

## 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

Nguyễn Trọng Nghĩa<sup>1</sup>, Đặng Thị Hoàng Oanh<sup>1</sup>, Trương Quốc Phú<sup>1</sup> và Phạm Anh Tuấn<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Tổng cục Thủy sản, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 01/08/2014

Ngày chấp nhận: 19/08/2015

### Title:

Isolation and determination of the ability to cause acute hepatopancreatic necrosis syndrome of *Vibrio parahaemolyticus* bacteria isolated from cultured shrimp in Bac Lieu province

### Từ khóa:

Hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính, *Vibrio parahaemolyticus*, tôm thẻ chân trắng

### Keywords:

Acute hepatopancreatic necrosis syndrome, *Vibrio parahaemolyticus*, *Litopenaeus vannamei*

### ABSTRACT

Acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) on shrimp is considered as a dangerous disease on shrimp. In Vietnam, the disease appeared in 2010 and caused significant damage to shrimp farming in the Mekong Delta. The study was carried out to isolate, identify and determine the ability to cause AHPNS of bacterial strains isolated from shrimp collected in intensive shrimp ponds in Bac Lieu province which displayed typical pathology of AHPNS such as hepatopancreatic atrophy, empty gut and showed hepatopancreatic changes including disfunction of hepatopancreatic cells, hemocytic infiltration and bacterial infection in histopathological diagnosis. The isolated bacteria were gram-negative, short rod-shaped, motile, positive with oxidase and catalase, fermentation of glucose in both aerobic and anaerobic conditions, colonies grow on thiosulfate citrate bile salt agar with green colored, round, convex and 2-3 mm in diameter. All 3 strains revealed beta hemolysis. The bacteria were identified as *Vibrio parahaemolyticus* (99.9% ID) by using API 20E kit (BioMerieux). Results of experimental infection in the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at  $10^4$  CFU/g,  $10^5$  CFU/g,  $10^6$  CFU/g showed that bacteria are capable of causing AHPNS pathology similar in shrimp collected from cultured ponds in the groups injected with  $10^5$  CFU/g (after 9 days) and  $10^6$  CFU/g (after 6 days).

### TÓM TẮT

Hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính (AHPNS) đang được xem là bệnh nguy hiểm trên tôm nuôi. Ở Việt Nam, bệnh được phát hiện vào năm 2010 và gây thiệt hại đáng kể cho tôm nuôi ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long. Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập, định danh và xác định khả năng gây hoại tử gan tụy của chủng vi khuẩn được phân lập từ tôm thu ở những ao nuôi tôm thâm canh tại tỉnh Bạc Liêu có dấu hiệu lâm sàng của bệnh hoại tử gan tụy như gan tụy teo dai, ruột rỗng kèm theo một số biến đổi mô bệnh học trên vùng gan tụy như sự thoái hóa cấp tính của các tế bào gan, sự tập trung của tế bào máu cùng với nhiễm khuẩn thứ cấp. Các chủng vi khuẩn phân lập được đều là vi khuẩn Gram âm, hình que ngắn, có thể di động, dương tính với các chỉ tiêu oxidase và catalase, lên men đường trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí, có khả năng phát triển trên môi trường thiosulfate citrate bile salt với khuẩn lạc màu xanh, tròn, lồi và đường kính 2-3 mm. Cả 3 chủng đều có khả năng gây tan huyết dạng beta. Các chủng vi khuẩn được định danh là *Vibrio parahaemolyticus* (99,9% ID) bằng kit API 20E (BioMerieux). Kết quả gây cảm nhiễm trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) khỏe với bốn nghiệm thức (tiêm 1,5% NaCl,  $10^4$  CFU/g,  $10^5$  CFU/g,  $10^6$  CFU/g) cho thấy vi khuẩn này có khả năng gây hoại tử gan tụy ở nghiệm thức tiêm  $10^5$  CFU/g (sau 9 ngày) và  $10^6$  CFU/g (sau 6 ngày) với dấu hiệu bệnh lý và mô bệnh học giống như tôm bệnh thu từ tự nhiên.

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Với hơn 700.000 ha diện tích đất ngập mặn, Việt Nam được xem là quốc gia có nhiều tiềm năng phát triển trong nghề nuôi tôm nước lợ và hiện đang là một trong 5 quốc gia đứng đầu về xuất khẩu tôm trên thế giới. Trong đó, khu vực Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) được đánh giá là nơi có tiềm năng nuôi tôm lớn nhất nước, đã và đang phát triển nhanh trong những năm gần đây. Theo thống kê của Tổng cục Thủy sản (2013), trong năm 2012, toàn quốc có 30 tỉnh thành nuôi tôm nước lợ với diện tích 657.523 ha và sản lượng đạt 446.424 tấn trong đó khu vực ĐBSCL chiếm 90,61% diện tích, 75,2% sản lượng với 595.723 ha và 358.477 tấn. Tuy nhiên, cùng với mức độ thâm canh hóa ngày càng cao và sự gia tăng về diện tích thì tình dịch bệnh diễn ra ngày càng nhiều trên diện rộng và khó kiểm soát, đe dọa nghiêm trọng đến năng suất và sự phát triển bền vững của nghề nuôi tôm. Bệnh tôm được báo cáo là có ảnh hưởng rất lớn đến nghề nuôi tôm toàn thế giới (Walker and Mohan, 2009; Lightner *et al.*, 2012; Flegel, 2012).

Theo Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương (2012), trong nhiều năm qua ở khu vực ĐBSCL hiện tượng chết hàng loạt trên tôm nuôi chủ yếu là bệnh vi-rút trong đó nguy hiểm nhất là vi-rút gây bệnh đốm trắng (White Spot Syndrome virus – WSSV). Đặc biệt với sự xuất hiện của hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính (Acute hepatopancreatic necrosis syndrome - AHPNS) hay còn gọi là Hội chứng chết sớm (Early mortality syndrome) từ đầu năm 2011 đã gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến nghề nuôi tôm trong toàn vùng.

Theo Lightner *et al.* (2012), tôm bệnh thường có một số đặc điểm mô bệnh học đặc trưng như: (i) thoái hoá 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. Ở giai đoạn cuối, 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 hoá (Flegel, 2012). Tác nhân gây nên AHPNS được xác định là do chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* duy nhất được phân lập từ dạ dày tôm bệnh hoại tử gan tụy cấp thu tại ao nuôi tôm ở tỉnh Trà Vinh và khả năng gây bệnh của chủng vi khuẩn này được xác định bằng phương pháp ngấm (Loc *et al.*, 2013). Tuy nhiên, vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đã được phân lập với tần số cao từ gan tụy của tôm bệnh hoại tử gan tụy tại một số tỉnh ĐBSCL (Quảng

Trọng Phát, 2013; Nguyễn Ngọc Thạch, 2013; Nguyễn Khắc Thoáng, 2013). Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả phân lập và xác định khả năng gây hoại tử gan tụy cấp tính bằng phương pháp tiêm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập từ gan tụy tôm AHPNS thu tại xã Vĩnh Hậu, huyện Hòa Bình, tỉnh Bạc Liêu.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phương pháp thu và phân lập vi khuẩn từ mẫu tôm bệnh

Mẫu tôm bệnh còn sống được thu tại 3 ao nuôi thuộc xã Vĩnh Hậu, huyện Hòa Bình, tỉnh Bạc Liêu. Trước khi phân lập vi khuẩn, bề mặt ngoài của tôm được khử trùng bằng cồn 70° và lau sạch. Dùng pen tách bỏ phần giáp đầu ngực, khử trùng bề mặt gan tụy tôm rồi dùng nhíp tiết trùng lấy một ít gan tụy tôm phết đều lên lame sạch có sẵn một giọt dung dịch Davidsion (không có glacial acetic acid), để khô ở nhiệt độ phòng, sau đó cố định trong dung dịch 1% acetic acid, rồi nhuộm Gram. Kế đến, dùng que cấy tiết trùng lấy một ít mẫu gan tụy cấy lên đĩa nutrient agar (NA, Merck) và môi trường thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS, Merck). Đĩa cấy được ủ 24 giờ ở 28°C. Các chủng vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường nutrient broth (NB, Merck) (có bổ sung 1.5% NaCl) trong 24 giờ ở 28°C. Sau đó được bổ sung thêm 25% glycerol và giữ ở - 80°C.

### 2.2 Phương pháp định danh vi khuẩn

Các chỉ tiêu hình thái, sinh lý sinh hóa được chọn để định danh vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* được trình bày trong Bảng 1. Hình dạng kích thước và tính rỗng của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram (Barrow and Feltham, 1993). Tính di động của vi khuẩn được quan sát bằng cách nhỏ một giọt nước cất lên lame, trải đều lên lame một ít vi khuẩn, đặt bằng lamella và quan sát bằng kính hiển vi ở vật kính 40X. Các đặc điểm sinh lý và sinh hóa được xác định dựa theo cẩm nang của Cowan and Steels (Barrow and Feltham, 1993) kết hợp với sử dụng kit API 20E (BioMerieux, Pháp).

### 2.3 Chuẩn bị vi khuẩn gây cảm nhiễm

Chủng vi khuẩn gây cảm nhiễm được nuôi tăng sinh trong môi trường NB (có bổ sung 1.5% NaCl) trong 24 giờ ở 28°C. Sau đó, ly tâm 7500 vòng/phút trong 5 phút, rửa 2 lần bằng dung dịch 1.5% NaCl. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 610 nm kết hợp với phương pháp đếm số khuẩn lạc trên môi trường thạch (CFU/ml). Sau đó pha loãng vi khuẩn

trong dung dịch 1.5% NaCl để đạt các mật độ  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  CFU/ml.

#### 2.4 Gây cảm nhiễm

Thí nghiệm cảm nhiễm được thực hiện tại phòng cảm nhiễm, bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ sử dụng keo nhựa có thể tích 5 lít. Các keo nhựa được khử trùng bằng chlorine, rửa bằng xà phòng và nước sạch, phơi để loại chlorine. Nước sử dụng thí nghiệm có độ mặn 15‰ được khử trùng bằng chlorine (nồng độ 30 ppm), sục khí liên tục để loại chlorine. Tôm sử dụng cho thí nghiệm cảm nhiễm là tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) có trọng lượng khoảng 2 g/con, khỏe mạnh được sản xuất tại Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Tôm có màu sắc sáng, phản ứng nhanh, không có tổn thương bên ngoài, gan tụy khỏe, ruột đầy. Tôm được bố trí 30 con/nghiệm thức, chia thành 10 keo nhựa mỗi keo có 3 con tôm. Có 4 nghiệm thức được bố trí, như sau: (1) đối chứng, tiêm dung dịch 1.5% NaCl; (2) tiêm vi khuẩn nồng độ  $10^4$  CFU/con; (3) tiêm vi khuẩn nồng độ  $10^5$  CFU/con; (4) tiêm vi khuẩn nồng độ  $10^6$  CFU/con. Mỗi con tôm được tiêm 50 $\mu$ l dung dịch vi khuẩn ở đốt bụng thứ 3. Thí nghiệm được theo dõi trong 10 ngày, trong quá trình thí nghiệm cho tôm ăn bằng thức ăn

viên theo nhu cầu. Mẫu tôm trước khi cảm nhiễm, sau 3, 6, 9 ngày cảm nhiễm được thu để phân tích mô bệnh học.

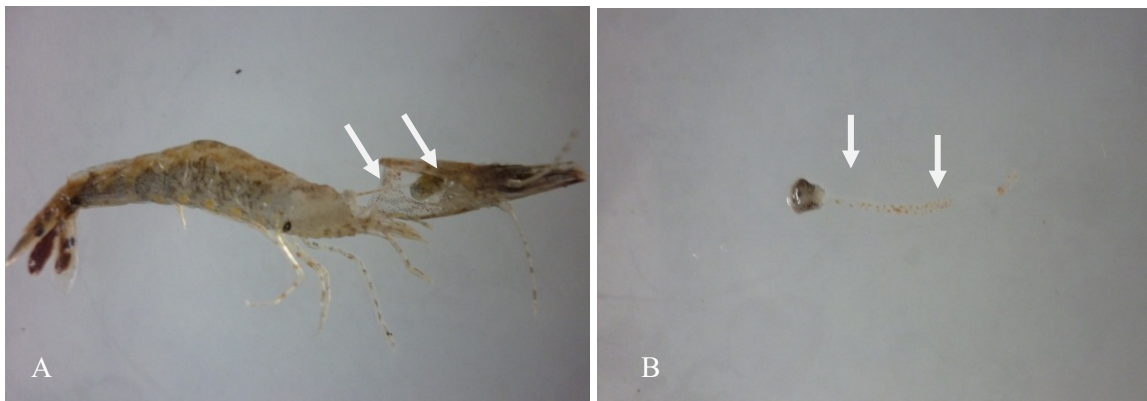
#### 2.5 Phương pháp mô học

Mẫu tôm thí nghiệm được thu và cố định trong dung dịch Davidson's AFA (theo tỉ lệ 1 phần cơ/10 phần dung dịch Davidson's) khoảng 48 giờ sau đó chuyển sang cồn 70° theo phương pháp của Lightner (1996). Sau khi cố định, mẫu tôm được cắt tia định hướng. Trước khi tiến hành đúc khối mẫu được khử nước lần lượt qua các dung dịch 70%, 80%, 95%, 100% ethyl alcohol và xylen. Sau đó mẫu được cắt ra thành từng băng dài, cho vào nước ở nhiệt độ 45-50°C làm cho parafin căng ra và dán lên lam. Tiêu bản sau đó được nhuộm với thuốc nhuộm Haematoxylin và Eosin (H&E), quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi ở các vật kính 10X, 40X và 100X.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Dấu hiệu bệnh lý của tôm thu từ ao nuôi

Tôm bệnh hoạt động chậm chạp, bỏ ăn, lờ đờ và tấp mé. Khi tách bỏ lớp vỏ đầu ngực, quan sát thấy gan tụy teo, dai, nhạt màu, ruột rỗng (Hình 1).

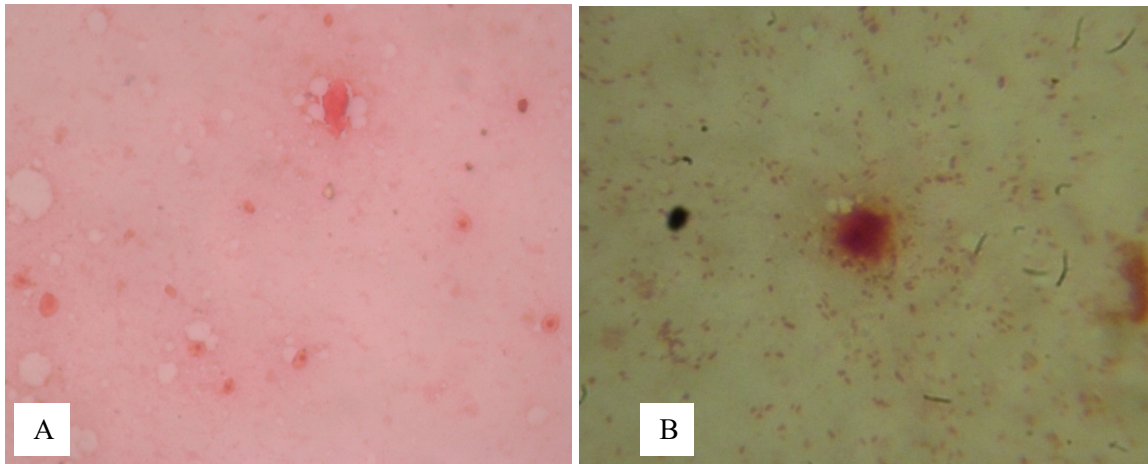


**Hình 1: Tôm có dấu hiệu gan tụy teo, dai (A) và ruột rỗng (B)**

Các dấu hiệu ghi nhận được tương tự trong mô tả của Lightner *et al.* (2012) và Flegel *et al.* (2012) về các dấu hiệu bệnh lý của tôm khi mắc phải hội chứng hoại tử gan tụy cấp tính. Lightner (2012) cho biết tôm bệnh hoại tử gan tụy trong ao nuôi thường có một số các dấu hiệu như tôm chết đầy, bỏ ăn, gan tụy teo, dai, nhạt màu, ruột rỗng và có hiện tượng mềm vỏ. Tôm nuôi có thể chết đột ngột với tỉ lệ cao trong thời gian ngắn sau khi xuất hiện các dấu hiệu bệnh đặc biệt khoảng sau 2 -3 ngày (Lê Hồng Phước và *ctv.*, 2012).

Khi quan sát các mẫu phết kính gan tụy nhuộm Gram của những mẫu tôm bệnh, phát hiện nhiều vi khuẩn gram âm, hình que trên vùng mô phết kính (Hình 2). Quan sát tiêu bản kính phết gan tụy tôm bệnh cho thấy có sự biến đổi cấu trúc của mô gan tụy, số lượng các không bào rất ít, 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 3).

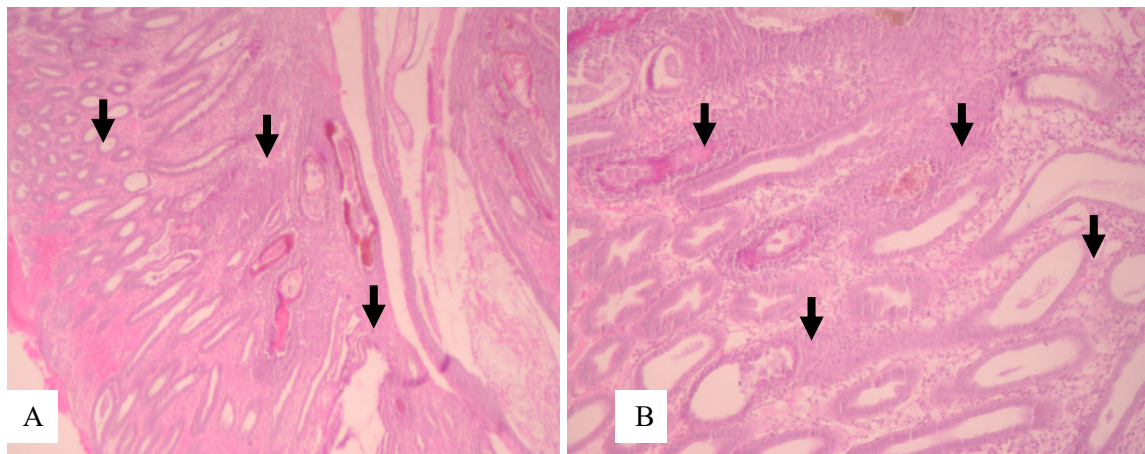




**Hình 2: Kính phết gan tụy tôm khỏe (A) và tôm bệnh với các cụm vi khuẩn gram âm hình que ngắn (B) (100X)**

Các đặc điểm mô bệnh học được ghi nhận tương tự như mô tả chi tiết trong định nghĩa bệnh hoại tử gan tụy cấp tính của Lightner *et al.* (2012). Trong nghiên cứu của Lê Hữu Tài và *ctv.* (2012) khi phân tích mô bệnh học và siêu cấu trúc của tôm hoại tử gan tụy ở khu vực ĐBSCL thấy tôm bệnh có dạng hoại tử tương ứng với dấu hiệu gan tụy teo, dai và sậm màu. Diễn biến về bệnh lý học của

hoại chứng hoại tử gan tụy là tình trạng thoái hóa cấp tính của gan tụy kèm theo sự giảm hoạt động của tế bào E, rối loạn chức năng của các tế bào B, F và R, dễ thấy những tế bào có nhân trương to, các tế bào bị bong tróc và rơi vào lòng ống gan tụy và giai đoạn cuối là sự tập trung của các tế bào máu ở giữa ống gan tụy và nhiễm khuẩn thứ cấp kèm theo hiện tượng melanin hóa (Flegel, 2012).

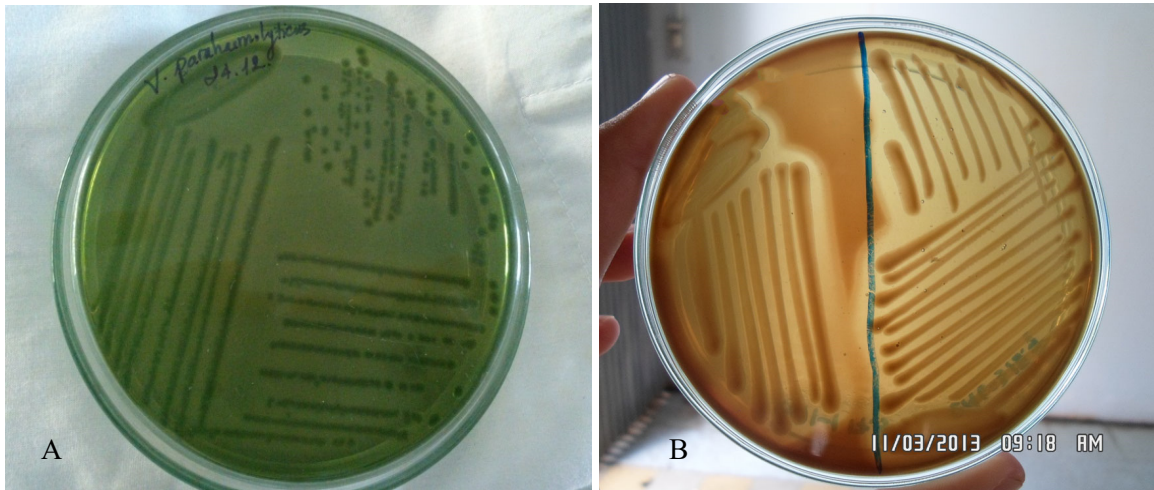


**Hình 3: Gan tụy tôm bệnh có sự biến đổi cấu trúc của mô gan tụy (A) (10X). Các tế bào gan thoái hóa và rơi vào lòng ống, các tế bào máu tập trung quanh các cụm vi khuẩn trong vùng bị hoại tử (B) (40X)**

### 3.2 Phân lập vi khuẩn và định danh vi khuẩn

Ba chủng vi khuẩn phân lập được từ gan tụy tôm bệnh của 3 thu mẫu được đặt tên là BL1, BL2 và BL3. Kết quả quan sát và phân tích các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn được phân lập từ tôm bệnh được trình bày ở Bảng 1. Các chủng vi khuẩn phát triển trên môi trường TCBS có khuẩn lạc màu xanh, tròn, lồi, đường kính 2-3 mm (Hình 4). Những khuẩn lạc

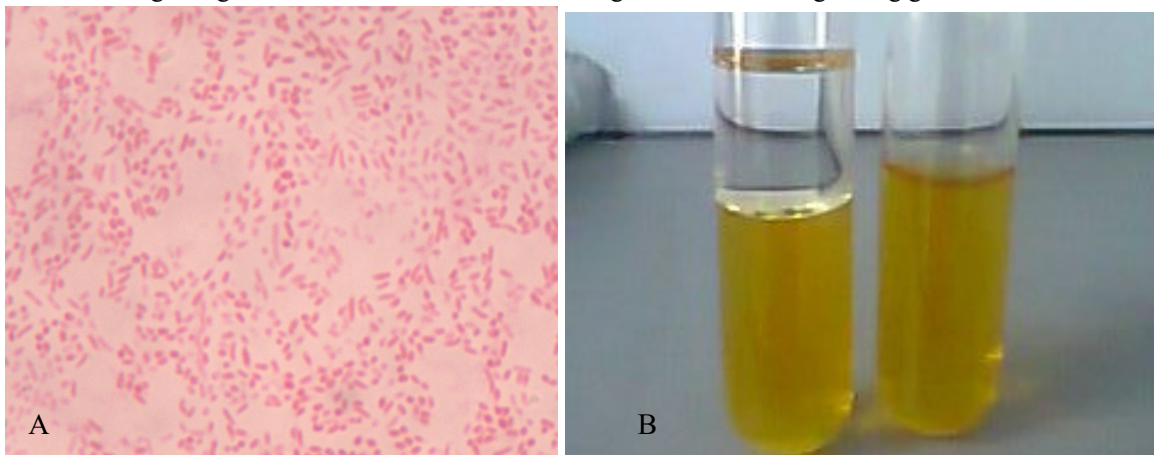
này khi được cấy truyền sang đĩa môi trường nutrient agar (NA, Merck) (có bổ sung 1.5% NaCl) thì khuẩn lạc phát triển có màu kem với hình dạng và kích thước khuẩn lạc tương tự như trên môi trường TCBS. Tất cả các chủng đều có khả năng gây tan huyết dạng beta khi cấy lên môi trường thạch máu (Blood agar base, Merck) có chứa 5% máu cừu (Công ty Nam Khoa, Thành phố Hồ Chí Minh) (Hình 4).



**Hình 4: (A) Khuẩn lạc trên môi trường TCBS; (B) tan huyết dạng beta trên môi trường máu**

Chúng là vi khuẩn gram âm, hình que (Hình 5), có khả năng di động trong môi trường lỏng, phản ứng dương tính với oxidase, catalase, có khả năng lên men đường trong điều kiện kỵ khí và hiếu khí

(Hình 5). Tất cả các chủng đều có phản ứng decarboxylase dương tính với lysine và ornithine, không sinh ureaza nhưng sinh indole, acetoin và gelatin, đều sử dụng đường glucose và manitol.



**Hình 5: A. Vi khuẩn gram âm, hình que ngắn (100X). B. Vi khuẩn lên men glucose hiếu khí và kỵ khí**

Kết quả trên cho thấy cả 3 chủng vi khuẩn phân lập từ tôm bệnh thu được có những đặc tính chung của nhóm vi khuẩn *Vibrio* là gram âm, hình que ngắn, có thể di chuyển trong môi trường lỏng, cho phản ứng catalase và oxidase dương tính, có khả năng lên men glucose trong điều kiện kỵ khí và yếm khí, mọc trên môi trường TCBS (Buller, 2004). Dựa vào đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và kết quả kiểm tra bằng kit API 20E các chủng vi khuẩn này được định danh là vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Các đặc điểm tương tự cũng được ghi nhận trong nghiên cứu định danh các chủng vi khuẩn phân lập được từ tôm bệnh hoại tử gan tụy thu ở một số tỉnh thuộc khu vực

ĐBSCL (Quảng Trọng Phát, 2013; Nguyễn Ngọc Thạch, 2013; Nguyễn Khắc Thoáng, 2013). *V. parahaemolyticus* tồn tại phổ biến ở hệ sinh thái nước mặn và vùng cửa sông trong đó có các ao nuôi thủy sản, đặc biệt là ở các nước khu vực Đông Nam Á (Wong *et al.*, 2000). Đặc biệt, *V. parahaemolyticus* có khả năng phát triển tốt hơn so với các loài vi khuẩn khác trong điều kiện nhiệt độ và độ mặn tương đối cao (Williams and Larock, 1985). Chúng có thể tồn tại tự do trong môi trường nước và nền đáy, bám trên mặt ngoài và xâm nhập vào bên trong cơ thể của các động vật phù du, cá và giáp xác (Kaneko and Colwell, 1973; Kaneko and Colwell, 1975). Kết quả điều tra về thành phần

vi khuẩn trong 24 mẫu nước thu tại cửa sông Coreaú, vùng Đông Bắc Brazil phát hiện có sự chiếm đa số của vi khuẩn này (Renata *et al.*, 2010). Ngoài ra, còn phát hiện được trên gan tụy tôm sú bệnh thu ở Uran Maharashtra, Ấn Độ với các dấu hiệu bệnh lý như chậm lớn, lờ đờ, cơ thể chuyển sang màu đỏ và chết (Abhay *et al.*, 2003). *V. parahaemolyticus* cũng được ghi nhận cùng với *V. harveyi* và *V. vulnificus* đã gây chết tôm nuôi ở Thái Lan (Nash *et al.*, 1992), Philiphine (Lavilla –

Pitogo *et al.*, 1998), Ấn Độ (Jayasree *et al.*, 2006), liên quan đến một số bệnh như nhiễm khuẩn cục bộ, nhiễm khuẩn trên gan tụy trên tôm sú, hội chứng đỏ thân và mềm vỏ trên tôm (Lightner, 1996). Gần đây, vi khuẩn này được phát hiện với tần số xuất hiện cao khi phân lập trên gan tụy tôm hoại tử gan tụy cấp tính thu tại tỉnh Bạc Liêu, Trà Vinh, Cà Mau và Sóc Trăng (Quảng Trọng Phát, 2013; Nguyễn Ngọc Thạch, 2013; Nguyễn Khắc Thoáng, 2013).

**Bảng 1: Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn phân lập từ tôm AHPNS**

Chỉ tiêu	Chủng vi khuẩn			ATCC 17802
	BL1	BL2	BL3	
Nhuộm Gram	-	-	-	-
Hình dạng	que ngắn	que ngắn	que ngắn	que ngắn
Phát triển trên TCBS	xanh	Xanh	xanh	Xanh
Di động	+	+	+	+
Sinh catalaza	+	+	+	+
Sinh oxidaza	+	+	+	+
Phản ứng lên men yếm khí	+	+	+	+
Phản ứng lên men hiếu khí	+	+	+	+
Sinh beta – galactosidaza	-	-	-	-
Aggrinine	-	-	-	-
Lysine	+	+	+	+
Ornithin	-	-	-	+
Sử dụng Citrate	-	+	-	+
Sinh H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
Sinh ureaza	-	-	-	+
Sinh tryptophane	-	-	-	-
Sinh indole	+	+	+	+
Phản ứng Voges - Proskauer	+	+	+	+
Sinh Gelatinaza	+	+	+	+
Sử dụng đường Glucose	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	-
Melibiose	-	-	-	-
Amygdalin	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-

Ghi chú: (+) dương tính, (-) âm tính

**3.3 Khả năng gây hoại tử gan tụy của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập từ gan tụy tôm AHPNS**

Kết quả gây cảm nhiễm trên tôm thẻ chân trắng (*L. vannamei*) khỏe với các nghiệm thức tiêm vi

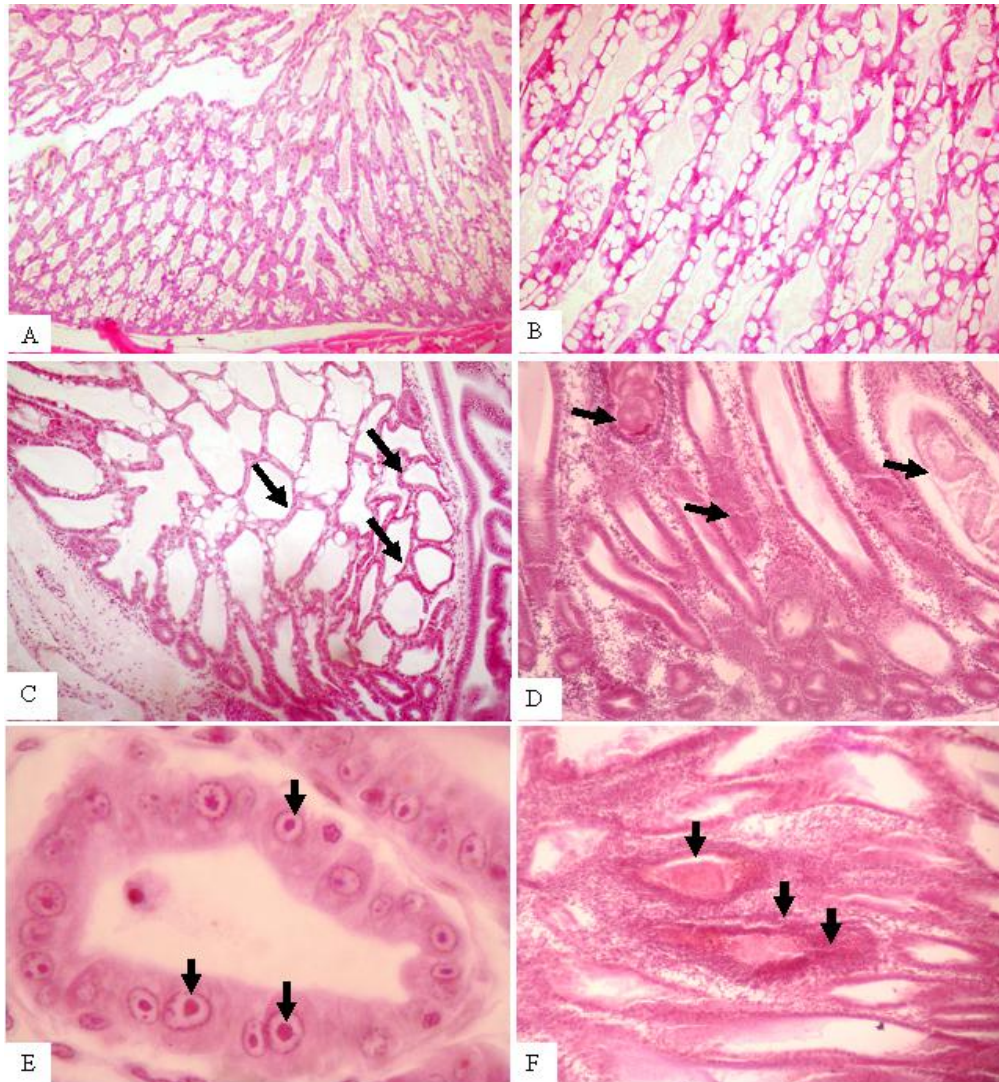
khẩn và nghiệm thức đối chứng (tiêm dung dịch 1.5% NaCl) cho thấy vi khuẩn này có khả năng gây hoại tử gan tụy ở nghiệm thức tiêm 10<sup>5</sup> CFU/con (sau 9 ngày) và 10<sup>6</sup> CFU/con (sau 6 ngày) (Bảng 2).



**Bảng 2: Mô học mẫu tôm cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp tiêm**

Ngày sau khi tiêm vi khuẩn	Nghiệm thức			
	Tiêm dung dịch 1.5% NaCl	Tiêm vi khuẩn ( $10^4$ CFU/con)	Tiêm vi khuẩn ( $10^5$ CFU/con)	Tiêm vi khuẩn ( $10^6$ CFU/con)
0	-	-	-	-
3	-	-	-	-
6	-	-	-	+
9	-	-	+	+

Ghi chú: (-) không có dấu hiệu AHPNS; (+) một phần gan tụy có dấu hiệu APHS



**Hình 6: Mô học tôm gây cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*. (A & B) Gan tụy tôm ở nghiệm thức đối chứng (A: 10X & B: 40X). (C) Gan tụy tôm tiêm *V. parahaemolyticus* sau 3 ngày có dấu hiệu teo ống gan tụy, số lượng tế bào B, F và R giảm nhiều (10X). (D) Gan tụy tôm tiêm *V. parahaemolyticus* sau 6 ngày 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 (40X). (E) Ống gan tụy không có tế bào B, F và R và tế bào biểu mô của ống gan tụy có nhân to bất thường (100X). (F) Gan tụy tôm tiêm *V. parahaemolyticus* sau 9 ngày, các tế bào gan thoái hóa, xuất hiện hiện tượng melanin hóa và các tế bào máu tập trung quanh các cụm vi khuẩn trong vùng bị hoại tử (40X)**

Tôm bệnh hoạt động chậm chạp, bỏ ăn, gan tụy teo, dai và nhợt nhạt, ruột rỗng. Đặc điểm mô bệnh học tương tự như tôm mắc phải AHPNS theo định nghĩa của Lightner *et al.*, (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 6). Tôm ở nghiệm thức đối chứng (tiêm dung dịch 1.5% NaCl) thì gan tụy vẫn có cấu trúc bình thường qua các lần thu mẫu (Hình 6). Kết quả trên khác với kết quả của Loc *et al.* (2013). Nhóm tác giả cho rằng bệnh tích AHPND không thể được lây nhiễm bằng phương pháp tiêm cơ, vì khi gây bệnh thực nghiệm bằng phương pháp tiêm dịch chiết tôm bệnh AHPND không qua màng lọc vào cơ thịt tôm. Sự khác biệt này có thể do hai chủng vi khuẩn được sử dụng gây cảm nhiễm là khác nhau nên mức độ xâm nhiễm và gây bệnh của chúng cũng khác nhau.

#### 4 KẾT LUẬN

Vi khuẩn phân lập từ gan tụy tôm AHPNS thu ở những ao nuôi tôm thâm canh tại tỉnh Bạc Liêu được định danh là *Vibrio parahaemolyticus*. Vi khuẩn có khả năng gây hoại tử gan tụy cấp khi gây cảm nhiễm thực nghiệm trên tôm thẻ chân trắng ở nghiệm thức tiêm  $10^5$  CFU/g (sau 9 ngày) và  $10^6$  CFU/g (sau 6 ngày) với dấu hiệu bệnh lý và mô bệnh học giống như tôm bệnh thu từ tự nhiên.

#### LỜI CẢM ƠN

Các nội dung nghiên cứu trong báo cáo này được thực hiện từ nguồn kinh phí của “Nhiệm vụ xác định nguyên nhân gây bệnh hoại tử gan tụy trên tôm tại các tỉnh Bạc Liêu, Cà Mau và Bến Tre” năm 2012 do Tổng cục Thủy sản, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn cấp kinh phí.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Buller, B.N., 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals, Senior Microbiologist Department of Agriculture South Perth Western Australia. 394p.
2. Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012. Các bệnh nguy hiểm trên tôm nuôi ở Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ 22c: 106 – 118.
3. Lê Hồng Phước, Lê Hữu Tài và Nguyễn Văn Hào, 2012. Diễn biến của hội chứng

hoại tử gan tụy trong ao nuôi tôm thâm canh ở huyện Trần Đề, tỉnh Sóc Trăng.

4. Lê Hữu Tài, Nguyễn Văn Hào và Lê Hồng Phước, 2012. Một số kết quả chẩn đoán mô bệnh học và phân tích siêu cấu trúc của hội chứng hoại tử gan tụy trên tôm nuôi ở Đồng bằng sông Cửu Long.
5. Nguyễn Khắc Thoáng, 2013. Định danh và xác định tính nhạy của thuốc kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ tôm bệnh hoại tử gan tụy ở Sóc Trăng và Trà Vinh. Luận văn tốt nghiệp đại học.
6. Nguyễn Ngọc Thạch, 2013. Phân lập và xác định tính nhạy đối với thuốc kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ tôm bệnh hoại tử gan tụy ở Cà Mau. Luận văn tốt nghiệp đại học.
7. Abhay B. Thakur, R. B. Vaidya and S. A. Suryawanshi, 2003. Pathogenicity and antibiotic susceptibility of *Vibrio* species isolated from moribund shrimps. Indian Journal of Marine Sciences Vol 32(1), March 2003, pp. 71-75.
8. Barrow, G. I. and R. K. A. Feltham. 1993. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge. 262.
9. Flegel, T.W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. Journal of Invertebrate Pathology 110:166-173.
10. Jayasree, L., Janakiram, P and Madhavi, R., 2006. Characterization of *Vibrio* spp. Associated with Diseased Shrimp from Culture Ponds of Andhra Pradesh (India). Journal of the World Aquaculture Society, Volume 37 Issue 4 Page 523.
11. Kaneko, T., and Cowell, R.R, 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. J. Bacteriol. 113: 24 – 32.
12. Kaneko, T., and Cowell, R.R, 1975. Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and copepods. Appl. Microbiol. 20: 693 – 699.
13. Lavilla-Pitogo, CR., Leano, EM., Paner, MG., 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp *Penaeus monodon* associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. Aquaculture 164:337-349.



14. Lightner, D. V., 1996. Viral diseases. In *A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp* ed. McVey, A. pp. 1-72. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society.
15. 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 2012:40.
16. Loc Tran., N. Linda., R.M. Redman., L.L. Mohney., R.P. Carlos., F. Kevin and D.V. Lightner, 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of aquatic organisms*. Vol. 105: 45-55, 2013.
17. Nash, G. Nithimathachoke, C., Tungmandi, C., Arkarjamorn, A., Prathanpipat, P. and Ruamthaveesub, P., 1992. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand. In: M. Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Authur (eds.) *Diseases in Asian Aquaculture 1*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. pp. 143-155.
18. Quang Trong Phat, 2013. Identification and antibiotic sensitivity of vibrio bacteria isolated from shrimp with acute hepatopancreatic necrosis syndrome. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Bachelor of science in Aquaculture.
19. Renata A. Costa, Giselle C. Silva, Jackson R. O. Peixoto, Gustavo H. F. Vieira and Regine H. S. F. Vieira, 2010. Quantification and distribution of *Vibrio* species in water from an estuary in Ceará-Brazil impacted by shrimp farming. *Brazilian journal of Oceanography*, 58(3):183-188, 2010.
20. Walker, P. and Mohan, C. V. (2009). Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. *Reviews in aquaculture 1*: 125-154.
21. William L.A. and LaRock P.A. 1985. Temporal Occurrence of *Vibrio* Species and *Aeromonas hydrophila* in Estuarine Sediments. *Applied and environmental microbiology*. 50(6): 1490–1495.
22. Wong HC, Liu SH, Wang TK, Lee CL, Chiou CS, Liu DP, Nishibuchi Mand Lee BK. 2000. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3981-3986.