

PHÂN LẬP VÀ SÀNG LỌC CÁC CHỦNG *Vibrio parahaemolyticus* GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TÍNH TRÊN TÔM THÈ CHÂN TRẮNG NUÔI TẠI PHONG ĐIỀN, THỪA THIÊN HUẾ BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ 16S *rRNA*

Isolation and screening of *Vibrio parahaemolyticus* strains to cause acute hepatopancreatic necrosis disease in white-leg shrimps cultured in Phong Dien, Thua Thien Hue using 16S *rRNA* marker

Nguyễn Văn Khanh^{1*}, Nguyễn Quang Linh¹, Trần Thúy Lan², Lê Thị Tuyết Nhân³, Trần Quang Khánh Vân⁴,
Nguyễn Thị Kim Cơ⁵, Trần Quốc Dung⁵

¹ Trung tâm Uơm tạo và Chuyển giao công nghệ, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tinh Lộ 10,
Phú Vang, TT. Huế

² Phòng thí nghiệm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tinh Lộ 10, Phú Vang, TT. Huế

³ Phòng thí nghiệm Tế bào, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tinh Lộ 10, Phú Vang, TT. Huế

⁴ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, Số 102 Phùng Hưng, tp. Huế

⁵ Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế, Số 34 Lê Lợi, tp. Huế

Tác giả liên hệ Nguyễn Văn Khanh (Thư điện tử: nvkhanh@hueuni.edu.vn)
(Ngày nhận bài (received): 11–9–2019; Ngày chấp nhận đăng (accepted): 7–10–2019)

Tóm tắt. Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND – acute hepatopancreatic necrosis disease) trên tôm thè chân trắng là một trong những bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành nuôi tôm của tỉnh Thừa Thiên Huế nói chung và huyện Phong Điền nói riêng trong những năm gần đây. Bệnh làm cho tôm chết hàng loạt ở giai đoạn 20–45 ngày tuổi (tỷ lệ tôm chết lên đến 100%) trên cả tôm sú và tôm thè chân trắng. Tác nhân gây bệnh AHPND là do các chủng vi khuẩn *Vibrio* chứa hai gen độc tố *PirA* và *PirB*, cùng nằm trên một plasmid. Bằng kỹ thuật PCR với hai cặp mồi đặc hiệu, chúng tôi đã xác định được hai chủng *Vibrio* sp. K5 và *Vibrio* sp. K21 mang hai gen độc tố *PirA* và *PirB* gây bệnh AHPND trên tôm thè chân trắng nuôi tại Phong Điền, Thừa Thiên Huế trong số năm chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập được từ các mẫu tôm bệnh phẩm. Phân tích trình tự gen 16S *rRNA* đã sàng lọc được hai chủng *Vibrio* sp. K5 và *Vibrio* sp. K21 thuộc loài *Vibrio parahaemolyticus*.

Từ khóa: *Vibrio parahaemolyticus*, AHPND, gen *PirA*, gen *PirB*

Abstract. In recent years, acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Litopenaeus vannamei* has been one of the diseases that cause serious damage to the shrimp farming industry in Phong Dien district, Thua Thien Hue province. The disease causes mass death of shrimps at the age of 20–45 days (mortality rate up to 100%) in both *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*. The agent causing AHPND is *Vibrio* spp. strains containing two *PirA* and *PirB* toxin genes on the same plasmid. Using the PCR technique with two specific primers, we identified two strains of *Vibrio parahaemolyticus*, namely K5 and K21

bearing *PirA* and *PirB* toxin genes from five isolates. The results of the sequence analysis of *16S rRNA* gene confirmed that *Vibrio* sp. K5 and *Vibrio* sp. K21 belong to *Vibrio parahaemolyticus*.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, AHPND, *PirA*, *PirB*, toxic genes

1 Đặt vấn đề

Nuôi tôm là một ngành kinh tế mang lại hiệu quả cao ở Việt Nam. Tuy nhiên, trong những năm gần đây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND – acute hepatopancreatic necrosis disease) thường xảy ra trên các ao nuôi tôm, bệnh phát triển nhanh, bắt đầu từ khoảng ngày thứ 8 sau khi thả nuôi, và tỷ lệ tôm chết cao nhất xảy ra trong 20 đến 30 ngày đầu tiên (lên đến 100%) trong quần thể tôm thẻ chân trắng và tôm sú, gây những tổn thất kinh tế nặng nề cho người nuôi.

Ở Việt Nam năm 2010, bệnh AHPND được ghi nhận ở các tỉnh như Ninh Thuận (16 ha), Sóc Trăng (1,719 ha), Bạc Liêu (346 ha) và Cà Mau (3,493 ha) [1]. Sau đó, bệnh này tiếp tục xảy ra và lan rộng đến 19 tỉnh thành năm 2012, 22 tỉnh thành năm 2015, 25 tỉnh thành năm 2017 với diện tích nuôi tôm bị nhiễm bệnh lần lượt tương ứng là 28.005 ha, 9.284 ha và 6.793 ha, làm giảm đáng kể sản lượng tôm nuôi của Việt Nam [2]. Thừa Thiên Huế có diện tích nuôi tôm trên cát lớn, đạt 418 ha với sản lượng 4.723 tấn (năm 2014) [3], cũng phải chịu thiệt hại nặng do dịch bệnh gan tụy cấp tính. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có một biện pháp phòng trị nào thực sự hiệu quả. Vì vậy, các vấn đề liên quan đến các chủng *Vibrio* gây bệnh, các yếu tố kháng nguyên, độc tố cũng đã và đang được quan tâm nghiên cứu.

Tác nhân gây bệnh AHPND được xác định là các chủng *Vibrio parahaemolyticus* cụ thể [4]. Các chủng vi khuẩn này đều chứa hai gen *PirA* và *PirB* mã hoá cho protein độc tố nhị phân PirAB, được chứng minh là yếu tố độc lực của bệnh này [5-8]. Những kết quả nghiên cứu trên thế giới đã khẳng định hai gen *pirA* và *pirB* chịu trách nhiệm trong việc quyết định độc tính của vi khuẩn gây bệnh AHPND.

Tuy nhiên, cho đến nay chưa có công trình nghiên cứu nào về phân lập gen độc tố *PirA* và *PirB* của các chủng vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh AHPND ở tỉnh Thừa Thiên Huế được công bố. Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* mang hai gen độc tố *PirA* và *PirB* gây bệnh AHPND trên tôm thẻ chân trắng nuôi tại huyện Phong Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế nhằm góp phần nâng cao kiến thức cơ bản về mầm bệnh để phát triển các chiến lược kiểm soát dịch bệnh cho tôm nuôi.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Ba mươi mẫu tôm thẻ chân trắng có các dấu hiệu của bệnh AHPND được thu từ các ao nuôi tôm thuộc xã Điền Hương và Phong Hải, huyện Phong Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế.

Các cặp primer đặc hiệu cho các gen độc tố *PirA*, *PirB* và gen *16S rRNA* của vi khuẩn *Vibrio* được cung cấp bởi công ty PHUSA Biochem, Việt Nam (Bảng 1).

Bảng 1. Trình tự nucleotide primer xuôi và primer ngược của gen *PirA*, *PirB* và *16S rRNA*

Tên gen đích	Tên primer	Trình tự nucleotide (5'-3')	Chiều dài sản phẩm PCR (bp)
<i>PirA</i>	PirA_1F	ATGAGTAACAATATAAAAACATG	336
	PirA_336R	TTAGTGGTAATAGATTGTACAG	
<i>PirB</i>	PirB_1F	ATGACTAACGAATACGTTGTAAC	1.317
	PirB_1317R	CTACTTTTCTGTACCAAATTCAT	
<i>16S rRNA</i>	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1492 bp
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	

Một số hóa chất chủ yếu được sử dụng trong nghiên cứu bào gồm TCBS Agar (Himedia, Ấn Độ), peptone (Bio Basic, Mỹ), NaCl (Merck, Đức), tris HCl (Merck, Đức), EDTA (Merck, Đức), CTAB (Merck, Đức), phenol (Merck, Đức); chloroform (Merck, Đức), isoamylalcohol (Merck, Đức), isopropanol (Merck, Đức), ethanol (Merck, Đức), Tris base (Merck, Đức), acetic acid (Merck, Đức), SafeView™ Classic (Abm, Canada), RNase A solution (Promega, Mỹ), PCR Master mix (Promega, Mỹ).

2.3 Phương pháp

Thu thập mẫu tôm bệnh và mẫu bệnh phẩm

Các mẫu tôm thẻ chân trắng còn sống, có các dấu hiệu lâm sàng của bệnh AHPND, như đường tiêu hóa trống rỗng, dạ dày có màu trắng đục, gan tụy teo trắng, tôm lơ ò, bỏ ăn, và vỏ mềm theo mô tả của Leaño và Mohan [9] được thu thập tại ao nuôi ở huyện Phong Điền và đóng trong túi nylon có bom oxy rồi chuyển về phòng thí nghiệm để phân tích.

Mẫu bệnh phẩm (khối gan tụy, ống tiêu hóa) được thu nhận từ tôm bị mắc bệnh AHPND theo Hướng dẫn số: 1128/TY-TS ngày 19/07/2012 của Cục Thú Y [10].

Phân lập vi khuẩn *Vibrio*

Phân lập vi khuẩn *Vibrio* từ mẫu bệnh phẩm được thực hiện theo Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 7905-1:2008 (ISO/TS 21872-1:2007) [11]. Đặc điểm hình thái của vi khuẩn được xác định theo mô tả của Trần Linh Thuốc [12] kết hợp với khóa phân loại của Bergey [13].

Tách chiết DNA tổng số của *Vibrio*

DNA tổng số từ các chủng vi khuẩn *Vibrio* được tách chiết bằng phương pháp cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) theo mô tả của Wilson [14] có cải tiến. Vi khuẩn *Vibrio* sau khi được nuôi tăng sinh trong môi trường peptone kiềm (môi trường peptone kiềm: 20 g peptone; 20 g NaCl; 1000 mL nước cất) tạo thành dung dịch huyền phù. Dung dịch huyền phù của *Vibrio* được cho vào ống eppendorf 1,5 mL, ly tâm 13.000 vòng/phút trong một phút để thu sinh khối, tiếp tục cho đến khi hết dung dịch huyền phù. Tiếp theo rửa sạch sinh khối bằng cách cho 500 μ L nước cất vào ống eppendorf, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút, đổ bỏ phần dung dịch. Cho 500 μ L CTAB 2% (5 mL tris HCl 2 M; 0,4 mL EDTA 0,5 M; 2,8 mL

NaCl 5 M; 0,2 g CTAB; 1,8 mL nước cất) vào từng ống eppendorf chứa sinh khối vi khuẩn, vortex để trộn mẫu. Mẫu được đặt vào máy ủ ở 65 °C trong thời gian một giờ (cứ sau 15 phút, vortex một lần để trộn mẫu). Tiếp đến, cho hỗn hợp PCI (25 mL phenol; 24 mL chloroform; 1 mL isoamylalcohol) vào với tỉ lệ hỗn hợp vi khuẩn:PCI = 1:1, vortex để trộn mẫu. Tiến hành ly tâm 13.000 vòng/phút ở 4 °C trong 15 phút. Sau khi ly tâm, lúc này mẫu sẽ được chia thành ba phần, hút dịch nổi phía trên chuyển vào ống eppendorf 1,5 mL mới, cho isopropanol vào ống eppendorf với tỉ lệ dịch nổi:isopropanol = 1:1. Ủ hỗn hợp này ở -40 °C từ 1 đến 2 giờ để kết tủa DNA. Mẫu sau khi ủ được ly tâm 13.000 vòng/phút ở 4 °C trong 15 phút và thu được một lượng kết tủa nhỏ ở đáy ống eppendorf. Tiến hành đổ hết phần dung dịch lỏng ra để lấy DNA lắng phía dưới, rửa lại bằng 500 µL cồn 70%, ly tâm 13.000 vòng/phút ở 4 °C trong 2 phút, đổ bỏ cồn và ủ ở 37 °C trong 50 phút, sau khi mẫu khô được hòa tan trong 25 µL nước cất. DNA tổng số của *Vibrio* được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% với điện thế cung cấp là 80 V trong đệm TAE 1X (40 mM Tris base (pH = 7,6); 20 mM acetic acid; 1 mM EDTA) với thuốc nhuộm SafeView™ Classic (tỷ lệ TAE 1X: SafeView™ Classic = 20:1). Đối với những mẫu có DNA tổng số được thêm 1µL RNase A Solution, ly tâm nhẹ và ủ ở 37 °C trong một giờ, sau đó bảo quản ở 4 °C.

Phản ứng PCR

Để nhận biết các chủng vi khuẩn *Vibrio* đã phân lập từ tôm bệnh có phải là tác nhân gây bệnh AHPND hay không, DNA tổng số thu được từ các chủng *Vibrio* được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR phân lập gen *PirA*, *PirB* mã hóa kháng nguyên độc tố nhị phân PirAB gây bệnh AHPND trên tôm với hai cặp primer đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide được đăng ký trên GenBank có mã số KU556825.1 (Bảng 1). Thành phần phản ứng PCR phân lập gen *PirA* và *PirB* được trình bày ở Bảng 2.

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy luân nhiệt MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (BioRad, Mỹ) với chu trình nhiệt: biến tính ở 95 °C/5 phút; 35 chu trình: 95 °C/30 giây, 53 °C/30 giây, 72 °C/90 giây; cuối cùng 72 °C/30 phút và bảo quản ở 4 °C. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1% với điện thế cung cấp là 80 V trong đệm TAE 1X với thuốc nhuộm SafeView™ ClassicSafeView (tỷ lệ TAE 1X: SafeView™ ClassicSafeView = 20:1). Sản phẩm điện di được quan sát trên máy Ultra Slim LED Illuminator (Miulab, Trung Quốc).

Bảng 2. Thành phần phản ứng PCR phân lập gen *PirA* và *PirB*

Thành phần	Thể tích (µL)
PCR Master mix	5
Primer F (10 pmol)	1
Primer R (10 pmol)	1
DNA tổng số	1
DW (nước cất vô trùng)	2
Tổng thể tích	10

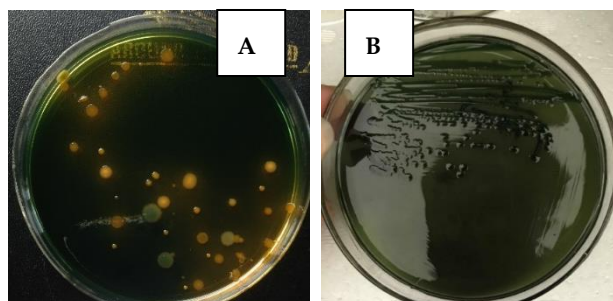
Định danh *Vibrio parahaemolyticus* bằng chỉ thị phân tử 16S rRNA

DNA tổng số của các chủng vi khuẩn *Vibrio* được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR với cặp primer đặc hiệu khuếch đại đoạn gen 16S rRNA: 27F-5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R-5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3 để khuếch đại đoạn gen 16S rRNA có kích thước 1492 bp. Thành phần phản ứng PCR gồm: 30 µL PCR Master mix, 6 µL primer F (10 pmol), 6 µL primer R (10 pmol), 6 µL DNA tổng số (50 ng); 12 µL nước cất vô trùng. Phản ứng PCR được thực hiện trong máy luân nhiệt MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Biorad, Mỹ) theo chu trình: 95 °C/10 phút; 30 chu kỳ: 95 °C/30 giây, 53 °C/30 giây, và 72 °C/1 phút; cuối cùng 72 °C/10 phút. Sản phẩm PCR đối với gen 16S rRNA được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra chất lượng trước khi gửi mẫu đi phân tích trình tự DNA. Gel được nhuộm bằng Safe View™ Classic và quan sát dưới ánh sáng huỳnh quang bằng máy Ultra Slim LED Illuminator (Miulab, Trung Quốc). Sản phẩm PCR đoạn gen 16S rRNA được gửi đến Công ty Apical Scientific Sdn Bhd (Selangor, Malaysia) để giải trình tự theo phương pháp sử dụng các dideoxynucleotide của Sanger bằng máy giải trình tự gen tự động ABI 3130XL. Trình tự nucleotide của gen 16S rRNA được phân tích bằng phần mềm BioEdit và so sánh mức độ tương đồng với trình tự đã được công bố trên GenBank bằng chương trình BLAST để định danh loài vi khuẩn.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập các chủng *Vibrio* từ mẫu tôm bệnh AHPND

Ba mươi mẫu bệnh phẩm từ tôm mắc bệnh AHPND đã được sử dụng để phân lập vi khuẩn *Vibrio* trên môi trường TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose). Các chủng vi khuẩn phát triển trên môi trường TCBS có khuẩn lạc hình tròn, lồi, bờ đều, màu xanh, đường kính 2–3 mm (Hình 1). Chúng là các vi khuẩn gram âm, hình que ngắn, có khả năng di động trong môi trường lỏng. Dựa theo Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 7905-1:2008 (ISO/TS 21872-1:2007) [11], Trần Linh Thuộc [12], Bergey và Holt [13], bước đầu chúng tôi đã lựa chọn được 5 chủng *Vibrio* và đặt tên là K2, K5, K15, K21 và K27 để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Các đặc điểm tương tự cũng được ghi nhận trong các nghiên cứu phân lập và định danh các chủng vi khuẩn *V. parahemolyticus* từ tôm bệnh AHPND nuôi ở Bạc Liêu [15] và trong nghiên cứu các đặc điểm của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh chết sớm ở tôm ở Thừa Thiên Huế [16]. Tran và cs. thông qua các thí nghiệm cảm nhiễm trên tôm đã xác định được nguyên nhân gây bệnh AHPND là do vi khuẩn và vi khuẩn này có quan hệ gần nhất với loài *V. parahemolyticus* [4].



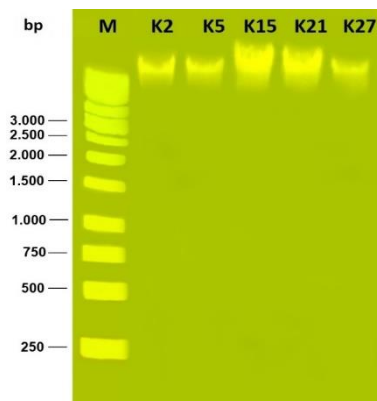
Hình 1. Các khuẩn lạc *Vibrio* trên môi trường TCBS (A); Các khuẩn lạc *Vibrio* trên môi trường TCBS đã được làm thuần (B)

3.2 Tách chiết DNA tổng số

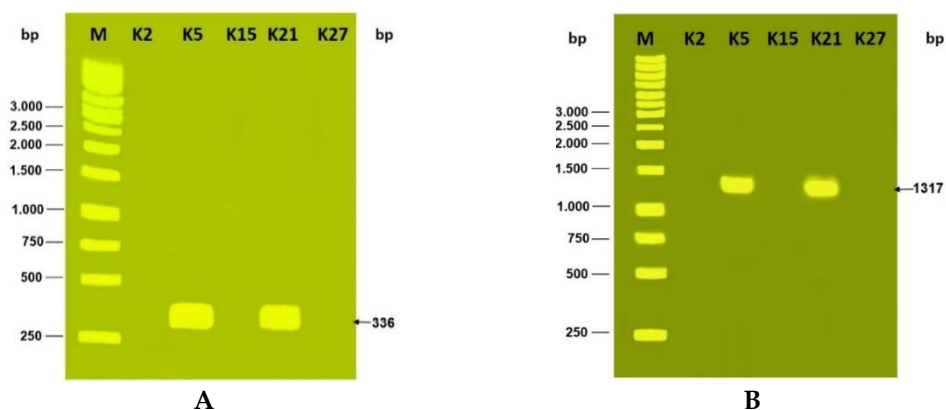
Để định danh các chủng vi khuẩn *V. parahemolyticus* dựa trên chỉ thị phân tử *16S rRNA*, bước đầu tiên là tách chiết DNA tổng số của các chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. đã thu được. DNA tổng số của các chủng vi khuẩn sau khi tách chiết được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra chất lượng. Kết quả điện di được trình bày trên Hình 2. Điện di đồ trên Hình 2 cho thấy sản phẩm DNA tổng số tách chiết được tập trung thành băng to, rõ. Điều này chứng tỏ DNA tổng số tách chiết được là sạch, rất ít đứt gãy, đảm bảo chất lượng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3 Xác định các chủng *Vibrio* gây bệnh AHPND

Từ năm chủng *Vibrio* sp. phân lập được, để sàng lọc các chủng gây bệnh AHPND (các chủng mang đồng thời cả hai gen độc tố *PirA* và *PirB*), phản ứng PCR với hai cặp primer đặc hiệu cho hai gen độc tố *PirA* và *PirB* (Bảng 1) đã được thực hiện với thành phần phản ứng (Bảng 2) và chu trình nhiệt như đã trình bày ở phần phương pháp nghiên cứu. Các sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di sản phẩm PCR được trình bày trên Hình 3.



Hình 2. Điện di đồ DNA tổng số của 5 chủng *Vibrio* phân lập được. M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientefitic); K2, K5, K15, K21 và K27: DNA của các chủng *Vibrio* sp. K2, K5, K15, K21 và K27



Hình 3. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen độc tố *PirA* (A) và *PirB* (B). M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientefitic); K2, K5, K15, K21 và K27: sản phẩm khuếch đại gen độc tố của các chủng *Vibrio* sp. K2, K5, K15, K21 và K27

Điện di đồ ở Hình 3A cho thấy ở hai chủng K5 và K21 xuất hiện băng DNA (sản phẩm PCR khuếch đại gen độc tố *PirA*) có kích thước khoảng 336 bp tương ứng với kích thước dự đoán. Điện di đồ ở Hình 3B cho thấy, ở hai chủng K5 và K21 xuất hiện băng DNA (sản phẩm PCR khuếch đại gen độc tố *PirB*) có kích thước khoảng 1317 bp tương ứng với kích thước dự đoán. Như vậy, chỉ có hai chủng *Vibrio* sp. K5 và *Vibrio* sp. K21 mang đồng thời cả hai gen *PirA* và *PirB*. Tóm lại, từ năm chủng *Vibrio* phân lập đã sàng lọc được hai chủng gây bệnh AHPND trên tôm là *Vibrio* sp. K5 và *Vibrio* sp. K21.

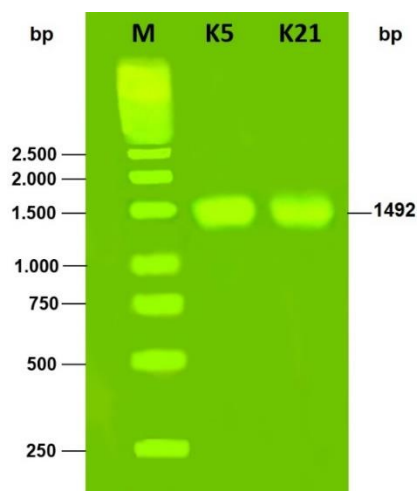
Kết quả này phù hợp với công bố của Han và cs. [6] Gen *PirA-like* và *PirB-like* có kích thước lần lượt là 336 bp và 1.317 bp mã hoá cho protein có kích thước tương ứng khoảng 13 và 50 kDa ở các chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND trên tôm. Trong một công bố khác, nhóm nghiên cứu này đã cho thấy các gen độc tố *PirA-like* và *PirB-like* này cùng nằm trên một plasmid có kích thước lớn (69–70 kb) [5].

Restrepo và cs. đã giải trình tự bộ gen của chủng *V. parahaemolyticus* Ba94C2 gây bệnh AHPND phân lập từ một ao nuôi tôm ở Nam Mỹ. Chủng vi khuẩn này mang các gen độc tố *PirA* và *PirB* cũng như trình tự plasmid tương tự như kết quả đã công bố trước đó của các chủng phân lập ở Đông Nam Á, nhưng chủng này lại ít liên quan đến chủng phân lập ở Mexico [17].

3.4 Định danh *Vibrio parahaemolyticus* bằng chỉ thị phân tử *16S rRNA*

Hai chủng vi khuẩn được xác định là chủng gây bệnh AHPND tiếp tục được định danh bằng giải trình tự gen *16S rRNA*. Gen *16S rRNA* của các chủng *Vibrio* K5 và K21 được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp primer đặc hiệu như đã trình bày ở phần phương pháp nghiên cứu. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra. Kết quả điện di được trình bày trên Hình 4.

Điện di đồ ở Hình 4 cho thấy các sản phẩm dương tính của phản ứng PCR có kích thước khoảng 1492 bp như dự đoán. Sản phẩm dương tính của phản ứng PCR với cặp primer nhận biết đoạn gen *16S rRNA* của hai chủng *Vibrio* sp. K5 và *Vibrio* sp. K21 (Hình 4) đã được giải trình tự nucleotide.



Hình 4. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại gen *16S rRNA* của các chủng vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh AHPND ở tôm. M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientetific); K5 và K21: sản phẩm PCR của chủng *Vibrio* sp. K5 và *Vibrio* sp. K21

Kết quả BLAST trên GenBank cho thấy trình tự đoạn gen *16S rRNA* của chủng vi khuẩn *Vibrio sp.* K5 tương đồng 100% với trình tự đoạn gen *16S rRNA* của *Vibrio parahaemolyticus* KT986132.1 (Hình 5). Kết quả này cho thấy chủng vi khuẩn *Vibrio sp.* K5 thuộc loài *Vibrio parahaemolyticus*.

Query	1	TGCAAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGC	60
Sbjct	17	TGCAAGTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGC	76
Query	61	GGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGATAACCATTGAAACGAT	120
Sbjct	77	GGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGATAACCATTGAAACGAT	136
Query	121	GGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAG	180
Sbjct	137	GGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAG	196
Query	181	GATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCC	240
Sbjct	197	GATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCC	256
Query	241	TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACG	300
Sbjct	257	TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACG	316
Query	301	GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTG	360
Sbjct	317	GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTG	376
Query	361	TGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGTAGTTAA	420
Sbjct	377	TGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGTAGTTAA	436
Query	421	TAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC	480
Sbjct	437	TAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC	496
Query	481	GCGGTAATACGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGT	540
Sbjct	497	GCGGTAATACGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGT	556
Query	541	GGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTTGAAACTGG	600
Sbjct	557	GGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTTGAAACTGG	616
Query	601	CAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA	660
Sbjct	617	CAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA	676
Query	661	TCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGA	720
Sbjct	677	TCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGA	736
Query	721	AAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTAC	780
Sbjct	737	AAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTAC	796
Query	781	TTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCCTGG	840
Sbjct	797	TTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCCTGG	856
Query	841	GGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA	900

Sbjct	857	GGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA	916
Query	901	GCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAC	960
Sbjct	917	GCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAC	976
Query	961	TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC	1020
Sbjct	977	TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC	1036
Query	1021	AGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTGTTT	1080
Sbjct	1037	AGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTGTTT	1096
Query	1081	GCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGG	1140
Sbjct	1097	GCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGG	1156
Query	1141	GGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGC	1200
Sbjct	1157	GGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGC	1216
Query	1201	ATACAGAGGGCGGCCAACTTGCAGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGG	1260
Sbjct	1217	ATACAGAGGGCGGCCAACTTGCAGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGG	1276
Query	1261	ATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATG	1320
Sbjct	1277	ATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATG	1336
Query	1321	CCACGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCT	1380
Sbjct	1337	CCACGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCT	1396
Query	1381	GCAAAAAGAAGTAGGTAGTTTAACTTCGGGGGGACGC	1417
Sbjct	1397	GCAAAAAGAAGTAGGTAGTTTAACTTCGGGGGGACGC	1433

Hình 5. Kết quả so sánh trình tự nucleotides của đoạn gen *16S rRNA* của chủng *Vibrio* sp. K5 với chủng *Vibrio parahaemolyticus* KT986132.1 trên GenBank

Tương tự, kết quả BLAST trên GenBank cho thấy trình tự đoạn gen *16S rRNA* của chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. K21 tương đồng 99,57% với trình tự đoạn gen *16S rRNA* của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* MG593205.1 (Hình 6). Kết quả này cho thấy chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. K21 thuộc loài *Vibrio parahaemolyticus*.

Query	1	GTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACG	60
Sbjct	3	GTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACG	62
Query	61	GGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTA	120
Sbjct	63	GGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTA	122
Query	121	ATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATAT	180
Sbjct	123	ATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATAT	182

Query	181	GCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCT	240
Sbjct	183	GCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCT	242
Query	241	GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG	300
Sbjct	243	GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG	302
Query	301	CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGA	360
Sbjct	303	CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGA	362
Query	361	AGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGGAGTTAATAGCT	420
Sbjct	363	AGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCT	422
Query	421	GCATCATTTGACGTTAGCTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT	480
Sbjct	423	GCATCATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT	482
Query	481	AATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTT	540
Sbjct	483	AATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTT	542
Query	541	GTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGAC	600
Sbjct	543	GTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGAC	602
Query	601	TAGAGTACTGTAGAGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGA	660
Sbjct	603	TAGAGTACTGTAGAGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGA	662
Query	661	AGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCG	720
Sbjct	663	AGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCG	722
Query	721	TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGGA	780
Sbjct	723	TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGGA	782
Query	781	GGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGT	840
Sbjct	783	GGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGT	842
Query	841	ACGGTCGCAAGATTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATG	900
Sbjct	843	ACGGTCGCAAGATTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATG	902
Query	901	TGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTT	941
Sbjct	903	TGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTT	943

Hình 6. Kết quả so sánh trình tự gen *16S rRNA* của chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. K21 với chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* MG593205.1 trên GenBank

Đặng Thị Lua và cs., sử dụng kỹ thuật PCR với cặp primer đặc hiệu để nhận biết gen độc tố và giải trình tự *16S rDNA*, đã khẳng định có ít nhất 3 chủng vi khuẩn gây bệnh AHPND trên tôm nuôi nước lợ ở Việt Nam: hai chủng vi khuẩn thuộc loài *Vibrio parahaemolyticus* và một chủng thuộc loài *Vibrio harveyi* [18].

Đỗ Thị Thanh Dung và cs. dựa trên kết quả phân tích trình tự *16S rDNA* đã xác định được hai chủng chủng có khả năng gây bệnh AHPND trên tôm nuôi ở tỉnh Sóc Trăng đều là *V. parahaemolyticus* [19].

Kongrueng và cs. đã phân lập được 33 chủng *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh AHPND từ tôm của năm trang trại ở tỉnh Pattani và Songkhla thuộc miền Nam Thái Lan [20]. Kết quả nghiên cứu của Khimmakthong và cs. cho thấy *V. parahaemolyticus* có thể lây lan nhanh chóng bằng cách lấy gan tụy làm mô đích. Sau 6 giờ gây nhiễm bệnh, *V. parahaemolyticus* được phát hiện trong khối gan tụy của tôm, sau đó chúng bắt đầu bị loại bỏ bởi hệ thống miễn dịch trong khi độc tố của chúng vẫn gây ra hại cho gan tụy của tôm cho đến 72 giờ sau khi gây nhiễm hoặc cho đến khi tôm chết [21].

4 Kết luận và kiến nghị

Từ năm chủng *Vibrio* sp. phân lập được từ các mẫu bệnh phẩm tôm thẻ chân trắng nuôi tại Phong Điền, Thừa Thiên Huế, chúng tôi đã xác định được hai chủng *Vibrio* sp. K5 và *Vibrio* sp. K21 mang đồng thời hai gen độc tố *PirA* và *PirB* có kích thước theo dự đoán tương ứng lần lượt là 336 bp và 1.317 bp. Bằng chỉ thị phân tử *16S rRNA* đã sàng lọc được hai chủng *Vibrio parahaemolyticus* K5 (tương đồng 100% với trình tự đoạn gen *16S rRNA* của *Vibrio parahaemolyticus* KT986132.1 trên GenBank) và *Vibrio parahaemolyticus* K21 (tương đồng 99,57% với trình tự đoạn gen *16S rRNA* của *Vibrio parahaemolyticus* MG593205.1 trên GenBank) gây bệnh AHPND. Những phát hiện này sẽ được sử dụng trong chẩn đoán và giám sát quần thể tôm nuôi và thông báo cho các nhà nuôi tôm để phát triển các chiến lược quản lý dịch bệnh.

Tài liệu tham khảo

1. Hien NT, Huong NTL, Chuong VD, Nga NTV, Quang PH, Hang BTV, et al., editors. Status of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and other emerging diseases of penaeid shrimps in Viet Nam. Addressing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia: Proceedings of the ASEAN Regional Technical Consultation on EMS/AHPND and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia, 22-24 February 2016, Makati City, Philippines; 2016: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
2. Dang TL, Pham AT, Phan TV. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Vietnam. The Journal of Asian Fisheries Society. 2018;31S(2018):274-82.
3. Tổng cục thủy sản. Đề án tổng thể phát triển ngành công nghiệp tôm Việt Nam đến năm 2030. 2017.
4. Tran L, Nunan L, Redman RM, Mohny LL, Pantoja CR, Fitzsimmons K, et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Diseases of Aquatic Organisms. 2013;105(1):45-55.
5. Han JE, Tang KF, Lightner DV. Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. Diseases of Aquatic Organisms. 2015;115(3):245-51.
6. Han JE, Tang KF, Tran LH, Lightner DV. 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. 2015;113(1):33-40.
7. Lee CT, Chen IT, Yang YT, Ko TP, Huang YT, Huang JY, et al. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015;112(34):10798-803.

8. Sirikharin R, Taengchaiyaphum S, Sanguanrut P, Chi TD, Mavichak R, Proespraiwong P, et al. Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. PloS one. 2015;10(5):e0126987.
9. Leaña EM, Mohan C. Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms. Global Aquaculture Advocate. 2012;2012(7/8):38-9.
10. Cục Thú Y, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. Hướng dẫn số 1128/TY-TS: Hướng dẫn thu mẫu xét nghiệm hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm nuôi (AHPNS). Hà Nội; 2012.
11. Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 7905-1:2008 (ISO/TS 21872-1:2007) về Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp phát hiện *Vibrio* spp. có khả năng gây bệnh đường ruột - Phần 1: Phát hiện *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio cholera*.
12. Thuốc TL. Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm: Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội; 2007.
13. Bergey DH, Holt JG. Bergey's manual of determinative bacteriology: Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
14. Wilson K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. In: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., Eds., Current Protocols in Molecular Biology. Wiley & Sons, New York. 1987:241-5.
15. Nghĩa NT, Oanh ĐTH, Phú TQ, Tuấn PA. 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 Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 2015;39(2015):99-107.
16. Đào NTB, Linh NQ, Khanh NV. Nghiên cứu một số đặc điểm của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh chết sớm trên tôm thẻ giống nuôi tại Điền Hương, Phong Điền, Thừa Thiên Huế. Tạp chí Khoa học Đại học Huế. 2014;98(10):13-22.
17. Restrepo L, Bayot B, Betancourt I, Pinzón A. Draft genome sequence of pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* strain Ba94C2, associated with acute hepatopancreatic necrosis disease isolate from South America. Genomics data. 2016;9(2016):143-4.
18. Lựa ĐT, Khuê NV, Vân PT. Non-*Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm nuôi. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 2016;14(5):690-8.
19. Dung ĐTT, Quang VĐ, Trang PTP. Phân lập và tuyển chọn *Lactobacillus* spp. kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây hội chứng chết sớm trên tôm tại Sóc Trăng. Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ. 2017;3(T20-2017):5-15.
20. Kongrueng J, Yingkajorn M, Bunpa S, Sermwittayawong N, Singkhamanan K, Vuddhakul V. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in southern Thailand. Journal of Fish Diseases. 2015;38(11):957-66.
21. Khimmakthong U, Sukkarun P. The spread of *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* analyzed by PCR and histopathology. Microbial pathogenesis. 2017;113:107-12.