

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG LÂY NHIỄM CỦA VI KHUẨN
Vibrio parahaemolyticus GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TRÊN
TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)**

**Nguyễn Thị Huệ Linh*, Trần Nguyên Ngọc, Nguyễn Đức Quỳnh Anh,
Nguyễn Thị Xuân Hồng, Nguyễn Ngọc Phước**
Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ: nguyenthihuelinh@huaf.edu.vn; nthlinh@hueuni.edu.vn

Nhận bài: 18/09/2024 Hoàn thành phản biện: 31/10/2024 Chấp nhận bài: 08/11/2024

TÓM TẮT

Nghiên cứu thực hiện nhằm xác định phương thức lan truyền của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Thí nghiệm lan truyền qua nguồn nước được bố trí trên 6 nghiệm thức với 3 lần lặp lại. Trong đó, tất cả tôm được cảm nhiễm sau đó nuôi chung trong 1 bể (TN1), 5 tôm sau khi được cảm nhiễm vi khuẩn được nuôi chung (TN2) hoặc nuôi riêng (TN3) với 20 tôm không cảm nhiễm trong cùng 1 bể; tôm được cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm với *V. parahaemolyticus* (liều LD₅₀ = 10⁶ cfu/mL) trong 30 phút; ở các nghiệm thức đối chứng âm (ĐC 1, ĐC 2, ĐC 3) tôm được ngâm trong nước biển (độ mặn 20‰) không chứa vi khuẩn. Thí nghiệm xác định sự lây nhiễm qua thức ăn được bố trí 4 nghiệm thức với tôm được cho ăn 1 lần với thức ăn đã trộn các nồng độ vi khuẩn khác nhau (0, 10⁵, 10⁶, 10⁷ cfu/g thức ăn). Sau 14 ngày, tỷ lệ chết tích lũy của tôm khi cảm nhiễm qua nguồn nước ở nghiệm thức NT 1, NT 2 và NT 3 lần lượt là 53,3%, 28%, 14,7% và 0% ở các nghiệm thức đối chứng. Tỷ lệ chết tích lũy của tôm khi cảm nhiễm qua thức ăn ở các nồng độ 0, 10⁵, 10⁶, 10⁷ cfu/g thức ăn lần lượt là 0 %, 21,3%, 33,3% và 41,3%. Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có thể lây nhiễm và gây bệnh trên tôm thông qua nguồn nước hoặc thức ăn.

Từ khóa: AHPND, Lan truyền, Lây nhiễm gián tiếp, Nguồn nước, Thức ăn

**STUDY ON THE TRANSMISSION MODE OF ACUTE
HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE CAUSING**

***Vibrio parahaemolyticus* IN WHITELEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)**

**Nguyen Thi Hue Linh*, Tran Nguyen Ngoc, Nguyen Duc Quynh Anh,
Nguyen Thi Xuan Hong, Nguyen Ngoc Phuoc**
University of Agriculture and Forestry, Hue University

*Corresponding author: nguyenthihuelinh@huaf.edu.vn; nthlinh@hueuni.edu.vn

Received: September 18, 2024 Revised: October 31, 2024 Accepted: November 8, 2024

ABSTRACT

The study was conducted to determine the transmission mode of *Vibrio parahaemolyticus* which causes acute hepatopancreatic necrosis in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The experimental challenge through water was arranged with 6 treatments in triplicates. In this, all infected shrimp were then reared together in one tank (TN 1), or 5 shrimp that were infected with the bacteria were either reared together (TN 2) or separately (TN 3) with 20 uninfected shrimp in the same tank; the shrimp were infected by immersion in *V. parahaemolyticus* (LD₅₀ = 10⁶cfu/mL) for 30 minutes; while the shrimp in there negative control treatments (including DC 1, DC 2, DC 3) were immersed in seawater free of bacteria. The experiment to determine infection through feed included 4 treatments where shrimp were fed once with feed mixed with different bacterial concentrations (0, 10⁵, 10⁶, 10⁷ cfu/g of feed). After 14 days of experimentation, the accumulated mortality rates in treatments NT 1, NT 2, and NT 3 were 53.3%, 28%, and 14.7%, respectively, with 0% in the control treatments. The accumulated mortality rates of shrimp infected through feed at concentrations of 0, 10⁵, 10⁶, 10⁷ cfu/g of feed were 0%, 21.3%, 33.3%, and 41.3%, respectively. *V. parahaemolyticus* can infect and cause disease in shrimp through both water and feed sources.

Keywords: AHPND, Cohabitation, Feed, Transmission, Water source

1. MỞ ĐẦU

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease - AHPND) ban đầu còn được gọi là hội chứng tôm chết sớm (Early Mortality Syndrome-EMS) là bệnh do vi khuẩn gây ra và đã gây thiệt hại về kinh tế nghiêm trọng đối với ngành nuôi tôm công nghiệp toàn thế giới. Dịch bệnh AHPND xuất hiện lần đầu tiên ở Trung Quốc năm 2009, bệnh đã lan sang Việt Nam (2010), Malaysia (2011), Thái Lan (2012), Mexico (2013), Philippines (2015) và Nam Mỹ (2016) (Lee và cs., 2015; Tran và cs., 2013; Dong và cs., 2017; Kumar, 2020). AHPND xuất hiện trên nhiều loài tôm nuôi phổ biến như *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei* và *Macrobrachium rosenbergii* (Kumar và cs., 2018; Hong và cs., 2016; Roy và cs., 2019) với các dấu hiệu bệnh lý như: chán ăn, lờ đờ, ruột rỗng và lớp biểu bì mất sắc tố, gan tụy bị teo, nhũn và có màu trắng. Nguyên nhân của AHPND được báo cáo do một số chủng vi khuẩn gây ra là: *Vibrio parahaemolyticus*, *V. punensis*, *V. harveyi*, *V. owensii*, *V. campbelli* và *Shewanella* sp. chứa plasmid pVA1 mã hóa độc tố nhị phân PirA_{VP} và PirB_{VP} nhị phân, các gene PirA_{VP} và PirB_{VP} là yếu tố độc lực chính của vi khuẩn gây bệnh AHPND gây chết tôm, và vi khuẩn *V. parahaemolyticus* là loài chiếm ưu thế gây ra AHPND ở tôm (Tang và cs., 2020). Hoàng Tấn Quảng và cs. (2020) cũng đã xác định được 14 chủng *Vibrio* phân lập từ tôm bị AHPND ở Thừa Thiên Huế mang gen PirA_{VP}, gen *tlh*, và 7 chủng mang gen *toxR*.

V. parahaemolyticus là vi khuẩn Gram âm, đa dạng về đặc điểm sinh hoá, không hình thành bào tử và có hình dấu phẩy, vi khuẩn này có roi ở cực hoặc có nhiều roi. *V. parahaemolyticus* được biết

đến là tác nhân gây bệnh ở cá, động vật thân mềm và giáp xác ở các vùng nhiệt đới đến ôn đới trên toàn thế giới (Makino và cs., 2003; Thompson và cs., 2004). Vi khuẩn này thuộc hệ vi sinh vật bản địa của môi trường nước cửa sông và ven biển, và có thể được phân lập từ nước, bùn đáy, sinh vật phù du và động vật có vú ở biển (Karunasagar và cs., 2016; Karunasagar và cs., 2018). *V. parahaemolyticus* có thể phát triển mạnh ở độ mặn cao, dao động từ 0,5 đến 10% với mức tối ưu khoảng 1 đến 3%, và có thể phát triển ở nhiệt độ vừa phải từ 5 đến 37°C (Beuchat, 1975). Chính vì có khả năng tồn tại và phát triển ở môi trường rộng muối và rộng nhiệt nên *V. parahaemolyticus* có khả năng có gây bệnh rất lớn đối với các loài thủy hải sản.

Ở tôm, mỗi loại vi khuẩn gây bệnh khác nhau và có các con đường lây nhiễm bệnh tự nhiên khác nhau. Về mặt lý thuyết, vi khuẩn có thể cảm nhiễm bệnh cho tôm thông qua đường miệng, qua lớp biểu bì, qua vết thương, qua nguồn nước hoặc do sự mất cân bằng trong hệ vi khuẩn tự nhiên trong thủy vực (Saulnier và cs., 2000). Tuy nhiên trong thực tế, các con đường lây nhiễm này chưa được chứng minh đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND ở tôm (Tang và cs., 2020). Do vậy, mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định con đường lây nhiễm thực nghiệm của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm và phương pháp tiếp cận để đánh giá độc lực của vi khuẩn *Vibrio* phân lập được, để tiêu chuẩn hoá mô hình cảm nhiễm, làm cơ sở khoa học để đề ra các giải pháp phòng bệnh và phương pháp điều trị bệnh AHPND ở tôm nuôi.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguồn vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TTH010101001 gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng nuôi tại Thừa Thiên Huế năm 2019 (Nguyễn Ngọc Phước và cs., 2020) được sử dụng trong nghiên cứu này.

Tiến hành phục hồi chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TTH010101001 trên môi trường Tryptone Soya Agar (TSA, Himedia, Ấn Độ) có bổ sung 2% NaCl từ dung dịch lưu giữ glycerol 15%. Vi khuẩn mọc trên môi trường TSA sẽ được chọn 1-2 khuẩn lạc rời và cho vào 10mL môi trường Tryptic Soy Broth (TSB, Himedia, Ấn Độ) có bổ sung 2% NaCl và ủ trong tủ ấm GFL 3032, (GFL, Đức) ở 28-30°C với tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 24 giờ. Vi khuẩn sau khi tăng sinh, được ly tâm ở 4000 rpm trong 15 phút. Sử dụng nước muối sinh lý (0,85% NaCl) để rửa và pha loãng vi khuẩn sau ly tâm về giá trị $OD_{600} = 1$ (tương đương mật độ vi khuẩn là 10^9 CFU/mL, giá trị tính được từ đếm trực tiếp khuẩn lạc (Miles và cộng sự, 1938), sau đó được pha loãng về 10^6 CFU/mL để tiến hành thí nghiệm.

2.2. Nguồn tôm thí nghiệm

Trước khi vận chuyển về phòng thí nghiệm, tôm thí nghiệm được kiểm dịch tại Trung tâm Chẩn đoán bệnh động vật Thừa Thiên Huế không mang mầm bệnh đốm trắng do WSSV, bệnh Taura do TSV, bệnh còi do vi bào tử trùng EHP và không nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Tôm có khối

lượng trung bình 1,5 - 2,0 g/con được mua từ trại sản xuất tôm giống Phan Toàn, xã Phú Thuận, huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế.

Tôm được nuôi thuần trong bể composite 2 m³, độ mặn 22‰, nhiệt độ 28-30 °C, hàm lượng oxy hoà tan 4-6 mg/L, pH 6,8-7,7 trong 14 ngày để thích nghi với môi trường nuôi thí nghiệm. Trước khi bố trí các thí nghiệm, tiến hành phân lập vi khuẩn từ khối gan tụy của 5 con tôm được lấy ngẫu nhiên để kiểm tra không mang mầm bệnh do nhóm *Vibrio* gây ra bằng cách cấy trực tiếp trên môi trường Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose agar (TCBS, Himedia, Ấn Độ), quan sát sự phát triển của vi khuẩn sau 24 giờ ở nhiệt độ 28°C.

2.3. Thí nghiệm đánh giá khả năng lan truyền và gây bệnh của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thông qua nguồn nước

Thí nghiệm được thiết kế với 6 nghiệm thức, với 3 lần lặp lại. Các nghiệm thức được bố trí trong các bể nhựa 120 L với hệ thống nước chảy tốc độ 14 L/phút, sục khí liên tục 24 giờ, với các chỉ số môi trường độ mặn 22‰, nhiệt độ 28-30°C, hàm lượng oxy hoà tan 5-6 mg/L, pH 6,8-7,5. Tôm thí nghiệm được cho ăn 3 lần/ngày bằng thức ăn công nghiệp Saving SS40 (Công ty TNHH DACHAN, Việt Nam; độ đậm 40%) với khối lượng thức ăn bằng 3% khối lượng thân trong 7 ngày để thích nghi với điều kiện thí nghiệm. Vào ngày thứ 8, tiến hành gây bệnh thực nghiệm cho tôm thí nghiệm ở các nghiệm thức như sau (Bảng 1).

Bảng 1. Các nghiệm thức thí nghiệm đánh giá khả năng lan truyền và gây bệnh của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* cho tôm nuôi thông qua nguồn nước

| Nghiệm thức | Ký hiệu | Phương pháp cảm nhiễm | Sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn |
|----------------------|---------|---|--|
| Nghiệm thức 1 | ĐC 1 | Ngâm toàn bộ 25 tôm trong 2L nước biển trong 30 phút | Chuyển toàn bộ 25 tôm vào bể 120L |
| Nghiệm thức 2 | ĐC 2 | Ngâm 5 tôm đã đánh dấu (cắt 1 phần telson) trong 2L nước biển trong 30 phút | Chuyển 5 tôm vào bể 120L nuôi chung với 20 tôm không đánh dấu |
| Nghiệm thức 3 | ĐC 3 | Ngâm 5 tôm đã đánh dấu (cắt 1 phần telson) trong 2L nước biển trong 30 phút | Chuyển 5 tôm vào lồng có thể tích 0,4 cm ³ được đặt trong bể 120L với 20 tôm không đánh dấu |
| Gây bệnh thực nghiệm | TN 1 | Ngâm toàn bộ 25 tôm trong 2L nước biển có chứa vi khuẩn với nồng độ 10 ⁶ cfu/mL trong 30 phút | Chuyển 25 tôm đã ngâm sang bể thí nghiệm 120 L |
| | TN 2 | Ngâm 5 tôm đã đánh dấu (cắt 1 phần telson) trong 2L nước biển có chứa vi khuẩn với nồng độ 10 ⁶ cfu/mL trong 30 phút | Chuyển 5 tôm đánh dấu sau khi cảm nhiễm vi khuẩn sang bể 120 L nuôi chung với 20 tôm không đánh dấu và không cảm nhiễm |
| | TN 3 | Ngâm 5 tôm đã đánh dấu (cắt 1 phần telson) trong 2L nước biển có chứa vi khuẩn với nồng độ 10 ⁶ cfu/mL trong 30 phút | Chuyển 5 tôm đánh dấu sau khi cảm nhiễm vào lồng có thể tích 0,4 cm ³ được đặt trong bể 120L với 20 tôm không đánh dấu (không tiếp xúc trực tiếp giữa tôm đã cảm nhiễm và không cảm nhiễm) (Hình 1) |



Hình 1. Bố trí thí nghiệm không tiếp xúc trực tiếp giữa tôm đã cảm nhiễm và tôm không cảm nhiễm

Theo dõi tỷ lệ chết của tôm thí nghiệm sau 14 ngày cảm nhiễm. Tôm chết thu được tiến hành nuôi cấy phân lập vi khuẩn trên môi trường TCBS để kiểm tra sự hiện diện vi khuẩn *Vibrio* cảm nhiễm trên tôm thí nghiệm.

Thu mẫu khối gan tụy của tôm thí nghiệm để phân tích sự biến đổi mô bệnh học sau khi cảm nhiễm vi khuẩn. Phân tích mô bệnh học được thực hiện theo phương pháp của Lightner (1996). Ngăn gọn, khối gan tụy của tôm thí nghiệm được xử lý và bảo quản trong dung dịch Davidson. Sau đó mẫu được xử lý theo Lightner (1996). Các

lát cắt mẫu được cắt ở độ dày 5 µm và nhuộm bằng hematoxylin và eosin trước khi quan sát dưới kính hiển vi quang học (Olympus CX23, Nhật Bản).

2.4. Thí nghiệm đánh giá khả năng lan truyền và gây bệnh của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thông qua thức ăn

Theo Nguyễn Ngọc Phước và cs. (2020) chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TTH010101001 có liều gây chết 50% (LD₅₀) là 10⁵ CFU/mL. Do vậy, để thử nghiệm khả năng lan truyền bệnh qua thức ăn ở tôm, chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TTH010101001 với các mật độ 10⁵, 10⁶, 10⁷ cfu/g thức ăn được sử dụng thử nghiệm để thực hiện thí nghiệm này.

Chuẩn bị vi khuẩn: Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được chuẩn bị như ở mục 2.1. Sau khi dung dịch vi khuẩn đạt mật độ 10⁹ cfu/mL, tiến hành pha loãng dung dịch vi khuẩn về các mật độ 10⁵ cfu/mL, 10⁶ cfu/mL và 10⁷ cfu/mL.

Chuẩn bị thức ăn: thức ăn công nghiệp Saving SS40 (Công ty TNHH DACHAN, Việt Nam; độ đậm 40%) được trộn với dung dịch nước muối sinh lý NaCl

0,85% để làm thức ăn đối chứng, hoặc được trộn dung dịch chứa vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với các mật độ lần lượt là 10⁵, 10⁶, 10⁷ cfu/g thức ăn.

Bố trí thí nghiệm: Tôm thí nghiệm được nuôi trong các bể nhựa 120 L với hệ thống nước chảy tốc độ 14 L/phút, sục khí liên tục 24 giờ/ngày, nước nuôi có độ mặn 20 ‰, nhiệt độ 28-30 °C, hàm lượng oxy hòa tan 5-6 mg/L, pH 6,8-7,5. Thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần với 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức có 25 con tôm. Tôm thí nghiệm được cho ăn 3 lần/ngày bằng thức ăn công nghiệp Saving SS40 (Công ty TNHH DACHAN, Việt Nam; độ đậm 40%) với khối lượng thức ăn bằng 3% khối lượng thân trong 7 ngày để thích nghi với điều kiện thí nghiệm. Vào ngày thứ 8, tôm thí nghiệm được cho ăn thức ăn có hoặc không có vi khuẩn với khối lượng thức ăn bằng 3% khối lượng thân trong 1 ngày (Bảng 2). Theo dõi tỷ lệ chết của tôm thí nghiệm trong 14 ngày. Tôm chết được xác định do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với dấu hiệu bệnh lý đặc trưng và sự hiện diện khi cấy trên môi trường TCBS.

Bảng 2. Các nghiệm thức của thí nghiệm đánh giá khả năng gây bệnh và lan truyền của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thông qua thức ăn

| Nghiệm thức | Ký hiệu | Phương pháp cảm nhiễm (cho ăn 1 lần) |
|----------------------|---------|--|
| Đối chứng | ĐC | Cho tôm ăn thức ăn trộn dung dịch nước muối sinh lý NaCl 0,85% |
| Gây bệnh thực nghiệm | NT 1 | Cho tôm ăn thức ăn trộn với dung dịch vi khuẩn ở nồng độ 10 ⁵ cfu/g thức ăn |
| | NT 2 | Cho tôm ăn thức ăn trộn với dung dịch vi khuẩn ở nồng độ 10 ⁶ cfu/g thức ăn |
| | NT 3 | Cho tôm ăn thức ăn trộn với dung dịch vi khuẩn ở nồng độ 10 ⁷ cfu/g thức ăn |

Tỷ lệ chết của tôm thí nghiệm được quan sát sau 14 ngày cảm nhiễm. Đánh giá khả năng lây nhiễm của *V. parahaemolyticus* thông qua thức ăn sau khi kết thúc thí nghiệm. Thu mẫu vi khuẩn *Vibrio* trực tiếp từ khối gan tụy ở những tôm

có dấu hiệu bệnh lý và cấy lên môi trường TCBS để kiểm tra sự hiện diện vi khuẩn cảm nhiễm trên tôm thí nghiệm. Khối gan tụy của tôm thí nghiệm được thu mẫu để phân tích sự biến đổi mô bệnh học sau khi cảm nhiễm vi khuẩn. Phân tích mô bệnh học

được thực hiện theo phương pháp của Lightner (1996) (như đã mô tả ở mục 2.3)

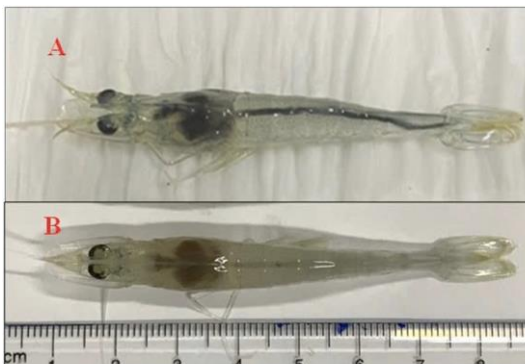
2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê theo phân tích phương sai (ANOVA) dựa trên phần mềm Microsoft Excel 2016. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được xác định theo phương pháp Tukey với độ tin cậy 95%.

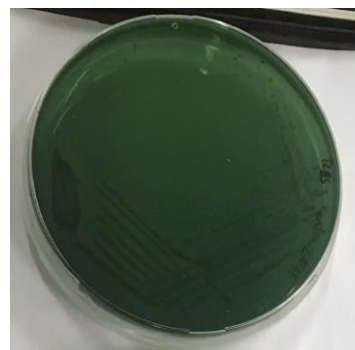
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng lan truyền và gây bệnh của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thông qua nguồn nước

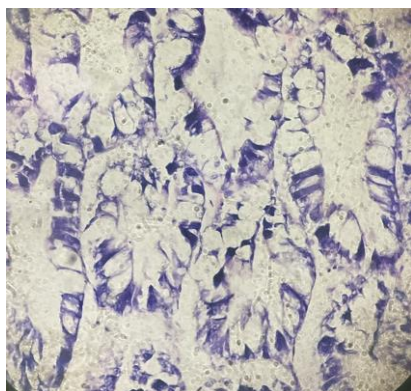
Sau 14 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* bằng cách tiếp xúc trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua nguồn nước, tôm thí nghiệm chết có dấu hiệu ruột rỗng, khối gan tụy sưng to và có màu vàng (Hình 2); vi khuẩn gây bệnh được tái phân lập và xuất hiện khuẩn lạc có màu xanh trên môi trường TCBS (Hình 3). Phân tích mô bệnh học cho thấy: khối gan tụy của tôm thí nghiệm bị thoái hóa, co tròn lại và bong ra từ thành các khoang ống, hoại tử xuất hiện ở mô liên kết (Hình 5). Tỷ lệ chết tích lũy của tôm thí nghiệm thể hiện ở Hình 6.



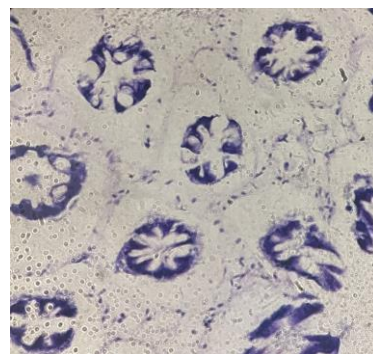
Hình 2. Tôm khỏe (A) và tôm nhiễm vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (B) thông qua nguồn nước



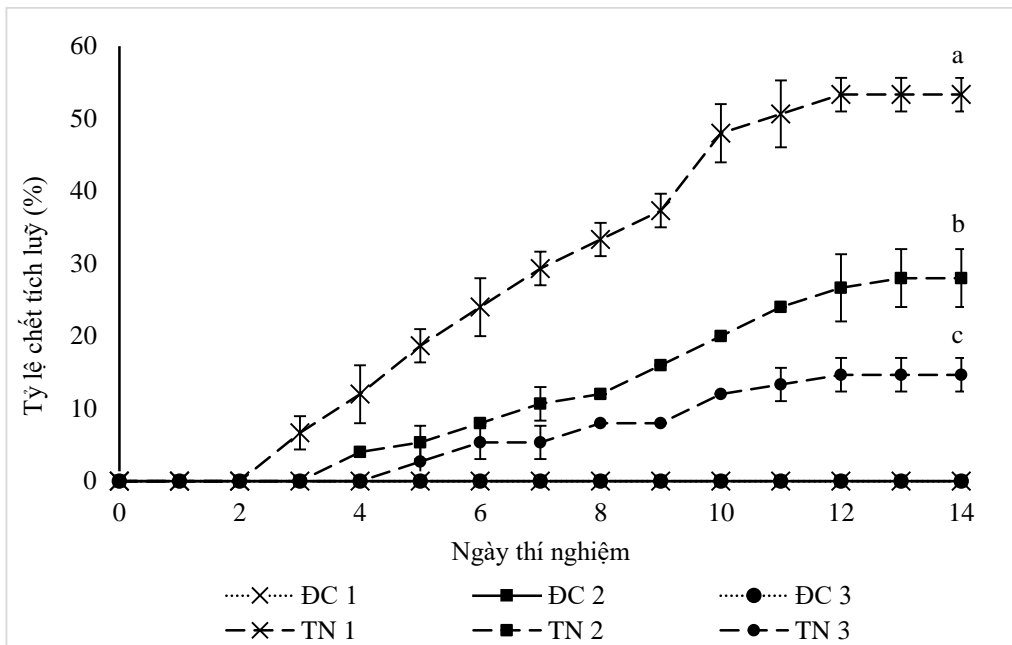
Hình 3. Khuẩn lạc của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* mọc trên môi trường Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose agar



Hình 4. Khối gan tụy tôm không có sự cảm nhiễm của vi khuẩn thông qua nguồn nước (H&E, 400x)



Hình 5. Khối gan tụy tôm nhiễm vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* thông qua nguồn nước (H&E, 400x)



Hình 6. Tỷ lệ chết tích lũy của tôm thí nghiệm sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* thông qua nguồn nước. Các ký tự (a, b, c) khác nhau biểu thị số liệu khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Trong điều kiện thí nghiệm với các yếu tố môi trường tối ưu, chế độ chăm sóc giống nhau, các phương thức cảm nhiễm thông qua nguồn nước với sự tiếp xúc nguồn bệnh khác nhau đã cho thấy tỷ lệ chết tích lũy của tôm thí nghiệm là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Cụ thể, toàn bộ tôm ở nghiệm thức TN 1 sau khi tiếp xúc với nguồn nước có vi khuẩn gây bệnh có tỷ lệ chết tích lũy cao nhất (53,3%), ở nghiệm thức TN 2 và TN 3 tôm được đánh dấu và cảm nhiễm sau đó được thả nuôi chung với tôm khỏe hoặc được cách ly nhưng vẫn nuôi cùng nguồn nước với tôm khỏe có tỷ lệ chết tích lũy lần lượt là 28% và 14,7% sau 14 ngày theo dõi. Tỷ lệ chết của tôm ở các nghiệm thức đối chứng (ĐC 1, ĐC 2, ĐC 3) là 0%. Từ kết quả của thí nghiệm cho thấy, nếu có tôm nhiễm khuẩn trong quần đàn, dù có sự tiếp xúc trực tiếp giữa tôm bệnh và tôm khỏe hoặc tôm nhiễm khuẩn được nuôi chung nhưng bị cách ly không tiếp xúc với tôm khỏe thì sự lan truyền của vi khuẩn trong nguồn nước vẫn xảy ra và gây ra tỷ lệ chết nhất định trong đàn tôm. Không có

nhiều thí nghiệm cảm nhiễm vi khuẩn trên tôm được thực hiện theo phương pháp nuôi chung có cách ly. Năm 2017, Salachan và cs. đã sử dụng phương pháp này để xác định con đường lây nhiễm của *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) trên tôm thí nghiệm và đã xác nhận rằng *E. hepatopenaei* có thể lây truyền trực tiếp theo chiều ngang giữa đàn tôm thông qua nước nuôi. Ngoài ra, Ngoc Phuoc và cs. (2020) cũng đã cho thấy vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* có thể lây nhiễm và gây bệnh cho cá qua nguồn nước bằng tiếp xúc trực tiếp hoặc gián tiếp.

Thời gian gần đây, nghề nuôi tôm đã xuất hiện một căn bệnh mới nổi là bệnh do *Vibrio* gây tử vong cao (HLVD), bệnh này xuất hiện do các chủng độc lực của *Vibrio parahaemolyticus* (VpHLVD) gây ra, dẫn đến tử vong cấp tính và hàng loạt ở giai đoạn hậu ấu trùng tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Các chủng vi khuẩn VpHLVD gây tổn thương nghiêm trọng ống gan tụy và biểu mô ruột giữa của tôm bị nhiễm bệnh (Yang và cs., 2023). Mặc dù HLVD và AHPND đều do *V.*

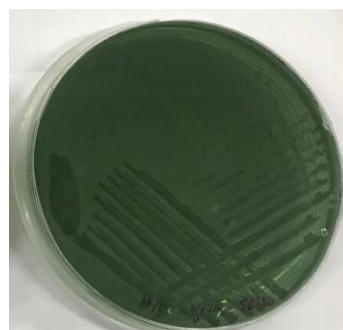
parahaemolyticus gây ra và có các dấu hiệu lâm sàng tương tự nhau, nhưng VpHLVD độc lực cao hơn nhiều so với VpAHPND trong nghiên cứu của Yang và cs. (2022). Điều này chứng tỏ rằng, loài vi khuẩn *V. parahaemolyticus* tồn tại trong các ao nuôi tôm không những không giảm độc lực, mà còn biến đổi và xuất hiện thêm yếu tố gây độc mới theo thời gian và tiếp tục gây hại cho ngành công nghiệp nuôi tôm. Do vậy, kết quả nghiên cứu sự lan truyền bệnh do *V. parahaemolyticus* trong nghiên cứu này đã xác định khả năng gây chết trên tôm thí nghiệm của chủng vi khuẩn phân lập được thông qua nguồn nước, là cơ sở để đưa ra các giải pháp ngăn chặn và hạn chế sự tiếp xúc của mầm bệnh nguy hiểm này đối với tôm nuôi.

3.2. Khả năng lan truyền và gây bệnh của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thông qua thức ăn

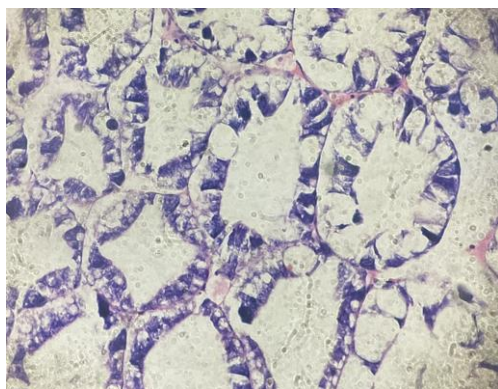
Sau 14 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thông qua thức ăn, tôm thí nghiệm chết có dấu hiệu ruột rỗng, khối gan tụy sưng to và có màu vàng (Hình 7), vi khuẩn gây bệnh được tái phân lập và xuất hiện khuẩn lạc xanh trên môi trường TCBS (Hình 8). Khối gan tụy của tôm thí nghiệm cho thấy hiện tượng thoái hoá nặng, biểu mô ống bị mất cấu trúc và các tế bào biểu mô ở các ống gan tụy hoại tử nghiêm trọng (Hình 10). Tỷ lệ chết tích lũy của tôm thí nghiệm thể hiện ở Hình 11.



Hình 7. Tôm khoẻ (A) và tôm nhiễm vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (B) thông qua thức ăn



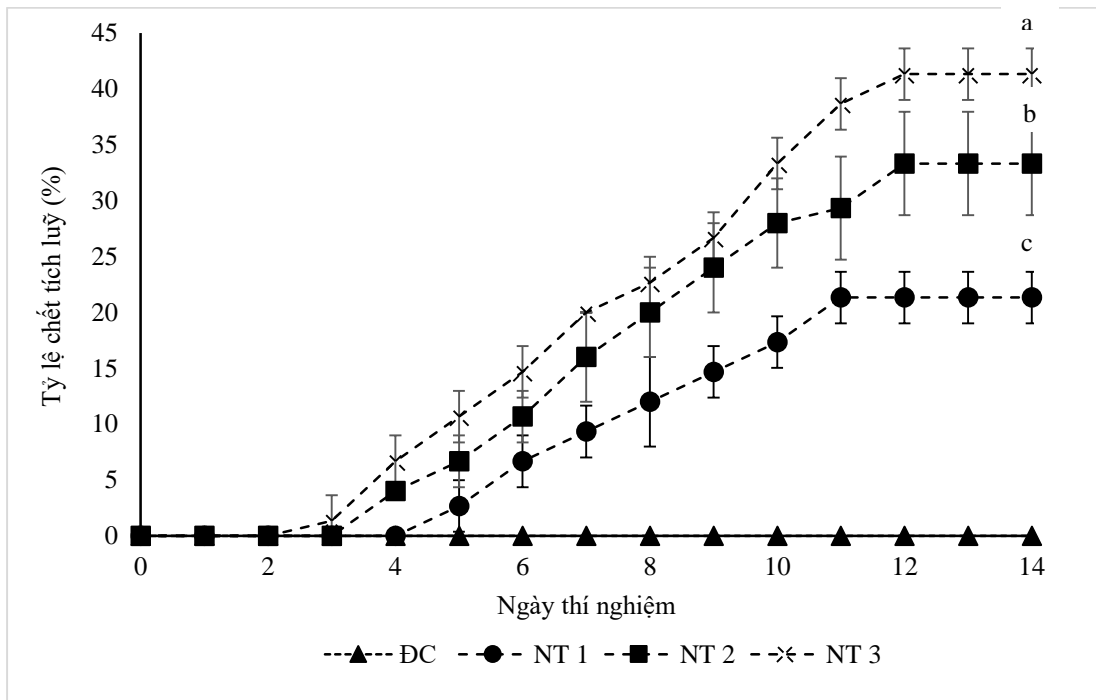
Hình 8. Khuẩn lạc của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* mọc trên môi trường Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose agar



Hình 9. Khối gan tụy tôm không có sự cảm nhiễm của vi khuẩn thông qua thức ăn (H&E, 400x)



Hình 10. Khối gan tụy tôm nhiễm vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* thông qua thức ăn (H&E, 400x)



Hình 11. Tỷ lệ chết tích lũy của tôm thí nghiệm sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* thông qua thức ăn. Các ký tự (a, b, c) khác nhau biểu thị số liệu khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Thức ăn là nguồn cung cấp dinh dưỡng quan trọng cho tôm nuôi trong quá trình nuôi tôm. Sử dụng thức ăn cân bằng dinh dưỡng và áp dụng các biện pháp quản lý thức ăn tốt có thể cải thiện hiệu quả sản xuất và giảm tác động của thức ăn đến môi trường. Tôm có tập tính ăn khác với cá, tôm bắt thức ăn bằng chân trước và đưa vào khoang miệng, và gặm nhấm chậm rãi. Do vậy, trong thực tế sản xuất khi thức ăn đưa vào ao có nhiều xác suất nhiễm mầm bệnh (đặc biệt là vi khuẩn) do tập tính bắt mồi chậm và gặm của tôm nuôi, đồng thời cũng do mật độ nuôi trong ao nuôi tôm công nghiệp thường cao. Trong điều kiện thí nghiệm, khi ăn thức ăn bị nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, tỷ lệ chết tích lũy của tôm thí nghiệm ở nghiệm thức NT 1, nghiệm thức NT 2 và nghiệm thức NT 3 lần lượt là 21,3%, 33,3% và 41,3%, tỷ lệ chết tích lũy sai khác của tôm giữa các nghiệm thức thí nghiệm là có ý nghĩa thống kê ($p <$

0,05). Tỷ lệ chết của tôm ở nghiệm thức đối chứng (ĐC) là 0%.

Ở tôm, các con đường lây nhiễm tự nhiên khác nhau của các chủng vi khuẩn có độc lực về mặt lý thuyết là qua đường miệng, xuyên biểu bì, do vết thương hoặc do mất cân bằng trong hệ vi khuẩn tự nhiên hoặc do lây truyền theo chiều dọc của tác nhân gây bệnh. Tuy nhiên, có rất ít minh chứng cho thấy chắc chắn các con đường lây nhiễm nêu trên có thể xảy ra cho tôm nuôi (Saulnier và cs., 2000). Và sự lây nhiễm vi khuẩn cho tôm thông qua thức ăn cũng là một trong những con đường lây nhiễm được suy đoán. Khi tôm ăn thức ăn bị nhiễm khuẩn, vi khuẩn gây bệnh rơi vào đường tiêu hoá của tôm và đi thẳng lên khối gan tụy kí sinh làm rối loạn hoạt động tiêu hoá và có thể gây chết tôm. Đối với tôm, khối gan tụy đóng vai trò quan trọng trong quá trình tiêu hoá, hấp thụ và dự trữ chất dinh dưỡng (Vogt, 1994). Trong đó, tế bào

B là tế bào có chức năng tiết enzyme tiêu hoá thức ăn, tế bào R là loại tế bào có nhiều nhất trong khối gan tụy có chức năng hấp thụ và chuyển hóa chất dinh dưỡng, dự trữ năng lượng và khoáng chất, tổng hợp lipoprotein để vận chuyển đến các cơ quan khác, giải độc kim loại nặng và bài tiết uric acid (Vogt, 2019). Khi vi khuẩn *V. parahaemolyticus* tấn công vào khối gan tụy sẽ nhanh chóng gây hoại tử các loại tế bào này, và phá vỡ cấu trúc khối gan tụy (Saputra và cs., 2023), từ đó khối gan tụy không thực hiện được chức năng tiêu hoá thức ăn và chuyển hoá các chất dinh dưỡng, các chất dinh dưỡng không được dự trữ và vận chuyển đến cơ, tuyến sinh dục và các mô khác trong giai đoạn tăng trưởng và sinh sản (Jiang và cs., 2009). Tôm không nhận được nguồn dinh dưỡng và năng lượng sẽ giảm sức đề kháng, dễ nhiễm bệnh và chết.

Do vậy, từ kết quả của hai thí nghiệm sự lây nhiễm vi khuẩn cho tôm thông qua nguồn nước và thức ăn trong nghiên cứu này cho thấy khi tôm bị cảm nhiễm cùng một lượng vi khuẩn gây bệnh là 10^6 cfu/mL hoặc 10^6 cfu/g thức ăn thì kết quả tỷ lệ chết tích lũy ở nhóm tôm được cảm nhiễm qua đường tiêu hoá (thức ăn) đã cao hơn so với nhóm tôm được cảm nhiễm qua nguồn nước dù tôm thí nghiệm được nuôi chung hoặc nuôi riêng. Như vậy, trong điều kiện thí nghiệm của nghiên cứu này đã chứng minh, khi vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có mặt trong thức ăn đã nhanh chóng gây ra tỷ lệ chết ở tôm thí nghiệm do thức ăn nhiễm khuẩn đã được trực tiếp hấp phụ đến khối gan tụy, tăng sinh và gây bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm.

4. KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy *V. parahaemolyticus* có thể lây nhiễm và gây bệnh hoại tử gan tụy cấp cho tôm thẻ chân trắng thông qua nguồn nước và thức ăn. Với cùng một mật độ vi khuẩn cảm

nhiễm (10^6 cfu/mL hoặc 10^6 cfu/g thức ăn), tỷ lệ chết tích lũy của tôm thí nghiệm qua đường tiêu hoá cao hơn so với tôm bị lây nhiễm vi khuẩn qua nguồn nước (tiếp xúc trực tiếp hoặc gián tiếp). Cả 2 con đường lây nhiễm đều gây ra tỷ lệ chết cho tôm thí nghiệm.

Kết quả đạt được trong nghiên cứu này là minh chứng về khả năng lan truyền của vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* cho tôm thẻ chân trắng thông qua nguồn nước và thức ăn, là cơ sở để sử dụng những giải pháp phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp phù hợp cho tôm nuôi.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ thực hiện nghiên cứu này của Nhóm Nghiên cứu tiêu biểu NCTB.DHH.2025.08 và đề tài nghiên cứu khoa học cấp cơ sở trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, năm 2024 mã số DHL2024-TS-05

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Hoàng Tấn Quảng, Trần Thúy Lan, Phạm Thị Diễm Thi, Lê Thị Tuyết Nhân, Lê Mỹ Tiêu Ngọc, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm và Nguyễn Thị Thu Liên. (2020). Xác định sự có mặt của các gen độc tố ở các chủng *Vibrio* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 129(1A), 115–123.

Nguyễn Ngọc Phước, Nguyễn Thị Xuân Hồng và Nguyễn Công Chung. (2020). 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. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 18(3), 202–211

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Beuchat, L.R. (1975). Environmental factors affecting survival and growth of *Vibrio parahaemolyticus*: A Review. *Journal of Milk and Food Technology*, 38, 476–480.

Dong, X., Bi, D., Wang, H., Zou, P., Xie, G., Wan, X., Yang, Q., Zhu, Y., Chen, M.,

- Guo, C., Liu, Z., Wang, W. & Huang, J. (2017). PirABvp-Bearing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio campbellii* pathogens isolated from the same AHPND-affected pond possess highly similar pathogenic plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1859.
- Hong, X., Lu, L., & Xu, D. (2016). Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture International*, 24, 577–593.
- Jiang, H., Yin, Y., Zhang, X. W., Hu, S. N., & Wang, Q. (2009). Chasing relationships between nutrition and reproduction: A comparative transcriptome analysis of hepatopancreas and testis from *Eriocheir sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part D: Genomics and Proteomics, 4, 227–234.
- Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2018). Ecology, virulence factors and global spread of *Vibrio parahaemolyticus*. *The Asian Fisheries Science*, 31, 15–28.
- Karunasagar, I., Karunasagar, I., & Raghunath, P. (2016). Ecology, Virulence, and Detection of Pathogenic and Pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 156.
- Kumar, V. (2020) Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Shrimp: Virulence, Pathogenesis and Mitigation Strategies. Ph.D. Thesis, University of Ghent, Ghent, Belgium,
- Kumar, V., Baruah, K., Nguyen, D.V., Smagghe, G., Vossen, E., & Bossier, P. (2018). Phloroglucinol mediated Hsp70 production in crustaceans: Protection against *Vibrio parahaemolyticus* in *Artemia franciscana* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Frontiers in Immunology*, 9, 1091.
- Lee, C.-T., Chen, I.-T., Yang, Y.-T., Ko, T.-P., Huang, Y.-T., Huang, J.-Y., Huang, M.-F., Lin, S.-J., Chen, C.-Y., Lin, S.-S.; et al. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (34), 10798–10803.
- Lightner, D. V. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. *World Aquaculture Society*, 1-72.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M., & Iida, T. (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: A pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *The Lancet*, 361, 743–749.
- Miles, A., Misra, S., & Irwin, J. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection*, 38, 732–749.
- 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 (3), 371-378.
- Roy, S., Kumar, V., Bossier, P., Norouzitallab, P., & Vanrompay, D. (2019). Phloroglucinol treatment induces transgenerational epigenetic inherited resistance against *Vibrio* infections and thermal stress in a brine shrimp (*Artemia franciscana*) model. *Frontiers in Immunology*, 10, 2745.
- Salachan, P. V., Jaroenlak, P., Thitamadee, S., & Itsathitphaisarn, O., & Sritunyalucksana, K. (2017). Laboratory cohabitation challenge model for shrimp hepatopancreatic microsporidiosis (HPM) caused by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *BMC Veterinary Research*, 13, 9.
- Saputra, A., Maftuch, Andayani, S., & Yanuhar, U. (2023). Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Serang, Banten, Indonesia. *Biodiversitas*, 24 (4), 2365-2373.
- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., & Ansquer, D. (2000). Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*, 191 (1–3), 133-144.
- Tang, K.F.J., Bondad-Reantaso, M.G., Arthur, J.R., MacKinnon, B., Hao, B., Alday-Sanz, V., Liang, Y., & Dong, X.

- (2020). Shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease strategy manual. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1190*. Rome, FAO. DOI: <https://doi.org/10.4060/cb2119en>.
- Thompson, F., Iida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68 (3), 403–431.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R.M., Mohny, L.L., Pantoja, C.R.; Fitzsimmons, K., & Lightner, D.V. (2013a). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 105, 45–55.
- Tran, L., Redman, R.M., & Lightner, D.V. (2013b). EMS/AHPNS: Infectious disease caused by bacteria. *The Global Aquaculture Advocate*, 20, 19–20.
- Vogt, G. (1994). Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology*, 114, 83–101.
- Vogt, G. (2019). Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. *Journal of Morphology*, 280 (9), 1405–1444.
- Yang, F., Xu, L., Huang, W., & Fang Li. (2022). Highly lethal *Vibrio parahaemolyticus* strains cause acute mortality in *Penaeus vannamei* post-larvae. *Aquaculture*, 548, Part 1.
- Yang, F., You, Y., Lai, Q., Xu, L., & Li, F. (2023). *Vibrio parahaemolyticus* becomes highly virulent by producing Tc toxins. *Aquaculture*, 576, 739817.