

MÔ HÌNH CẢM NHIỄM NHÂN TẠO CỦA *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Penaeus vannamei*) GIAI ĐOẠN GIỐNG

Trần Nguyên Ngọc¹, Nguyễn Đức Quỳnh Anh¹, Ngô Quốc Cường², Phạm Thái Bình^{2,3},
Nguyễn Duy Quỳnh Trâm¹, Nguyễn Ngọc Phước^{1*}

¹Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế;

²Công ty Cổ phần Công nghệ Sinh học R.E.P;

³Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh.

*Tác giả liên hệ: nguyennngocphuoc@huaf.edu.vn hoặc nguyennngocphuoc@hueuni.edu.vn
Nhận bài: 23/11/2025 Hoàn thành phản biện: 26/01/2026 Chấp nhận bài: 04/02/2026

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ba mô hình cảm nhiễm nhân tạo của vi bào tử trùng *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) trên tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) giai đoạn giống (kích cỡ 1,5-2g/con), gồm: cho tôm khỏe ăn mô gan tụy của tôm bị nhiễm EHP, tiêm trực tiếp mô gan tụy nhiễm EHP vào tuyến gan tụy tôm khỏe và nuôi chung tôm khỏe với tôm bị nhiễm EHP. Kết quả cho thấy phương pháp cho ăn có tỷ lệ nhiễm cao nhất (70%) với mật độ ký sinh $7,84 \times 10^7$ bản sao/ μ L DNA, chứng tỏ đây là cách tiếp cận khả thi để xây dựng mô hình cảm nhiễm trong phòng thí nghiệm. Phương pháp nuôi chung cho tỷ lệ nhiễm thấp hơn (30%) và mật độ ký sinh $1,39 \times 10^7$ bản sao/ μ L DNA, nhưng phản ánh tốt cơ chế lây lan tự nhiên của EHP. Ngược lại, phương pháp tiêm trực tiếp vào gan tụy gây tỷ lệ tử vong cấp tính cao do tổn thương cơ học, khiến không thể đánh giá chính xác khả năng cảm nhiễm EHP ở tôm giống, nên không phù hợp để thiết lập mô hình cảm nhiễm EHP trên đối tượng này. Kết quả nghiên cứu cung cấp cơ sở quan trọng cho việc lựa chọn phương pháp gây nhiễm thích hợp, phục vụ nghiên cứu dịch tễ học và phát triển biện pháp phòng trị EHP.

Từ khóa: *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), Cảm nhiễm nhân tạo, Mô hình thí nghiệm, Nuôi trồng thủy sản, Tôm thẻ chân trắng

ARTIFICIAL INFECTION MODELS OF *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) IN JUVENILE WHITELEG SHRIMP (*Penaeus vannamei*)

Tran Nguyen Ngoc¹, Nguyen Duc Quynh Anh¹, Ngo Quoc Cuong², Pham Thai Binh^{2,3},
Nguyen Duy Quynh Tram¹, Nguyen Ngoc Phuoc^{1*}

¹University of Agriculture and Forestry, Hue University;

²R.E.P Biotechnology Joint Stock Company;

³University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh city.

*Corresponding author: nguyennngocphuoc@huaf.edu.vn/nguyennngocphuoc@hueuni.edu.vn
Received: 23/11/2025 Revised: 26/01/2026 Accepted: 04/02/2026

ABSTRACT

This study evaluated three experimental infection methods for *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in juvenile whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*): oral administration of EHP-infected hepatopancreatic tissue, direct injection of infected tissue into the hepatopancreas of healthy shrimp, and cohabitation with EHP-infected shrimp. The results showed that oral administration resulted in the highest infection rate (70%) and parasite load (7.84×10^7 copies/ μ L of DNA), indicating its potential as a reliable method for establishing experimental EHP infections. Cohabitation resulted in a lower infection rate (30%) and parasite load (1.39×10^7 copies/ μ L of DNA), but more closely represented the natural transmission route of EHP. In contrast, direct injection into the hepatopancreas caused high acute mortality, likely due to mechanical damage, making it impossible to accurately assess EHP infectivity in juvenile shrimp; thus, this method was unsuitable for establishing an experimental infection model. These findings provide a useful basis for selecting appropriate experimental infection methods for EHP research, particularly in epidemiological studies and the development of preventive strategies.

Keywords: Aquaculture, *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), Experimental infection, Laboratory model, Whiteleg shrimp

1. MỞ ĐẦU

Ngành nuôi tôm đã trở thành một trong những lĩnh vực quan trọng nhất của nuôi trồng thủy sản toàn cầu, cung cấp nguồn protein chính và sinh kế cho hàng triệu người. Tuy nhiên, sự phát triển bền vững của ngành này thường xuyên bị đe dọa bởi các tác nhân gây bệnh mới nổi, làm giảm năng suất và gây tổn thất kinh tế nghiêm trọng. Trong số đó, vi bào tử trùng *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) đã thu hút nhiều sự quan tâm trong thập kỷ qua do những tác động đáng kể đối với nghề nuôi tôm (Salachan và cs., 2017).

Vi bào tử trùng *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) lần đầu tiên được phát hiện là tác nhân gây hiện tượng còi cọc, chậm lớn ở tôm sú tại Thái Lan năm 2009 (Tourtip và cs., 2009), sau đó đã lan rộng sang nhiều quốc gia khác trong khu vực và trên thế giới, trong đó có Việt Nam (Rajendran và cs., 2016; Tang và cs., 2016, 2017). EHP là vi bào tử trùng ký sinh nội bào, hoàn tất vòng đời phát triển trong đường tiêu hóa của tôm mà không cần vật chủ trung gian, và có thể lây truyền trực tiếp thông qua việc tôm tiếp xúc hoặc tiêu thụ vật chất mang mầm bệnh trong môi trường nuôi (Salachan và cs., 2017; Tangprasittipap và cs., 2013). Điểm đáng lưu ý là EHP không gây chết hàng loạt như hội chứng hoại tử gan tụy cấp - AHPND, bệnh đốm trắng - WSSV, nhưng làm tôm còi cọc, chậm lớn, hệ số chuyển đổi thức ăn kém, dẫn đến thiệt hại sản lượng và lợi nhuận (Tang và cs., 2017). Vì vậy, việc hiểu rõ cơ chế lây truyền và gây bệnh của EHP là yêu cầu cấp thiết để có cơ sở đề xuất các biện pháp kiểm soát dịch bệnh hiệu quả.

Một trong những trở ngại lớn trong nghiên cứu EHP là khó xây dựng mô hình gây nhiễm chuẩn. Các phương pháp gây nhiễm nhân tạo EHP đã được báo cáo trong

các nghiên cứu trước, như nuôi chung tôm khỏe với tôm bệnh, cho tôm ăn mô gan tụy nhiễm, hoặc đưa mầm bệnh trực tiếp vào tuyến gan tụy, tiêm cơ hay đường tiêu hóa (Salachan và cs., 2017; Mai và cs., 2020). Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu này được thực hiện trên tôm trưởng thành, trong khi dữ liệu về hiệu quả gây nhiễm ở giai đoạn tôm giống còn rất hạn chế, đặc biệt đối với các phương pháp gây nhiễm đơn giản, ít gây stress và có khả năng áp dụng trong điều kiện phòng thí nghiệm và thực tế sản xuất. Bên cạnh đó, những phương pháp có hiệu quả cao như đưa trực tiếp mầm bệnh vào ống tiêu hóa lại đòi hỏi kỹ thuật phức tạp và khó áp dụng trong thực tế sản xuất giống.

Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm thiết lập và so sánh ba mô hình cảm nhiễm nhân tạo của EHP trên tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) giai đoạn giống, qua đó xác định phương pháp phù hợp để ứng dụng trong nghiên cứu dịch tễ và định hướng giải pháp quản lý sức khỏe tôm nuôi.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu gồm hai nội dung chính:

- Thiết lập ba mô hình cảm nhiễm nhân tạo của EHP trên tôm thẻ chân trắng giai đoạn giống, bao gồm: (i) cho tôm khỏe ăn mô gan tụy của tôm bị nhiễm EHP; (ii) tiêm trực tiếp mô gan tụy nhiễm EHP vào tuyến gan tụy tôm khỏe; và (iii) nuôi chung tôm khỏe với tôm bị nhiễm EHP.

- Đánh giá và lựa chọn mô hình cảm nhiễm phù hợp cho nghiên cứu trong điều kiện phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị nguồn EHP

Nguồn EHP được thu thập từ tôm thẻ chân trắng có dấu hiệu còi cọc, chậm lớn tại các trại nuôi ở thành phố Huế. Gan tụy từ 05 cá thể tôm dương tính với EHP (đã được xác nhận bằng PCR) được thu thập và đồng nhất trong dung dịch PBS 1× (Phosphate-Buffered Saline, pH 7,4) chứa chloramphenicol 100 µg/mL trong 30 phút nhằm loại bỏ vi khuẩn tạp. Hỗn dịch sau đó được ly tâm ở 2200 vòng/phút trong 1 phút, phần dịch nổi được thu, pha loãng 1:10 trong dung dịch nước muối 0,86% vô trùng và bảo quản ở -80°C với 20% glycerol theo mô tả của Mai và cs. (2020).

Số lượng EHP được định lượng bằng phương pháp real-time quantitative PCR (qPCR) sử dụng TaqMan probe. Cặp mồi và probe đặc hiệu cho gene SSU rDNA của EHP và gene tham chiếu 18S rRNA của tôm được trình bày chi tiết trong Bảng 1, theo các nghiên cứu của Mai và cs. (2020), Tang và cs. (2015) và Liu và cs. (2018). Phản ứng qPCR được thực hiện theo phương pháp của Liu và cs. (2018) với chu trình nhiệt gồm 95°C trong 30 giây, tiếp theo 40 chu kỳ gồm 95°C trong 5 giây và 60°C trong 30 giây.

Mẫu EHP sau khi định lượng được pha loãng về nồng độ 10^7 bản sao/µL DNA nhằm chuẩn hóa liều gây nhiễm cho các nghiệm thức cảm nhiễm. Dung dịch gan tụy từ tôm âm tính với EHP và các bệnh thường gặp khác được chuẩn bị tương tự để làm đối chứng âm. Trước khi sử dụng làm nguồn gây nhiễm trong thí nghiệm, các mẫu EHP được kiểm tra bằng PCR để xác nhận dương tính với EHP và âm tính với các bệnh thường gặp trên tôm gồm WSSV, YHV, IHHNV, TSV và AHPND. Việc kiểm tra được thực hiện tại phòng xét nghiệm của Công ty R.E.F Biotech (Việt Nam).

2.2.2. Nguồn tôm thí nghiệm

Tôm thí nghiệm (1,5 - 2 g/con) được cung cấp từ trại sản xuất giống Phan Toàn, phường Thuận An, thành phố Huế, đã qua kiểm dịch tại Trạm Chẩn đoán xét nghiệm và điều trị bệnh động vật thành phố Huế, đảm bảo âm tính với EHP, AHPND và các bệnh virus phổ biến (WSSV, YHV, IHHNV, TSV). Tôm được thuần dưỡng trong điều kiện phòng thí nghiệm 07 ngày trước khi bố trí thí nghiệm. Trong thời gian thuần dưỡng, tôm được nuôi trong điều kiện: độ mặn 20‰, oxy hòa tan 4–6 mg/L, pH 7,0–7,5 và dòng chảy nhẹ nhằm duy trì lưu thông nước ($\approx 1,4$ cm/s). Tôm được cho ăn thức ăn công nghiệp (CP) 4 lần/ngày, chia đều trong ngày (8h00, 12h00, 14h00, 17h00) với khẩu phần 5% khối lượng thân.

2.2.3. Thí nghiệm cảm nhiễm EHP

2.2.3.1. Thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Cảm nhiễm EHP qua thức ăn

Thí nghiệm gồm 2 nghiệm thức: NT1 tôm được cho ăn với thức ăn trộn dịch gan tụy tôm âm tính EHP; NT2 tôm được cho ăn với thức ăn trộn dịch gan tụy tôm dương tính EHP. Tôm được bố trí trong bể 120 L với mật độ 20 con/bể và mỗi nghiệm thức được bố trí 3 lần lặp. Thức ăn trộn dịch gan tụy tôm được chuẩn bị theo mục 2.2.1. Trong thí nghiệm này tôm được cho ăn thức ăn trộn dịch gan tụy 1 lần/ngày trong 4 ngày liên tiếp. Thời gian cho ăn trong 4 ngày liên tiếp được lựa chọn dựa trên mô hình cảm nhiễm EHP qua đường miệng đã được mô tả bởi Mai và cs. (2020), đồng thời nhằm đảm bảo tôm có đủ thời gian tiếp xúc và tích lũy mầm bệnh qua đường tiêu hóa, tránh gây stress kéo dài do việc sử dụng thức ăn trộn dịch gan tụy nhiễm EHP.

Thí nghiệm 2: Cầm nhiễm bằng tiêm trực tiếp nguồn EHP vào khối gan tụy

Thí nghiệm 2 gồm 4 nghiệm thức: NT1 (đối chứng 1: tiêm dịch gan tụy âm tính EHP), NT2 (tiêm dịch gan tụy dương tính EHP), NT 3 (đối chứng 2: tiêm nước muối sinh lý) và NT4 (sham - chọc kim nhưng không tiêm). NT4 giúp phân biệt tác động cơ học của thao tác chọc/tiêm với tác động của mẫu tiêm. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, bố trí trong bể 120 L với mật độ 20 tôm/bể.

Trong thử nghiệm sơ bộ, tiêm 0,1 mL dịch gan tụy dẫn đến tử vong 100% trong vòng vài giờ sau tiêm. Do đó, trong thí nghiệm chính thức, thể tích liều tiêm được điều chỉnh xuống 0,01 mL/tôm nhằm giảm tác động cơ học. Tôm được tiêm vào khối gan tụy bằng kim tiêm 30G gắn trên xilanh 1 mL, sau đó được nuôi duy trì 30 ngày theo điều kiện nêu ở mục 2.2.2.

Thí nghiệm 3: Thử nghiệm lây nhiễm nuôi chung được bố trí trên 3 bể có thể tích 120 L, mỗi bể gồm 10 con tôm thể chân trắng không mang mầm bệnh EHP (khối lượng trung bình 1,5 - 2 g/con) được nuôi cùng với 10 con tôm dương tính với EHP. Tôm tiếp tục được nuôi trong điều kiện chung (mục 2.2.2) trong 30 ngày, sau đó kiểm tra tỷ lệ nhiễm bệnh EHP bằng mô học và PCR.

2.2.3.2. Thu mẫu và xác định sự cầm nhiễm EHP trên tôm

Tôm được lấy mẫu tại thời điểm 30 ngày sau cầm nhiễm. Ở mỗi nghiệm thức, thu ngẫu nhiên 9 con (3 con/bể). Gan tụy tôm được chia làm hai phần: một phần được bảo quản lạnh (-20°C) để phát hiện và định lượng EHP bằng phương pháp realtime qPCR. Phần còn lại được cố định trong dung dịch Davidson để làm mô bệnh học. Mô gan tụy được xử lý, nhuộm H&E và

đánh giá mức độ tổn thương (Lightner, 1996). Mức độ tổn thương mô gan tụy tôm được phân loại theo thang G0–G4, trong đó G0 biểu thị mô gan tụy bình thường, không ghi nhận tổn thương; G1–G2 tương ứng với tổn thương nhẹ đến trung bình, đặc trưng bởi các biến đổi sớm và khu trú ở tế bào biểu mô ống gan tụy. G3–G4 phản ánh tổn thương nặng và lan rộng, với sự biến dạng cấu trúc ống và hoại tử mô gan tụy rõ rệt.

Phát hiện và định lượng EHP bằng qPCR

DNA tổng số từ mô gan tụy được chiết tách bằng DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germany; Cat. No. 69504). DNA sau chiết tách được định lượng bằng phương pháp đo quang phổ và pha loãng bằng nước không có nuclease để chuẩn hóa nồng độ ở mức 20 ng/μL trước khi sử dụng cho phản ứng qPCR. Phản ứng qPCR được thực hiện sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho vùng SSU rDNA của EHP (Liu và cs., 2018) và probe TaqMan (Bảng 1). Probe TaqMan là đoạn oligonucleotide gắn chất phát huỳnh quang và chất dập huỳnh quang, cho phép phát hiện tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu trong quá trình khuếch đại, giúp tăng độ chính xác của phản ứng.

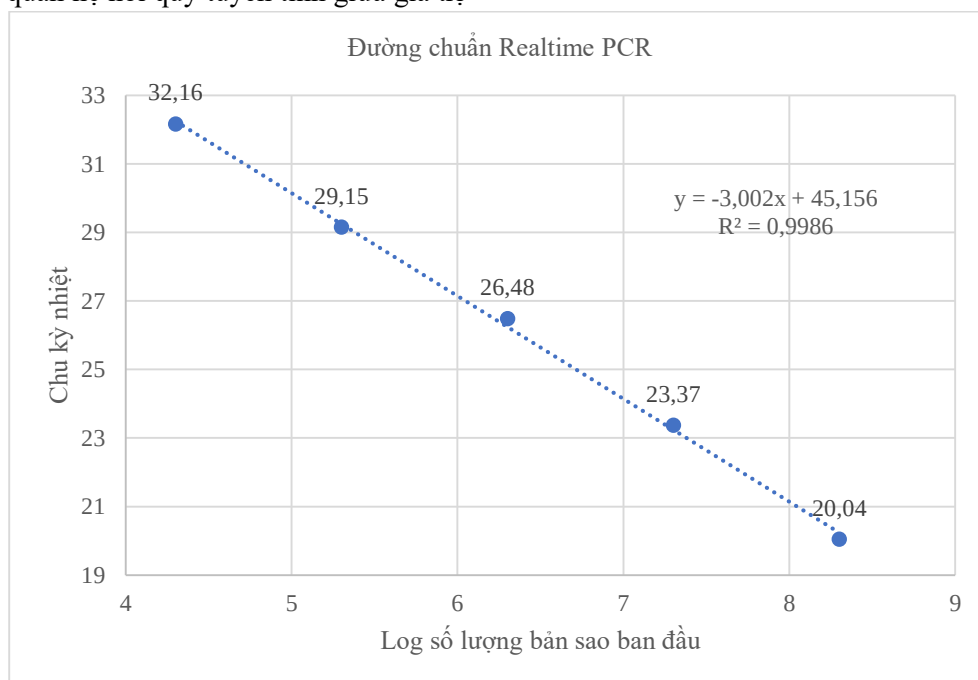
Gene 18S rRNA của tôm (Mai và cs., 2020; Tang và cs., 2015) được sử dụng làm gene nội chuẩn (internal control/housekeeping gene) nhằm kiểm soát chất lượng DNA và chuẩn hóa lượng DNA đầu vào giữa các mẫu. Trong mỗi phản ứng qPCR, các đối chứng bao gồm NTC (No-Template Control) và NEC (Negative-Extraction Control) được thiết lập để kiểm soát nhiễm chéo và tín hiệu giả.

Tỷ lệ mẫu dương tính (N, %) được tính theo công thức: $N = (\text{Số mẫu dương tính} / \text{Tổng số mẫu xét nghiệm}) \times 100$.

Để định lượng số bản sao EHP, một đường chuẩn được xây dựng từ plasmid

mang đoạn gene SSU rDNA của *Enterocytozoon hepatopenaei* với dải nồng độ từ $2,0 \times 10^4$ đến $2,0 \times 10^8$ bản sao/mL. Các nồng độ chuẩn được chạy đồng thời trong mỗi phản ứng qPCR nhằm thiết lập mối quan hệ hồi quy tuyến tính giữa giá trị

Ct và $\log_{10}$ số bản sao. Phương trình hồi quy thu được từ đường chuẩn ($y = -3,002x + 45,156$; $R^2 = 0,9986$) được sử dụng để tính toán số lượng bản sao EHP trong các mẫu gan tụy tôm thí nghiệm (Hình 1).



Hình 1. Đường chuẩn định lượng realtime qPCR cho *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) dựa trên gene SSU rDNA. Đường chuẩn được xây dựng từ plasmid mang trình tự đích với dải nồng độ từ $2,0 \times 10^4$ đến $2,0 \times 10^8$ bản sao/mL, cho thấy mối tương quan tuyến tính cao giữa giá trị Ct và $\log_{10}$ số bản sao ($y = -3,002x + 45,156$; $R^2 = 0,9986$).

Bảng 1. Chuỗi nucleotide của các môi và probe được sử dụng trong việc khuếch đại gene EHP và gene tham chiếu của tôm

Gene	Primers /probe	Trình tự (5'-3')	Amplicon (bp)	Nguồn
18S rRNA (tôm, đối chứng nội chuẩn)	18S-F	AATGGCTATCACGGGTAACG	630	Mai và cs., (2020) Tang và cs., (2015)
	18S-R	ATGCTTTTCGCAGTAGGTCGT		
SSU rDNA (EHP)	F157	AGTAAACTATGCCGACAA	157	Liu và cs., (2018)
	R157	AATTAAGCAGCACAAATCC		
	TaqMan Probe	FAM-TCCTGGTAGTGTCTTCCTCCGT-TAMRA		

2.2.4. Xử lý số liệu

Tỷ lệ sống và chết tích lũy được ghi nhận hằng ngày và so sánh giữa các nghiệm thức bằng phép kiểm định Chi-square hoặc Fisher's exact test (SPSS 20.0). Số bản sao EHP được xác định dựa trên đường chuẩn plasmid (10^1 - 10^7 bản sao/ μ L) và biểu thị theo đơn vị bản sao/ μ L DNA; dữ liệu được log₁₀-transform trước khi phân tích. Điểm tổn thương gan tụy (G0 - G4) được tổng hợp dưới dạng tỷ lệ (%) số mẫu ở từng mức tổn thương, đồng thời tính toán giá trị trung vị để mô tả xu hướng chung của từng nghiệm thức. Các số liệu được phân tích thống kê bằng ANOVA một nhân tố và phép so sánh hậu nghiệm Tukey HSD. Giá trị p luôn được trình bày trong trường hợp p rất nhỏ, kết quả được trình bày dưới dạng $p < 0,001$. Mức ý nghĩa thống kê được xác định tại $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

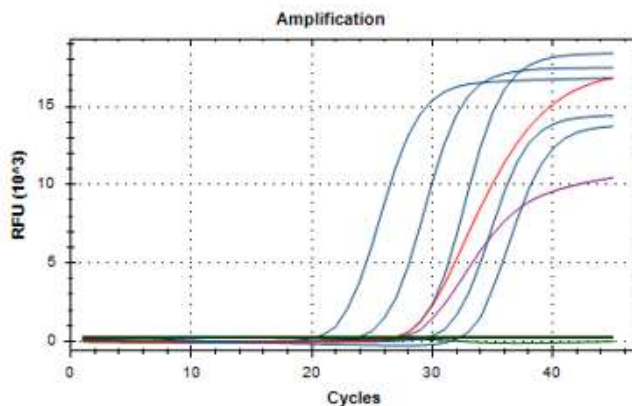
3.1. Đánh giá mô hình cảm nhiễm của EHP trên tôm thẻ chân trắng giai đoạn giống bằng phương pháp cho ăn

Sau 30 ngày thí nghiệm, kết quả PCR cho thấy tỷ lệ mẫu dương tính với EHP đạt 70% (7/9 mẫu) ở nhóm tôm được cho ăn gan tụy nhiễm EHP, trong khi nhóm đối chứng âm hoàn toàn âm tính. Kết quả định lượng

bằng qPCR cho thấy mật độ EHP trong gan tụy của tôm cảm nhiễm dao động từ $2,54 \times 10^7$ đến $7,84 \times 10^7$ bản sao/ μ L DNA (Ct trung bình = 24,75) (Hình 2).

Quan sát mô bệnh học cho thấy sự xuất hiện của các bào tử vi bào tử trùng trong tế bào biểu mô ống gan tụy, kèm theo mức độ tổn thương mô gan tụy từ G2–G3 (Hình 3).

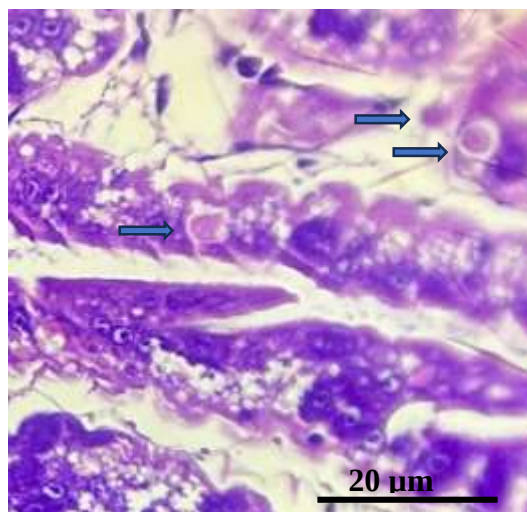
Mức độ nhiễm EHP ghi nhận trong nghiên cứu này nằm trong khoảng giá trị đã được báo cáo ở các nghiên cứu gây nhiễm EHP trước đây trên tôm thẻ chân trắng. Mai và cs. (2020) cho thấy mô hình cảm nhiễm qua đường miệng có thể tạo ra tải lượng EHP dao động từ 10^6 đến 10^8 bản sao/ μ L DNA ở các nghiệm thức gây nhiễm hiệu quả. Tương tự, Liu và cs. (2018) ghi nhận các giá trị Ct tương ứng với mức nhiễm trung bình đến cao khi sử dụng phương pháp qPCR dựa trên TaqMan probe. Sự tương đồng này cho thấy mô hình cho ăn trong nghiên cứu hiện tại có khả năng tái lập mức độ cảm nhiễm EHP, phù hợp cho các nghiên cứu dịch tễ và đánh giá biện pháp kiểm soát EHP trong điều kiện phòng thí nghiệm.



Hình 2. Đường cong khuếch đại realtime qPCR đại diện cho Enterocytozoon hepatopenaei (EHP) sử dụng TaqMan probe. Hình thể hiện dải đường cong chuẩn plasmid (standard, đường màu xanh) tương ứng với các nồng độ từ $2,0 \times 10^4$ đến $2,0 \times 10^8$ copies/mL, cùng với mẫu EHP dương tính đại diện (đường màu đỏ), chứng nội tại 18S rRNA của tôm (đường màu tím) và đối chứng âm.

Quan sát mô gan tụy cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa các nghiệm thức. Ở nhóm đối chứng, phần lớn mẫu nằm ở mức G0–G1 và không ghi nhận sự hiện diện của bào tử EHP. Ngược lại, trong nghiệm thức cho ăn mô gan tụy nhiễm EHP, tỷ lệ mẫu có tổn

thương mức G2–G3 chiếm ưu thế ($\approx 65\%$), với trung vị điểm tổn thương đạt G2. Các bào tử EHP xuất hiện rải rác trong tế bào biểu mô ống gan tụy, có hình thái tròn hoặc oval và bắt màu đậm khi nhuộm H&E.



Hình 3. Mô học gan tụy tôm bị nhiễm EHP bằng phương pháp cho ăn cho thấy các bào tử EHP rải rác trong tế bào biểu mô ống gan tụy (mũi tên), nhuộm H&E. Mức độ tổn thương mô quan sát được tương ứng từ G2–G3 theo phân loại Lightner (1996). Thang đo: 20 μm .

3.2. Đánh giá mô hình cảm nhiễm của EHP trên tôm thẻ chân trắng giống bằng phương pháp tiêm trực tiếp vào tuyến gan tụy

Trong thử nghiệm sơ bộ, tiêm 0,1 mL dịch gan tụy chứa EHP vào khối gan tụy của tôm (1,5 - 2 g/con) dẫn tới tỷ lệ chết 100% trong vòng vài giờ sau tiêm. Do đó, trong thí nghiệm chính thức, thể tích liều tiêm được điều chỉnh giảm xuống 0,01 mL/tôm nhằm hạn chế tác động cơ học.

Tuy nhiên, kết quả cho thấy tỷ lệ chết cấp tính vẫn ở mức rất cao (90–95%) ở tất cả các nghiệm thức, bao gồm cả nhóm tiêm dịch gan tụy dương tính EHP, các nhóm đối chứng và nhóm sham (chọc kim nhưng

không tiêm) (Bảng 2). Đáng chú ý, tỷ lệ chết lên đến 90% ở nhóm sham cho thấy thao tác chọc/tiêm trực tiếp vào khối gan tụy đã gây tổn thương cơ học nghiêm trọng, dẫn đến chết cấp tính ở tôm giống kích cỡ nhỏ. Mặc dù nghiên cứu này không tiến hành phân tích mô học trên các tôm chết cấp tính, việc ghi nhận tỷ lệ chết cao tỷ lệ chết cao và tương đương giữa các nghiệm thức, bao gồm cả nhóm không tiếp xúc với nguồn EHP có nhận định rằng nguyên nhân gây chết chính là tổn thương cơ học hơn là sự nhân lên của EHP. Kết quả này gợi ý rằng phương pháp tiêm trực tiếp không phù hợp để xây dựng mô hình cảm nhiễm EHP ở tôm giống kích cỡ nhỏ.

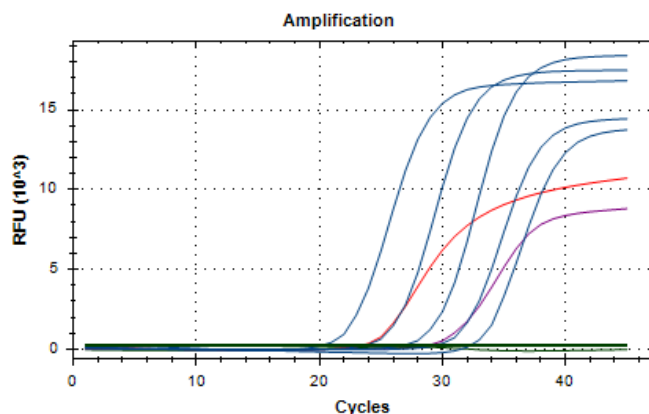
Bảng 2. Tỷ lệ chết của tôm ở các nghiệm thức khi cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm

Nghiem thức (NT)	Phương thức cảm nhiễm	Tỷ lệ chết sau 4 giờ (%)
NT1	Tiêm 0,01 mL dịch gan tụy tôm âm tính với EHP (đối chứng 1)	90
NT2	Tiêm 0,01 mL dịch gan tụy tôm dương tính với EHP	95
NT3	Tiêm 0,01 mL nước nuôi sinh lý (đối chứng 2)	95
NT4	Sham (chọc kim nhưng không tiêm)	90

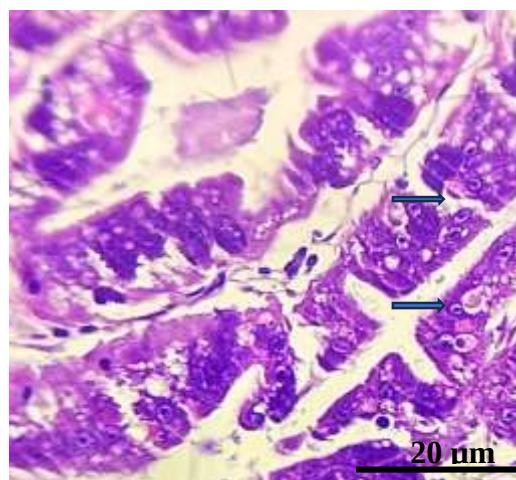
3.3. Đánh giá khả năng gây bệnh của EHP trên tôm thẻ chân trắng giống bằng phương pháp nuôi chung giữa tôm nhiễm và tôm không nhiễm EHP

Trong thí nghiệm nuôi chung tỷ lệ mẫu dương tính với EHP xác định bằng PCR đạt 30% (3/9 mẫu kiểm tra), thấp hơn đáng kể so với phương pháp cho ăn. Kết quả định lượng bằng qPCR cho thấy mật độ

EHP trong gan tụy ở mức thấp đến trung bình, đạt $1,02-1,39 \times 10^7$ bản sao/ μ L DNA (Ct trung bình = 27,24) (Hình 4). Phân tích mô bệnh học cho thấy một số cá thể có dấu hiệu nhiễm nhẹ với tổn thương chủ yếu ở mức G1 - G2, và sự hiện diện rải rác của bào tử EHP trong tế bào biểu mô ống gan tụy (Hình 4). Phân bố tổn thương tập trung chủ yếu ở mức G1 - G2 ($\approx 55\%$), trung vị điểm tổn thương là G1.



Hình 4. Đường cong khuếch đại realtime qPCR đại diện cho Enterocytozoon hepatopenaei (EHP) trong thí nghiệm nuôi chung. Hình thể hiện mẫu EHP dương tính đại diện (đường màu đỏ), chứng nội tại 18S rRNA của tôm (đường màu tím), dải đường cong chuẩn plasmid SSU rDNA (đường màu xanh) tương ứng với các nồng độ từ $2,0 \times 10^4$ đến $2,0 \times 10^8$ copies/mL, và đối chứng âm.



Hình 5. Mô học gan tụy tôm thẻ chân trắng trong nghiệm thức nuôi chung, nhuộm hematoxylin–eosin (H&E), cho thấy các bào tử Enterocytozoon hepatopenaei (EHP) rải rác trong tế bào biểu mô ống gan tụy (mũi tên). Thang đo: 20 μm .

3.4. Hiệu quả gây nhiễm của ba phương pháp cảm nhiễm

Kết quả thí nghiệm cho thấy sự khác biệt rõ rệt về hiệu quả cảm nhiễm EHP giữa ba phương pháp áp dụng trên tôm thẻ chân trắng giai đoạn giống (Bảng 3).

Phương pháp cho ăn cho hiệu quả cao nhất, với tỷ lệ nhiễm đạt 70% và mật độ EHP cao, dao động từ $2,54\text{--}7,84 \times 10^7$ bản sao/ μL DNA, kèm theo tổn thương mô gan tụy ở mức trung bình (G2–G3). Ngược lại, phương pháp tiêm trực tiếp vào khối gan tụy không tái tạo được quá trình cảm nhiễm sinh học do tỷ lệ chết cấp tính rất cao (90–95%) ở tất cả các nghiệm thức, bao gồm cả nhóm sham (chọc kim nhưng không tiêm mẫu), cho thấy nguyên nhân chết chủ yếu là tổn thương cơ học. Phương pháp nuôi chung phản ánh cơ chế lây truyền tự nhiên giữa tôm nhiễm và tôm khỏe, nhưng cho tỷ lệ nhiễm thấp hơn (30%) và mật độ EHP thấp hơn, dao động từ $1,02\text{--}1,39 \times 10^7$ bản sao/ μL DNA, với tổn thương mô gan tụy chủ yếu ở mức nhẹ (G1–G2).

Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, trong đó phương pháp cho ăn sử dụng mô gan tụy nhiễm EHP được chứng minh là hiệu quả trong việc gây nhiễm qua đường tiêu hóa – con đường lây truyền tự nhiên của EHP ở tôm (Tang và cs., 2016; Salachan và cs., 2017; Mai và cs., 2020; Tourtip và cs., 2009). Ngược lại, Rajendran và cs. (2016) cho rằng phương pháp tiêm chỉ phù hợp với tôm kích thước lớn, trong khi ở tôm giống nguy cơ tổn thương cơ học rất cao. Hiệu quả lây nhiễm thấp của phương pháp nuôi chung trong nghiên cứu này cũng phù hợp với các báo cáo trước đây về sự hạn chế của hình thức tiếp xúc tự nhiên trong điều kiện thí nghiệm (Tangprasittipap và cs., 2013).

Tổng hợp các kết quả, phương pháp cho ăn được xác định là lựa chọn ưu tiên để xây dựng mô hình cảm nhiễm EHP trong điều kiện phòng thí nghiệm; nuôi chung phù hợp cho các nghiên cứu về lây lan và dịch tễ học, trong khi tiêm trực tiếp không thích hợp đối với tôm thẻ chân trắng giai đoạn giống.

Bảng 3. So sánh hiệu quả cảm nhiễm của ba phương pháp

Phương pháp	Tỷ lệ nhiễm (%)	Mật độ EHP (bản sao/ μ L DNA)	Tổn thương mô gan tụy	Ghi chú
Cho ăn	70	$2,54-7,84 \times 10^7$	G2-G3	Ổn định, hiệu quả
Tiêm trực tiếp vào khối gan tụy	Tỷ lệ chết từ 90-95%	Không xác định	Không xác định	Không phù hợp
Nuôi chung	30	$1,02-1,39 \times 10^7$	G1-G2	Mô phỏng lây lan tự nhiên

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã cung cấp bằng chứng thực nghiệm về sự khác biệt rõ rệt trong hiệu quả cảm nhiễm EHP ở tôm thẻ chân trắng giai đoạn giống khi áp dụng các phương pháp khác nhau. Phương pháp cho ăn được xác định là khả thi và đáng tin cậy để xây dựng mô hình cảm nhiễm trong điều kiện phòng thí nghiệm, trong khi nuôi chung phản ánh tốt cơ chế lây lan tự nhiên nhưng kém hiệu quả hơn. Ngược lại, phương pháp tiêm trực tiếp không thích hợp cho tôm giống do gây tử vong cơ học cao.

Nghiên cứu tiếp theo cần tập trung vào việc tối ưu hóa phương pháp cảm nhiễm cho ăn để xây dựng mô hình cảm nhiễm ổn định, đồng thời ứng dụng mô hình này để nghiên cứu cơ chế gây bệnh và đánh giá hiệu quả các biện pháp phòng trị EHP.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ của công ty cổ phần sinh học R.E.P (Việt Nam) và nhóm nghiên cứu tiêu biểu của Đại học Huế mã số NCTB.DHH.2025.08. Nhóm tác giả cũng xin cảm ơn sinh viên Mã Quốc Việt lớp NTTS 55C, Nguyễn Đăng Ngọc Ảnh lớp BHTS55 đã hỗ trợ theo dõi thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aldama-Cano, D.J., Sanguanrut, P., Munkongwongsiri, N., Ibarra-Gómez, J.C., Itsathitphaisarn, O., Vanichviriyakit, R., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S. (2018). Bioassay for spore polar tube extrusion of shrimp

Enterocytozoon hepatopenaei (EHP). *Aquaculture*, 490, 156–161.

Aranguren, L. F., Mai, H., Pichardo, O., Hanggono, B., & Dhar, A. K. (2019). White feces syndrome in shrimp: Predictor of EHP. *Global Aquaculture Advocate*, 29.

Aranguren, L.F., Han, J.E., Tang, K.F.J. (2017). *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is a risk factor for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 471, 37–42.

Chayaburakul, K., Nash, G., Pratanpipat, P., Sriurairatana, S., Withyachumnarnkul, B. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60, 89–96.

Lightner. (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

Liu, Y. M., Qiu, L., Sheng, A. Z., Wan, X. Y., Cheng, D. Y., & Huang, J. (2018). Quantitative detection method of *Enterocytozoon hepatopenaei* using TaqMan probe real-time PCR. *Journal of invertebrate pathology*, 151, 191-196.

Mai, H. N., Cruz-Flores, R., Caro, L. F. A., White, B. N., & Dhar, A. K. (2020). A comparative study of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) challenge methods in *Penaeus vannamei*. *Journal of invertebrate pathology*, 171.

<https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107336>

Rajendran, K.V., Shivam, S., Ezhil Praveena, P., Joseph Sahaya Rajan, J., Kumar, T.S. (2016). Experimental host range and histopathology of *Enterocytozoon*

- hepatopenaei* (EHP) in shrimp. *Aquaculture*, 450, 283–288.
- Salachan, P.V., Jaroenlak, P., Thitamadee, S., Itsathitphaisarn, O., Sritunyalucksana, K. (2017). Laboratory challenge model for shrimp *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infection. *Aquaculture Reports*, 5, 18–22.
- 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 Veterin. Res.* 13, 9.
- Sokolova, Y., Pelin, A., Hawke, J., Corradi, N. (2015). Morphology and phylogeny of *Agmasoma penaei* (Microsporidia) from the type host, *Litopenaeus setiferus*, and the type locality, Louisiana, USA. *International Journal for Parasitology*, 45, 1–16.
- Tang, K.F.J., Aranguren, L.F., Piamsomboon, P., Han, J.E., Maskaykina, I.Y., Schmidt, M.M. (2017). Detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and Taura syndrome virus in *Penaeus vannamei* cultured in Venezuela. *Aquaculture* 480, 17–21.
- Tang, K.F.J., Han, J.E., Aranguren, L.F., White-Noble, B., Schmidt, M.M., Piamsomboon, P., Risdiana, E. (2016). Dense aggregations of microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) spores in the hepatopancreas of shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 120(3), 191–197.
- Tang, K.F.J., Han, J.E., Aranguren, L.F., White-Noble, B., Schmidt, M.M., Piamsomboon, P., Risdiana, E., Hanggono, B. (2016). Dense populations of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in feces of *Penaeus vannamei* exhibiting white feces syndrome and pathways of their transmission to healthy shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 140, 1–7.
- Tangprasittipap, A., Srisala, J., Chouwddee, S., Somboon, M., Chuchird, N., Limsuwan, C., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S. (2013). The microsporidian parasite *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 139.
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P.V., Sritunyalucksana, K., Flegel, T.W., Itsathitphaisarn, O. (2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture* 452, 69–87.
- Tourtip, S., Wongtripop, S., Stentiford, G.D., Bateman, K.S., Sriurairatana, S., Chavadej, J., Sritunyalucksana, K., Withyachumnarnkul, B. (2009). *Enterocytozoon hepatopenaei*, a parasite of the hepatopancreas of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(1), 21–29.