> ± 0,6	(-)
TTH010301001	18,0 <sup>b</sup> ± 0,5	16,0 <sup>d</sup> ± 0,5	31,0 <sup>f</sup> ± 0,3	15,0 <sup>h</sup> ± 0,5	(-)
TTH010202003*	23,0 <sup>a</sup> ± 1,0	19,0 <sup>c</sup> ± 0,5	37,0 <sup>e</sup> ± 0,5	19,0 <sup>g</sup> ± 0,5	(-)
TTH010103002*	22,0 <sup>a</sup> ± 0,6	19,0 <sup>c</sup> ± 0,6	37,0 <sup>e</sup> ± 0,5	18,0 <sup>g</sup> ± 0,6	(-)
TTH010203001	17,0 <sup>b</sup> ± 0,4	16,0 <sup>d</sup> ± 0,5	31,0 <sup>f</sup> ± 0,3	15,0 <sup>h</sup> ± 0,5	(-)
TTH020201001	17,0 <sup>b</sup> ± 1,0	15,0 <sup>d</sup> ± 0,5	30,0 <sup>f</sup> ± 0,5	15,0 <sup>h</sup> ± 0,5	(-)
TTH020202001	18,0 <sup>b</sup> ± 0,4	16,0 <sup>d</sup> ± 0,5	32,0 <sup>f</sup> ± 0,3	16,0 <sup>h</sup> ± 0,5	(-)

Ghi chú: Giá trị trung bình trong cùng một cột với các chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ); (\*) chủng gây bệnh AHPND.

Nghiên cứu độc lực của một số chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) nuôi tại Thừa Thiên Huế



**Hình 3. Khả năng sản sinh caseinase (A) và di động (B) của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TTH010101001**

Vi khuẩn đã phát triển các hệ thống vận chuyển chuyên hoá cao nhằm hấp thu các phân tử nhỏ. Để sử dụng các phân tử lớn trong môi trường tự nhiên của sinh vật, vi khuẩn tổng hợp và giải phóng enzyme ra bên ngoài. Vi khuẩn có hai loại enzyme ngoại bào. Một loại dùng cho phân cắt các phân tử có trọng lượng lớn để giúp cho vi khuẩn có thể hấp thu được. Các enzyme ngoại bào này có sự chuyên biệt cơ chất lớn. Loại khác là những enzyme ngoại bào có vai trò độc lực và có liên quan đến khả năng gây bệnh, nhưng bản thân chúng rất ít độc tính. Vai trò gây bệnh được biết rõ với hyaluronidase, còn các loại khác chưa được chứng minh đầy đủ. Enzyme được sản sinh ra bởi một số vi khuẩn gây bệnh tương tác với các thành phần khác nhau của mô ký chủ nhiễm bệnh, vì vậy góp phần tạo ra độc lực. Các enzyme khác vẫn góp phần vào quá trình gây bệnh bằng cách phá huỷ mô của ký chủ hoặc vô hiệu hoá các cơ chế miễn dịch của ký chủ (Holder, 2018).

Một số enzyme ngoại bào như caseinase, geletinase... là những yếu tố độc lực quan trọng của nhiều vi khuẩn gây bệnh như *Vibrio*, *Aeromonas*... và liên quan trực tiếp đến đặc điểm bệnh lý của những bệnh do nhóm vi khuẩn này gây ra (Woo & cs., 2011).

Trong khi đó, khả năng di động được cho là một thuộc tính lâu đời của vi khuẩn. Nó có mối liên hệ chặt chẽ với hoá hướng động (chemotaxis) - khả năng định hướng theo gradient của một hoá chất nhất định. Sự kết

hợp giữa di động và hoá hướng động cho phép vi khuẩn phát hiện và tiếp cận chất dinh dưỡng. Tiên mao đóng vai trò như công cụ giúp vi khuẩn tiếp cận và bám vào bề mặt của ký chủ trong giai đoạn đầu của quá trình kí sinh (Josenhans & Suerbaum, 2002). Các chủng vi khuẩn gây bệnh AHPND trong nghiên cứu này đều có khả năng di động mạnh hơn các chủng không gây bệnh. Sự di động của vi khuẩn gây bệnh đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn đầu của quá trình gây nhiễm lên tế bào gan tụy của tôm nuôi.

Bên cạnh đó, khả năng sản sinh phospholipase của các chủng vi khuẩn gây bệnh AHPND trong nghiên cứu này cũng cao hơn các chủng không gây bệnh cho thấy phospholipase có thể liên quan đến quá trình phá huỷ lớp màng tế bào giúp các chủng vi khuẩn này tấn công vào ký chủ (Istivan & Coloe, 2006). Phospholipase tạo thành một phân nhóm đa dạng của các enzyme lipolytic có chung khả năng thuỷ phân một hoặc nhiều liên kết ester của phospholipid với phosphodiesterase cũng như hoạt động thuỷ phân acyl thành các axit béo. Hoạt tính phospholipase của vi khuẩn đã được chứng minh có liên quan đến khả năng gây bệnh của nhiều vi khuẩn khác nhau bao gồm cả vi khuẩn Gram (+) và Gram (-), gây ra những hội chứng bệnh khác nhau như sự phá huỷ biểu mô trên diện rộng gây hiện tượng hoại tử da. Tuy nhiên cho đến nay, cơ chế hoạt động của phospholipase trong điều kiện *in vivo* vẫn chưa được làm rõ. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh,

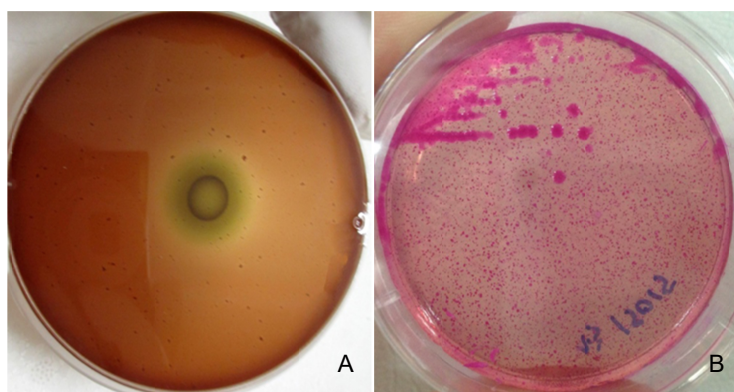


màng ngoài của nhiều loài vi khuẩn hoặc phospholipase được tiết ra nhằm gây độc tế bào, vì vậy nó chịu trách nhiệm cho các tổn thương mô trong quá trình gây nhiễm (Istivan & Coloe, 2006).

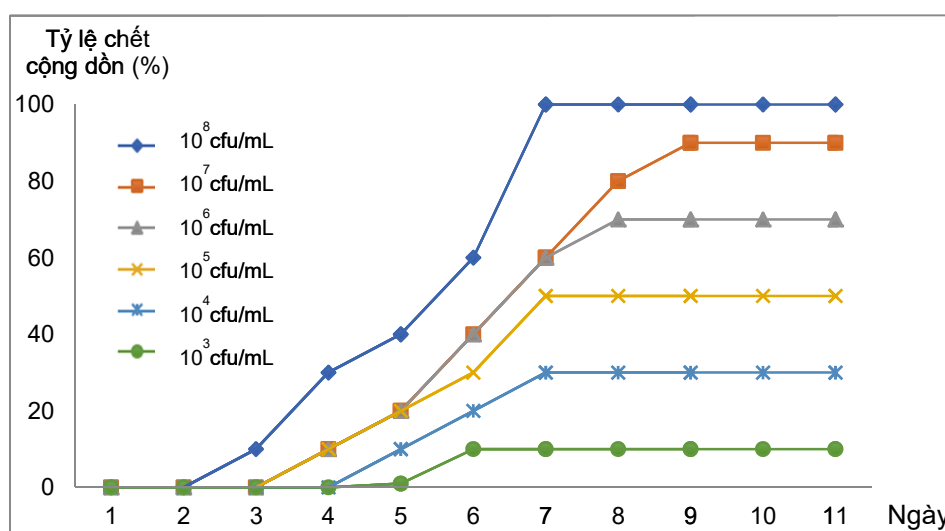
Mặc dù các chủng vi khuẩn phân lập đều gây tan huyết trên thạch máu cừu nhưng cả 8 chủng phân lập được đều không làm vỡ tế bào máu tôm trên môi trường Rose-Bengel (Hình 4 B) chứng tỏ các chủng này không gây bệnh ở hệ thống tuần hoàn. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đây về bệnh lý do *V. parahaemolyticus* gây ra trên tôm. Theo Loc & cs. (2013) bệnh lý do *V. parahaemolyticus* gây ra chỉ giới hạn trong gan tụy của tôm với các đặc điểm bệnh tích chia thành hai giai đoạn. Giai đoạn cấp tính được thể hiện bằng sự thay đổi

bất thường của các tế bào biểu mô ống lượn gan tụy, với sự bong tróc cấp tính các tế bào cấu thành ống lượn. Ở giai đoạn cuối của bệnh, bệnh tích được thể hiện với sự xuất hiện các ổ viêm tụ tế bào máu trong và giữa các ống lượn, có sự xuất hiện của các ổ vi khuẩn trong gan tụy.

Khả năng làm tan huyết trên thạch máu cừu cho thấy các chủng *V. parahaemolyticus* này có thể gây bệnh trên động vật nhưng không gây bệnh cho người (FAO, 2016) tuy nhiên Lightner & cs. (2012) cho thấy vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được lây truyền qua đường miệng, sau đó chúng xâm nhập qua đường tiêu hóa tôm, tạo ra độc tố gây phá hủy mô, làm rối loạn chức năng của gan tụy và cơ quan tiêu hóa của tôm nhưng không gây rối loạn hệ thống tuần hoàn.



**Hình 4. Chủng *V. parahaemolyticus* TTH010201003 có khả năng làm tan huyết trên thạch máu cừu (A) nhưng không phá vỡ máu tôm trên môi trường Rose-bengel (B)**



**Hình 5. Tỷ lệ chết cộng dồn (%) của tôm chân trắng cảm nhiễm với TTH010101001**



### 3.4. Khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn phân lập được trong điều kiện *in vivo*

Sau 14 ngày cảm nhiễm, chủng vi khuẩn TTH020201001 (không mang gen gây bệnh hoại tử gan tụy cấp) không gây ra tỷ lệ chết ở bất kỳ nghiệm thức nào. Tôm không có dấu hiệu bệnh lý, sau khi kết thúc thí nghiệm không tái phân lập được vi khuẩn *V. parahaemolyticus* từ khối gan tụy của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm hay đối chứng.

Trong khi đó, tỷ lệ chết ở các nghiệm thức ngâm chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TTH010101001 (mang gen gây bệnh hoại tử gan tụy cấp) phụ thuộc vào nồng độ vi khuẩn đưa vào ban đầu và được thể hiện ở hình 5.

Gây bệnh thực nghiệm bằng phương pháp ngâm không gây căng thẳng cho tôm như phương pháp tiêm và giống với điều kiện thực tế, tuy nhiên diễn biến bệnh lý sẽ chậm hơn (Ngoc Phuoc & cs., 2020). Trong nghiên cứu này, tôm thể hiện bệnh lý sau 3 ngày cảm nhiễm và tỷ lệ chết chám dứt sau 9 ngày cảm nhiễm. Tôm bị bệnh có dấu hiệu bệnh lý điển hình của bệnh hoại tử gan tụy cấp như tôm bị mềm vỏ, khối gan tụy teo và nhạt màu, ruột không có thức ăn. Vi khuẩn tái phân lập từ mẫu gan tụy được định danh là *V. parahaemolyticus* bằng kit API 20E. Như vậy, kết quả thử nghiệm khả năng gây bệnh trên tôm của chủng TTH010101001 thoả mãn định đề Kock về xác định tác nhân gây bệnh (Ngoc Phuoc & cs., 2020). Từ kết quả số lượng tôm chết ở các thí nghiệm, liều gây chết 50% ( $LD_{50}$ ) của chủng TTH010101001 là  $10^5$  cfu/mL.

## 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 8 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên mẫu tôm chân trắng bị bệnh tại Thừa Thiên Huế. Các chủng vi khuẩn phân lập được khá đồng nhất về mặt sinh hoá. Có 4/8 chủng *V. parahaemolyticus* mang gen gây bệnh hội chứng gan tụy cấp, các chủng này có khả năng di động, hoạt động thuỷ phân của các enzyme như caseinase,

phospholipase, haemolysin mạnh hơn các chủng không mang gen gây bệnh. Kết quả gây bệnh thực nghiệm cho thấy chủng không mang gen độc lực không gây bệnh trên tôm. Trong khi đó, chủng mang gen độc lực gây bệnh trên tôm sau 3 ngày cảm nhiễm với dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của bệnh hoại tử gan tụy cấp ngoài tự nhiên. Giá trị  $LD_{50}$  của chủng *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực là  $10^5$  cfu/mL.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Austin X.H. & Zhang B. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Letter in Application Microbiology. 43:119–124.
- Barrow G.I. & Feltham R.K.A. (1993). Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria, 3<sup>rd</sup> edn. Cambridge University Press, Cambridge. p. 262.
- Chang C.F., Chen H.Y., Su M.S. & Liao I.C. (2000). Immunomodulation by dietary beta-1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol. 10(6):505-14.
- Corteel M. (2016). A holistic management approach to EMS. Retrieved from <http://advocate.gaalliance.org/a-holistic-management-approach-to-ems>, February 24, 2020.
- Cục Thú y (2014). Báo cáo hàng năm về dịch bệnh trên động vật thuỷ sinh năm 2014.
- Cục Thú y (2015). Báo cáo hàng năm về dịch bệnh trên động vật thuỷ sinh năm 2015.
- Cục Thú y (2016). Báo cáo hàng năm về dịch bệnh trên động vật thuỷ sinh năm 2016 và kế hoạch năm 2017.
- De Schryver P., Defoirdt T. & Sorgeloos P. (2014). Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming. PLoS pathogens. 10(4): e10033919.
- 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). FAO fisheries and aquaculture report No. 1053, Ha Noi, Vietnam, 54 pp. ISSN 2070-6987.
- FAO (2016). FAO second international technical seminar/workshop on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). There is a way forward. FAO technical cooperation programme; TCP/INT/3501 and TCP/INT/3502. Sukosol Hotel, Bangkok, Thailand, 23-25 June 2016.

- Flegel T.W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 110: 166-173.
- Hara-Kudo Y., Nishina T., Nakagawa H., Konuma H., Hasegawa J. & Kumagai S. (2001). Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Application and Environmental Microbiology*. 67: 5819-5823.
- Holder I.A. (2018). Bacterial enzymes and virulence. CRC Press. Taylor & Francis Group.
- Istivan T.S. & Coloe P.J. (2006). Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology*. 152(5): 1263-1274.
- Josenhans C. & Suerbaum S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*. 291(8): 605-614.
- Kondo H., Tinwongger S., Proespraiwong P., Mavichak R., Unajak S.M., Nozaki R. & Hirono I. (2014). Draft genome sequence of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Gnome Announc*. 2: e00221.
- Kondo H., Van P.T., Dang T.L. & Hirono I. (2015). Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announc*. 3(5): e00978-15.
- Lee C.T., Chen I.T., Yang Y.T., Lien I.H. & Lo C.F. (2014). Involvement of Pir toxin of *Vibrio parahaemolyticus* in inducing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. Paper presented at the 9<sup>th</sup> symposium on disease in Asian aquaculture (DAA9), Ho Chi Minh city, Vietnam, 24-28 November, 2014.
- Lightner D.V., Redman R.M., Pantoja C.R., Noble B.L. & Loc T. (2012). Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global aquaculture advocate* January/February. p. 40.
- Lightner D.V. (2014). Documentation of a unique strain of *Vibrio parahaemolyticus* as the agent of early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) affecting Penaeid shrimp with note on the putative toxins. Paper presented at the 9<sup>th</sup> symposium on disease in Asian aquaculture (DAA9), Ho Chi Minh city, Vietnam, 24-28 November.
- Lo C.F., Lee C.T., Chen I.T., Yang Y.T. & Wang H.C. (2014). Recent advances in the newly emergent acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Paper presented at the 9<sup>th</sup> symposium on disease in Asian aquaculture (DAA9), Ho Chi Minh city, Vietnam, 24-28 November.
- Loc T., Linda N., Rita M.R., Leone L.M., Carlos R.P., Kevin F. & Lightner D.V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 105(1): 45-55
- Nakashima Y., Oho M., Kusaba K., Nagasawa Z., Komatsu O., Manome I., Araki K., Oishi H. & Nakashima M. (2007). A chromogenic substrate culture plate for early identification of *Vibrio vulnificus* and isolation of other marine Vibrios. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 37(4): 330-4.
- Natrah F.M., Ruwandeeepika H.A., Pawar S., Karunasagar I., Sorgeloos P., Bossier P. & Defoirdt T. (2011). Regulation of virulence factors by quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Veterinary Microbiol*. 154: 124-9.
- Ngoc Phuoc N., Richards R. & Crumlish M. (2020). Establishing bacterial infectivity models in striped Catfish *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage) with *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Fish Diseases*. 43: 371-378.
- Thompson F.L., Iida T. & Swings J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68: 403-431.
- Tinwongger S., Proespraiwong P., Thawosuwan J., Sriwanayos P., Kongkunmerd J., Chaweepack T., mavichak R., Unajak S., Nozaki R., Kondo H. & Hirono I. (2014). Development of PCR diagnosis for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathol*. 49: 159-164.
- Tổng cục thủy sản (2012). Báo cáo tóm tắt Quy hoạch tổng thể phát triển ngành thủy sản đến năm 2020, tầm nhìn 2030. tr. 74-82.
- Woo P.T., Leatherland J.F. & Bruno D.W. (2011). Fish diseases and disorders, Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections. Retrieved from <https://www.cabi.org/bookshop/book/9781845935542>, on February 2, 2020.
- Yang Y.T., Chen I.T., Lee C.T. & Chen C.Y. (2014). Draft genome sequence of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Gonome Announc*. 2: e00816.
- Zorriehzahra M.J. & Banaederakhshan R. (2015). Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. *Adv. Amin. Vet. Sci*. 3(2s): 64-72.