

INVESTIGATION ON VIRULOGY OF *Vibrio parahaemolyticus* CAUSING DISEASES IN WHITE LEG SHRIMP

Nguyen Thi Bien Thuy^{1,2*}, Nguyen Thi Hanh¹, Le Thi May¹, Tran Van Tuan², Dang Thi Lua¹

¹Research Institute for Aquaculture No. 1

²University of Science - Vietnam National University, Hanoi

ARTICLE INFO		ABSTRACT
Received:	06/01/2025	The study investigated the virulence of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> bacteria causing disease in whiteleg shrimp as an important scientific basis for further studies on the immune response and resistance of shrimp to <i>V. parahaemolyticus</i> bacteria. The results of the virulence survey of 9 strains of <i>V. parahaemolyticus</i> bacteria isolated from diseased whiteleg shrimp samples identified 4 strains (CAB16002, CAB19003, CAB25001, and CED12020) carrying 2 toxin genes, <i>pirA^{vp}</i> and <i>pirB^{vp}</i> . All 4 strains produced exotoxin enzymes hemolysin, phospholipase, and lipase. Of which, the strongest activity of exotoxin enzymes was found in <i>V. parahaemolyticus</i> strain CED12020. The bacterial strain <i>V. parahaemolyticus</i> CED12020 causes disease and death in whiteleg shrimp at cell densities from 10 ⁴ cfu ml ⁻¹ to 10 ⁷ cfu ml ⁻¹ with a mortality rate of 14.17-100%. The LD ₅₀ value of <i>V. parahaemolyticus</i> CED12020 on whiteleg shrimp (5-6 g/individual) was determined to be 3.0×10 ⁵ cfu ml ⁻¹ .
Revised:	11/6/2025	
Published:	11/6/2025	
KEYWORDS		
Extracellular Enzyme		
Toxin gene		
LD50		
Whiteleg Shrimp		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		

ĐIỀU TRA ĐỘC LỰC CỦA VI KHUẨN *Vibrio parahaemolyticus* GÂY BỆNH TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG

Nguyễn Thị Biên Thùy^{1,2*}, Nguyễn Thị Hạnh¹, Lê Thị Mây¹, Trần Văn Tuấn², Đặng Thị Lua¹

¹Viện nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản I

²Trường Đại học Khoa học tự nhiên - ĐHQG Hà Nội

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 06/01/2025	Nghiên cứu điều tra độc lực vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i> gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng làm cơ sở khoa học quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo về đáp ứng miễn dịch và sức đề kháng của tôm đối với vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> . Kết quả khảo sát độc lực của 9 chủng vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> được phân lập trên mẫu tôm thẻ chân trắng bị bệnh đã xác định được 4 chủng (CAB16002, CAB19003, CAB25001, CED12020) mang 2 gen độc tố <i>pirA^{vp}</i> và <i>pirB^{vp}</i> . Cả 4 chủng đều sinh enzyme ngoại độc tố hemolysin, phospholipase và lipase. Trong đó, hoạt động của các enzyme ngoại độc tố mạnh nhất được tìm thấy ở chủng vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> CED12020. Chủng vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> CED12020 gây bệnh và gây chết tôm thẻ chân trắng ở mật độ tế bào từ 10 ⁴ cfu/ml đến 10 ⁷ cfu/ml với tỷ lệ gây chết tôm từ 14,17-100%. Giá trị LD ₅₀ của vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> CED12020 trên tôm thẻ chân trắng (5-6 g/con) được xác định là 3.0×10 ⁵ cfu/ml.
Ngày hoàn thiện: 11/6/2025	
Ngày đăng: 11/6/2025	
TỪ KHÓA	
Enzym ngoại bào	
Gen độc tố	
LD ₅₀	
Tôm thẻ chân trắng	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.11819>

* Corresponding author. Email: ntbthuy@ria1.org

1. Giới thiệu

Vibrio parahaemolyticus là một loại vi khuẩn biển hình que, cong, ưa mặn, không tạo bào tử, Gram âm. Chúng có khả năng sống linh hoạt như một sinh vật tự do hoặc ký sinh trên động vật phù du, cá, động vật có vỏ và tôm. Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được xác định là một trong những tác nhân gây bệnh nguy hiểm trên tôm, đặc biệt là bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND), trước đây được gọi là hội chứng chết sớm (EMS) [1]. AHPND đã gây thiệt hại kinh tế lên tới hàng tỷ đô la kể từ năm 2010, khi lần đầu tiên được phát hiện ở Trung Quốc và Việt Nam [2]. Kể từ khi xuất hiện, nó đã lây lan nhanh chóng và các trường hợp đã được báo cáo ở Malaysia (2010), Thái Lan (2011), Mexico (2013), Philippines (2014), các nước Nam Mỹ (2014-2016), Bangladesh (2017), Hoa Kỳ (2017), Đài Loan (2018), Hàn Quốc (2019) và Nhật Bản (2020) [3] - [5]. Tuy nhiên, không phải tất cả các chủng *V. parahaemolyticus* đều gây bệnh, chỉ những chủng sản sinh ra protein độc tố PirA, PirB, mới có thể gây ra bệnh AHPND [6] - [8].

Sự lây lan toàn cầu của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm làm nổi bật tầm quan trọng của việc xác định các yếu tố độc lực và tác động của chúng lên vật chủ. Các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có thể thích nghi và tồn tại trong nhiều môi trường khác nhau và khả năng gây bệnh cho vật chủ cũng khác nhau tùy loài [9]. Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có rất nhiều yếu tố liên quan đến độc lực, trong đó hoạt động của các enzym ngoại bào là một trong những yếu tố độc lực quan trọng của vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, có liên quan đến khả năng gây bệnh [9]. Hemolysin là các yếu tố liên quan đến độc lực đầu tiên được xác định ở vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, đây là ngoại độc tố làm phân giải tế bào hồng cầu và giải phóng hemoglobin. Một số enzyme ngoại bào khác như phospholipase và lipase là những yếu tố độc lực quan trọng và phổ biến ở vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, có liên quan trực tiếp đến đặc điểm bệnh lý của những bệnh do vi khuẩn này gây ra [10].

Nghiên cứu này tiến hành điều tra độc lực của các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng (cỡ từ 5-6 g/con), thông qua việc xác định gen độc tố, hoạt động của một số enzyme ngoại bào độc lực và điều tra độc lực của chúng trên tôm thẻ chân trắng. Nghiên cứu sẽ là cơ sở khoa học đầu tiên quan trọng, phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo về đáp ứng miễn dịch và sức đề kháng của tôm thẻ chân trắng đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chín chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* ký hiệu là CAB16002, CAB19003, CAB20002, CAB21001, CAB22001, CAB25001, CAB28002, CED12020 và CAB30002 được phân lập trên mẫu tôm thẻ chân trắng bị bệnh từ bộ chủng sưu tập của Viện nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I (Ria1).

Tôm thí nghiệm là tôm thẻ chân trắng khỏe mạnh, có trọng lượng từ 5-6 g/con (trung bình $5,32 \pm 0,02$ g/con). Trước khi thử nghiệm, tôm được nuôi 01 tuần tại phòng thí nghiệm ươm thuộc Ria1, đồng thời được kiểm tra để xác nhận rằng chúng không mắc các bệnh: bệnh đốm trắng (WSD), bệnh đầu vàng (YHD), bệnh đỏ đuôi (TSV), bệnh hoại tử dưới vỏ và cơ quan tạo máu (IHNV) và bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPNS).

2.2. Khảo sát độc lực của các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

2.2.1. Sàng lọc các chủng *V. parahaemolyticus* mang gen độc tố *pirA^{vp}*, *pirB^{vp}*

Gen độc tố của 9 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được xác định thông qua sự có mặt của gen mã hóa protein độc tính *pirA^{vp}* dựa trên cặp mồi đặc hiệu VpPirA-284 và gen *pirB^{vp}* dựa trên cặp mồi VpPirB-392 [11]. Trình tự các cặp mồi được trình bày tại Bảng 1.

Thành phần phản ứng Multiplex PCR được thiết lập dựa trên Kit HS Master Mix2× (Meridian Bioscience, Đức); với thể tích 25μl gồm 12,5μl MyTaq Mix 2×; 0,6μl mồi 10μM mỗi loại; 2μl DNA khuôn (~ 100ng) và 8,1μl H₂O đệm ion. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR như sau: 94°C

trong 3 phút; sau đó là 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 60°C trong 30 giây, 72°C trong 30 phút); cuối cùng ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di gel agarose 1,5% với thang DNA chuẩn 50bp (Hyper Ladder™ 50 bp - Bioline, Mỹ).

Bảng 1. Trình tự 02 cặp mồi sử dụng

Gen	Tên mồi	Trình tự mồi (5'-3')	Kích thước (bp)
<i>pirA^{vp}</i>	VpPirA-284F	5'-TGACTATTCTCACGATTGGACTG-3'	284
	VpPirA-284R	5'-CACGACTAGCGCCATTGTTA-3'	
<i>pirB^{vp}</i>	VpPirB-392F	5'-TGATGAAGTGATGGGTGCTC-3'	392
	VpPirB-392R	5'-TGTAAGCGCCGTTTAACTCA-3'	

2.2.2. Đánh giá hoạt tính một số enzyme độc lực (hemolysin, phospholipase và lipase) của các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Các chủng vi khuẩn xác định mang gen độc tố *pirA^{vp}*, *pirB^{vp}* được sử dụng để xét nghiệm hoạt tính phospholipase, lipase và hemolysin. Hoạt tính của các enzyme được xác định theo phương pháp của Liu và cộng sự [12], Zhang và Austin [13], Austin và cộng sự [14] với một số sửa đổi. Vi khuẩn được nuôi cấy tăng sinh trong 24 giờ với mật độ tế bào đạt 10^6 cfu/ml để sử dụng cho các xét nghiệm, mỗi xét nghiệm được thực hiện ít nhất 3 lần, cụ thể:

Hoạt tính hemolysin được xác định bằng cách nhỏ 10 µl huyền phù vi khuẩn vào giữa đĩa thạch chứa môi trường Tryptone casein Soy Agar -TSA (Himedia, Ấn Độ), có bổ sung 5% máu cừu. Đọc kết quả đường kính vòng tan huyết (mm) sau 2 ngày ở 28 °C.

Hoạt tính của phospholipase được xác định bằng cách nhỏ 10 µl huyền phù vi khuẩn vào giữa đĩa thạch chứa môi trường TSA (Himedia, Ấn Độ) có bổ sung 1% Egg yolk emulsion (Himedia, Ấn Độ). Đọc kết quả đường kính vòng thủy phân (mm) sau 2-4 ngày ở 28 °C.

Hoạt tính của lipase được xác định bằng cách nhỏ 10 µl huyền phù vi khuẩn vào giữa đĩa thạch chứa môi trường TSA (Himedia-Ấn Độ) có bổ sung 1% Tween 80. Đọc kết quả đường kính vòng thủy phân (mm) sau 2-4 ngày ở 28°C.

2.3. Điều tra độc lực vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm thẻ chân trắng

Vi khuẩn được sử dụng là chủng *V. parahaemolyticus* CED12020 mang gen độc tố (*pirA^{vp}*, *pirB^{vp}*) và có hoạt độ cao của các enzym ngoại bào độc lực. Vi khuẩn được nuôi cấy tăng sinh trong 24 giờ ở 28°C trong 3 L môi trường Nutrient broth (Merck, Đức) có bổ sung 2% NaCl. Mật độ tế bào vi khuẩn ($2,2 \times 10^8$ cfu/ml) đã được xác định bằng máy so màu ở OD 610 nm và kết hợp với đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch. Thí nghiệm điều tra độc lực vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm thẻ chân trắng được thực hiện với 4 nghiệm thức về mật độ tế bào vi khuẩn ($2,2 \times 10^7$; $2,2 \times 10^6$; $2,2 \times 10^5$ và $2,2 \times 10^4$ cfu/ml) và 01 nghiệm thức đối chứng (không bị gây nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*). Thí nghiệm được thực hiện ngẫu nhiên hoàn toàn trong 15 bể có thể tích 200 L, mỗi nghiệm thức được thực hiện trong 3 bể tương ứng với 3 lần lặp.

Tôm bị gây nhiễm bởi *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp ngâm [15]. Cho 01 L huyền phù vi khuẩn ($2,2 \times 10^8$ cfu/ml) vào xô nhựa chứa 9 L nước (độ mặn 18 ‰) để đạt được nồng độ vi khuẩn là $2,2 \times 10^7$ cfu/ml. Sau đó lấy 1 L nước từ xô này cho vào xô thứ 2 chứa 9 L nước để đạt nồng độ vi khuẩn $2,2 \times 10^6$ cfu/ml. Tiếp tục làm như vậy cho xô thứ 3 và thứ 4 để đạt được nồng độ vi khuẩn $2,2 \times 10^5$ cfu/ml và $2,2 \times 10^4$ cfu/ml. Mỗi nồng độ vi khuẩn được thực hiện trong 3 xô, tương ứng với 3 lần lặp. Sau đó tôm được thả vào từng xô, mỗi xô thả 40 con (cỡ $5,32 \pm 0,02$ g/con), ngâm trong 2 tiếng có sục khí. Tôm trong các xô đối chứng được ngâm trong 10 L nước có độ mặn 18 ‰. Sau 2 giờ ngâm trong huyền phù vi khuẩn ở các mật độ khác nhau, tôm được rửa qua nước sạch có độ mặn 18 ‰ và được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên vào các bể thí nghiệm có thể tích 200 L/bể. Thí nghiệm được theo dõi trong 15 ngày, ghi nhận các dấu hiệu bệnh lý và tỷ lệ chết tích lũy. Tôm có biểu hiện bệnh lý được thu mẫu 3 con/bể để phân lập và tái định danh vi khuẩn *V. parahaemolyticus* bằng phản ứng sinh hóa kit API 20E (bioMérieux, Pháp) và PCR dựa trên cặp

môi VpPirB-392 [11]. Độc lực của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm thẻ chân trắng được xác định qua giá trị LD₅₀. Giá trị LD₅₀ được tính toán theo công thức của Reed & Muench [16]:

$$y = \log LD_{50} = \log (\text{nồng độ thấp nhất gây chết} > 50\%) - (\log 10 \times \text{pd}).$$

$$\text{pd} = (\text{tỷ lệ chết thấp nhất} > 50\% - 50) / (\text{tỷ lệ chết thấp nhất} > 50\% - \text{tỷ lệ chết cao nhất} < 50\%).$$

$$LD_{50} = (\text{hệ số của nồng độ vi khuẩn trong huyền phù ban đầu}) \times 10^y.$$

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

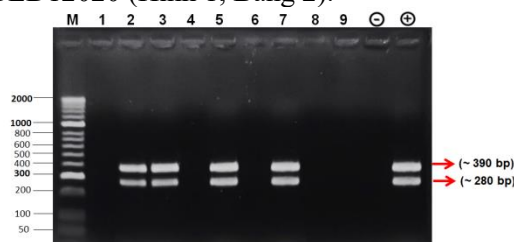
Số liệu được xử lý bằng phương pháp phân tích phương sai ANOVA 1 nhân tố trên phần mềm Minitab 16, theo phép thử Turkey để so sánh sự khác nhau giữa các nghiệm thức, sự khác nhau được xem là có ý nghĩa khi $p < 0,05$. Kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả khảo sát yếu tố độc lực của các chủng vi khuẩn

3.1.1. Sàng lọc các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* mang gen độc tố *pirA^{vp}*, *pirB^{vp}*

Sự có mặt của các gen mã hóa protein độc tính *pirA^{vp}*, *pirB^{vp}* dựa trên các cặp mồi đặc hiệu cho đoạn chỉ thị của các gen *pirA^{vp}* (284 bp) và *pirB^{vp}* (392 bp) [17] đã xác định được 4/9 chủng *V. parahaemolyticus* chứa gen độc tố *pirA^{vp}*, *pirB^{vp}* trên plasmid, bao gồm các chủng CAB16002, CAB19003, CAB25001 và CED12020 (Hình 1, Bảng 2).



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR mẫu vi khuẩn

Ghi chú: Giếng M: Ladder 50bp (Hyper Ladder™ 50 bp-Bioline, Mỹ); Giếng 1-9: Mẫu DNA vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân tích theo thứ tự: CAB20002, CAB16002, CAB19003, CAB21001, CAB25001, CAB22001, CED12020, CAB28002, CAB30002; Giếng (-): Đối chứng âm; Giếng (+): Đối chứng dương.

Bảng 2. Kết quả phân tích gen độc lực các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Chủng vi khuẩn	Kết quả tách chiết DNA			Gen độc lực	
	Nồng độ (ng/μl)	OD260/280	OD260/230	PirA	PirB
CAB20002	545,2	1,85	2,14	(-)	(-)
CAB16002	47,8	1,92	2,10	(+)	(+)
CAB19003	463,5	2,03	2,05	(+)	(+)
CAB21001	323,1	1,94	2,02	(-)	(-)
CAB25001	621,4	1,99	2,04	(+)	(+)
CAB22001	333,6	1,98	2,08	(-)	(-)
CED12020	182,1	1,92	2,02	(+)	(+)
CAB28002	505,2	1,84	1,99	(-)	(-)
CAB30002	636,5	1,92	1,98	(-)	(-)

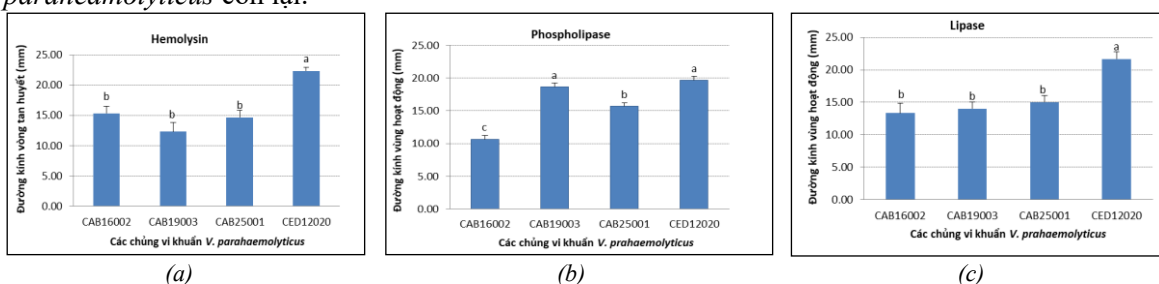
Độc tố PirA, PirB là hai protein từ nuôi cấy vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đã được xác định là tương tự với các độc tố diệt côn trùng nhị phân đã biết là protein liên quan đến côn trùng A và B của Photorehabdus [14]. Độc tố PirA, PirB tiết ra bởi vi khuẩn *V. parahaemolyticus* cư trú chính là thủ phạm gây ra bệnh hội chứng gan tụy cấp trên tôm [6]-[8], [14]. Các gen tương ứng của chúng là *pirA^{vp}* và *pirB^{vp}* nằm trên một plasmid có kích thước lớn (69 -70 kb). Trên plasmid, gen *pirA^{vp}* và *pirB^{vp}* nằm trên vùng nucleotide với kích thước khoảng 3,5kb với hai lần lặp đảo ngược của chuỗi mã hóa transposase 1kb [17]. Gen *pirA^{vp}* và *pirB^{vp}* mã hóa cho protein có kích thước khoảng 13 và 50 kDa [17]. Sự kết hợp của cả hai protein độc tính PirA và PirB là cần thiết để gây ra các dấu hiệu bệnh

điển hình trên tôm. Vai trò của từng protein riêng lẻ trong quá trình sinh bệnh vẫn chưa được mô tả đầy đủ [6]. 04 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (CAB16002, CAB19003, CAB25001, CED12020) được xác định mang cả 2 gen mã hóa protein PirA và PirB, chứng tỏ 4 chủng vi khuẩn này có độc tố, có khả năng gây bệnh trên tôm. Do vậy, 04 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (CAB16002, CAB19003, CAB25001, CED12020) được lựa chọn để khảo sát hoạt tính của một số enzyme độc lực.

3.1.2. Hoạt tính một số enzyme độc lực (hemolysin, phospholipase và lipase) của vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Hoạt tính hemolysin: Kết quả xác định vùng hoạt động của hemolysin cho thấy, có sự khác nhau có ý nghĩa về hoạt độ hemolysin của các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ($p < 0,05$). Chủng CED12020 có hoạt độ hemolysin cao nhất, đường kính vòng tan huyết đạt $22,33 \pm 0,58$ mm. Không có sự sai khác về hoạt độ hemolysin đối với các chủng CAB16002 ($15,33 \pm 1,15$ mm), CAB19003 ($12,33 \pm 1,53$ mm) và CAB25001 ($14,67 \pm 1,15$ mm) (Hình 2a). Kết quả này tương đồng với các kết quả của Broberg và cộng sự (2011) [17], Lingzhi và cộng sự (2019) [18], Marieke và cộng sự (2023) [10], hemolysin là loại độc tố phổ biến nhất ở các loài *Vibrio* gây bệnh. Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có thể sản xuất 3 loại hemolysin tan máu trực tiếp chịu nhiệt (TDH), tan máu liên quan đến TDH (TRH) và tan máu không bền nhiệt (TLH) được mã hóa lần lượt bởi các gen *tdh*, *trh* và *tlh*. Hemolysin tan máu chịu nhiệt được coi là các yếu tố gây bệnh chính. Hemolysin tác động trực tiếp lên các tế bào hồng cầu và có hoạt tính tan máu, hoạt tính độc tố ruột, độc tính tim và độc tính tế bào [18]. Quá trình tan máu của hemolysin được trung gian bởi các thụ thể. Hemolysin liên kết chặt chẽ với màng tế bào hồng cầu, phá hủy màng tế bào và màng lysosome theo cách phụ thuộc vào nhiệt độ [18].

Hoạt tính phospholipase: Hoạt độ phospholipase khác nhau có ý nghĩa giữa các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thử nghiệm ($p < 0,05$). Phospholipase được quan sát thấy cao nhất ở chủng CED12020 ($19,67 \pm 0,58$ mm) và CAB19003 ($18,67 \pm 0,58$ mm), thấp nhất ở chủng CAB16002 ($10,67 \pm 0,58$ mm) (Hình 2b). Phospholipase là một trong số enzyme có trong màng ngoài của vi khuẩn Gram âm trong đó có vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, có khả năng tham gia vào các quá trình phá vỡ màng, xảy ra trong quá trình xâm nhập tế bào vật chủ và sinh bệnh của vi khuẩn [19]. Phospholipase tạo thành một phân nhóm đa dạng của các enzym lipolytic có khả năng thủy phân một hoặc nhiều liên kết ester của phospholipid với phosphodiesterase [20]. Phospholipid là đại diện cho các thành phần hóa học chính của lớp vỏ tế bào vật chủ [19]. Do đó, hoạt độ phospholipase cao hơn ở chủng CV21002 và CV17003 cho thấy khả năng có thể phá hủy phospholipid của lớp vỏ tế bào và xâm nhập vào tế bào vật chủ mạnh hơn so với 02 chủng *V. parahaemolyticus* còn lại.



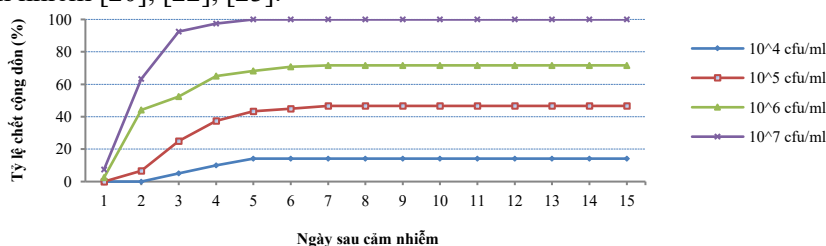
Hình 2. Hoạt tính hemolysin, phospholipase, lipase của các chủng *V. parahaemolyticus*

Hoạt tính lipase: Kết quả cho thấy, cả 4 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thử nghiệm đều có hoạt tính lipase, kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Costa và cộng sự (2013) cho rằng lipase là một yếu tố độc lực phổ biến của *V. parahaemolyticus* [21]. Trong 4 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thử nghiệm, hoạt độ lipase cao nhất được tìm thấy ở chủng CED12020 ($21,67 \pm 1,15$ mm) ($p < 0,05$). Không có sự khác biệt đáng kể nào ($p > 0,05$) về hoạt độ lipase

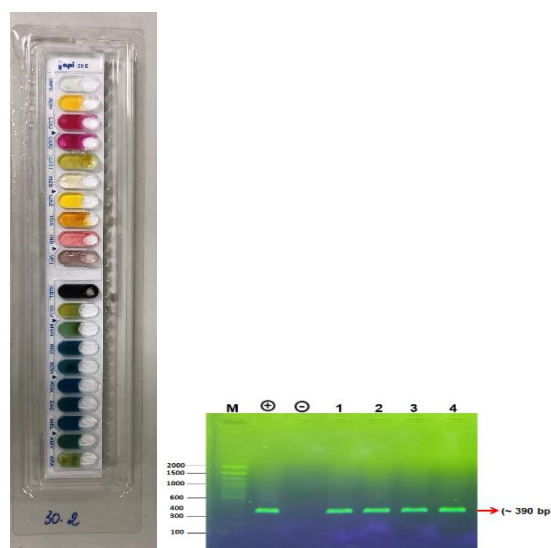
giữa các chủng CAB16002 ($13,33 \pm 1,53$ mm), CAB19003 ($14,00 \pm 1,00$) và CAB25001 ($15,00 \pm 1,00$) (Hình 2c). Enzym ngoại bào này đóng vai trò quan trọng trong việc gây tổn thương mô vật chủ, tạo điều kiện cho mầm bệnh tiếp nhận chất dinh dưỡng và xâm nhập mô [10]. Việc giảm hoạt động của lipase có khả năng làm giảm độc lực của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* [10].

3.2. Độc lực vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng

Chủng CED12020 có độc lực mạnh nhất được lựa chọn để gây nhiễm trên tôm thẻ chân trắng. Kết quả sau 15 ngày thí nghiệm cho thấy, mật độ tế bào vi khuẩn gây nhiễm ảnh hưởng đến tỷ lệ chết của tôm ($p < 0,05$). Mật độ tế bào vi khuẩn ở 10^7 cfu/ml gây chết tôm lớn nhất với tỷ lệ 100%, tỷ lệ tôm chết thấp nhất ở mật độ tế bào 10^4 cfu/ml với tỷ lệ 14,17% (Hình 3). Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng tỷ lệ chết của tôm phụ thuộc vào mật độ tế bào vi khuẩn cảm nhiễm [20], [22], [23].



Hình 3. Tỷ lệ chết tích lũy của tôm thẻ chân trắng bị gây nhiễm bởi *V. parahaeolyticus*



Hình 4. Kết quả phản ứng sinh hóa kit API 20E và điện di sản phẩm PCR vi khuẩn phân lập trên tôm biểu hiện bệnh sau khi gây nhiễm *V. parahemolyticus* CED12020

Ghi chú: Giếng M: Ladder 100bp, Giếng (+): Đối chứng dương, Giếng (-): Đối chứng âm, Giếng 1, 2, 3, 4: Mẫu DNA của vi khuẩn phân lập trên tôm biểu hiện bệnh ở các nghiệm thức theo thứ tự 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 cfu/ml

Sau 1 ngày gây nhiễm, tôm xuất hiện các triệu chứng bơi lơ dờ, phản xạ chậm, bỏ ăn và bắt đầu có hiện tượng chết ở mật độ 10^7 cfu/ml. Tôm chết nhiều nhất vào ngày thứ 2 ở tất cả các mật độ vi khuẩn gây nhiễm, các ngày tiếp theo tôm chết rải rác và dừng chết ở ngày thứ 7. Trong khi đó, ở nghiệm thức đối chứng, không có hiện tượng tôm bị chết, tôm khỏe mạnh và hoạt động bình thường cho đến khi kết thúc thí nghiệm. Đối với tôm có biểu hiện bệnh ở các nghiệm thức bị gây nhiễm, phần gan tụy tôm sưng và dễ tổn thương khi ấn nhẹ. Kết quả phân lập vi khuẩn trên mẫu tôm bị bệnh cho thấy, vi khuẩn mọc khuẩn lạc màu xanh trên môi trường TCBS. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn bằng kit API 20E và PCR đã xác định vi khuẩn là chủng *V.*

parahaemolyticus (Hình 4). Điều này cho thấy, trong quá trình thí nghiệm, tôm không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác, tôm chết là do bị gây nhiễm bởi vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* khi tiếp xúc với tôm thẻ chân trắng đã lây lan rất nhanh đến gan tụy và ruột tôm, chúng lây lan nhanh chóng bằng cách sử dụng gan tụy tôm làm mô đích, sự lan rộng mạnh nhất của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được tìm thấy sau 6-12h tiếp xúc, sau đó độc tố của chúng gây tổn thương và làm chết tôm ở các thời điểm tiếp theo [23].

Từ kết quả thu được về tỷ lệ tôm chết ở các mật độ vi khuẩn gây nhiễm, tính toán theo công thức của Reed và Muench [16], xác định giá trị LD_{50} của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* CED12020 trên tôm thẻ chân trắng cỡ $5,32 \pm 0,02$ g/con là $3,0 \times 10^5$ cfu/ml (Bảng 3).

Bảng 3. Xác định giá trị LD_{50} của *V. parahaemolyticus* trên tôm thẻ chân trắng

Thông số	Mật độ tế bào <i>V. parahaemolyticus</i> gây nhiễm (cfu/ml)			
	$2,2 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^7$
Tỷ lệ chết (%)	$14,17 \pm 1,44^d$	$46,67 \pm 1,44^c$	$71,67 \pm 3,82^b$	$100 \pm 0,00^a$
pd	$(71,67 - 50) / (71,67 - 46,67) = 0,87$			
y	$\log 10^6 - (\log 10 \times pd) = 5,13$			
LD_{50}	$2,2 \times 10^{5,13} = 3,0 \times 10^5$			

Theo nhiều nghiên cứu, mật độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* cần thiết để gây nhiễm trùng ở tôm thẻ chân trắng rất cao, lên tới 10^3 đến 10^8 cfu/ml. Giá trị LD_{50} của chúng trên tôm thẻ chân trắng cũng thay đổi tùy theo chủng vi khuẩn, đường lây nhiễm, thời gian lây nhiễm, kích cỡ tôm, mức độ căng thẳng và hệ thống miễn dịch của tôm [1], [24], [25]. Nghiên cứu của Lopez và cộng sự [26] xác định giá trị LD_{50} của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng cỡ 0,1-0,5 g/con bằng phương pháp ngâm trong 72 giờ là $6,0 \times 10^4$ - $3,0 \times 10^5$ cfu/ml. Một nghiên cứu khác của Võ Văn Tuấn và cộng sự [22], xác định giá trị LD_{50} của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm thẻ chân trắng cỡ 2-3g/con, bằng phương pháp ngâm trong 2 giờ là $4,7 \times 10^6$ cfu/ml. Nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Phước và cộng sự [20] cho thấy, giá trị LD_{50} của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây nhiễm bằng ngâm tôm thẻ chân trắng cỡ 2-2,5 g/con trong 60 phút là 10^5 cfu/ml. Tác giả cho rằng khả năng đề kháng của tôm cỡ nhỏ đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* kém hơn so với tôm cỡ lớn. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, kích thước tôm thí nghiệm có cỡ lớn hơn (5-6g/con) nhưng giá trị LD_{50} của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* CED12020 vẫn đạt $3,0 \times 10^5$ cfu/ml. Sự khác biệt này có thể do thời gian gây nhiễm và độc tính của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thử nghiệm.

4. Kết luận

Điều tra độc lực của 9 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được phân lập trên mẫu tôm thẻ chân trắng bị bệnh từ bộ chủng sưu tập của Rial đã xác định được 4 chủng (CAB16002, CAB19003, CAB25001, CED12020) mang cả 2 gen độc tố *pirA^{vp}* và *pirB^{vp}*. Cả 4 chủng đều sinh enzyme ngoại độc tố hemolysin, phospholipase và lipase. Trong đó, hoạt động của các enzyme ngoại độc tố mạnh nhất được tìm thấy ở chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* CED12020. Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* CED12020 gây bệnh và gây chết tôm thẻ chân trắng ở mật độ tế bào từ 10^4 cfu/ml đến 10^7 cfu/ml với tỷ lệ gây chết tôm từ 14,17-100%. Giá trị LD_{50} của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* CED12020 trên tôm thẻ chân trắng cỡ 5-6 g/con được xác định là $3,0 \times 10^5$ cfu/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] V. Kumar *et al.*, "Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): Virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture," *Toxins (Basel)*, vol. 13, no. 8, pp. 1-28, 2021.
- [2] K. F. J. Tang, M. G. Bondad-Reantaso, J. R. Arthur, B. MacKinnon, B. Hao, and V. Alday-Sanz, "Shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease strategy manual," in *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, FAO: Rome, Italy, vol. 1190, 2020, pp. 1-48.
- [3] C. Hernández-Cabanyero, E. Carrascosa, S. Jiménez, and B. Fouz, "Exploring the effect of functional diets containing phytochemical compounds in whiteleg shrimp health: Resistance to acute hepatopancreatic necrotic disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*," *Animals*, vol. 13, pp. 1-17, 2023.

- [4] J. E. Han *et al.*, "Genomic and histopathological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from an acute hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Korea," *Aquaculture*, vol. 24, pp. 1-8, 2024.
- [5] World Organisation for Animal Health, "Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease," in *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, Paris, France, 2019, pp. 1-12.
- [6] R. Sirikharin *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*, vol. 10, pp. 1-16, 2015.
- [7] D. Zhang, T. J. Bader, M. D. Lange, C. A. Shoemaker, and B. H. Beck, "Toxicity of recombinant PirA and PirB derived from *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp," *Microbial Pathogenesis*, vol. 155, pp. 1-6, 2021.
- [8] S.-J. Lin, J.-Y. Huang, P.-T. Le, C.-T. Lee, C.-C. Chang, Y.-Y. Yang, E. C.-Y. Su, C.-F. Lo, and H.-C. Wang, "Expression of the AHPND Toxins PirA^{vp} and PirB^{vp} is regulated by components of the *Vibrio parahaemolyticus* Quorum Sensing (QS) System," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 5, pp. 1-14, 2022.
- [9] S. Matsuda *et al.*, "Export of a *Vibrio parahaemolyticus* toxin by the Sec and type III secretion machineries in tandem," *Nat. Microbiol.*, vol. 4, pp. 781-788, 2019.
- [10] M. Vandeputte, M. Verhaeghe, L. Willocx, P. Bossier, and D. Vanrompay, "Bovine Lactoferrin and Hen Ovitransferrin Affect Virulence Factors of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)-Inducing *Vibrio parahaemolyticus* Strains," *Microorganisms*, vol. 11, pp. 1-17, 2023.
- [11] J. E. Han, K. F. J. Tang, L. H. Tran, and D. V. Lightner, "Phototransducing 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*, vol. 113, no. 1, pp. 33-40, 2015.
- [12] P. C. Liu, K. K. Lee, and S. N. Chen, "Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn *Penaeus monodon*," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 22, pp. 413-416, 1996.
- [13] X. H. Zhang and B. Austin, "Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids," *J. Fish. Dis.*, vol. 23, pp. 93-102, 2000.
- [14] B. Austin, D. Austin, R. Sutherland, F. Thompson, and J. Swings, "Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*," *Environ. Microbiol.*, vol. 7, pp. 1488-1495, 2005.
- [15] T. Loc *et al.*, "Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 105, no. 1, pp. 45-55, 2013.
- [16] L. J. Reed and H. Muench, "A simple method of estimating fifty percent endpoints," *American Journal of Epidemiology*, vol. 27, no. 3, pp. 493-497, 1938.
- [17] C. A. Broberg, T. J. Calder, and K. Orth, "*Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants," *Microbes Infect.*, vol. 13, pp. 992-1001, 2011.
- [18] L. Lia, H. Meng, D. Gu, Y. Li, and M. Jia, "Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis," *Microbiological Research*, vol. 222, pp. 43-51, 2019.
- [19] T. S. Istivan and P. J. Coloe, "Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis," *Microbiology*, vol. 152, no. 5, pp. 1263-1274, 2006.
- [20] N. P. Nguyen, T. X. H. Nguyen, and C. C. Nguyen, "Study on the virulence factors of *Vibrio parahaemolyticus* caused Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in farmed white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Thua Thien Hue Province," *Vietnam J. Agri. Sci.*, vol. 18, no. 3, pp. 202-211, 2020.
- [21] R. A. Costa, L. M. C. Amorim, R. L. Araujo *et al.*, "Multiple enzymatic profiles of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from oysters," *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 45, no. 4, pp. 267-270, 2013.
- [22] V. T. Vo, T. T. T. Nguyen, and T. T. B. Vo, "Innate immune responses of whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) experimentally infected with acute hepatopancreas necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus*," *Journal of Agriculture and Development*, vol. 18, pp. 80-88, 2018.
- [23] U. Khimmakthong and P. Sukkarun, "The spread of *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of the Pacific white shrimp 2 *Litopenaeus vannamei* analyzed by PCR and histopathology," *Microbial Pathogenesis*, vol. 17, pp. 107-112, 2017.
- [24] K. A. Navaneeth *et al.*, "Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from shrimp farms of Southeast coast of India with special reference to Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) status," *Aquaculture*, vol. 518, no. 15, pp. 1-40, 2020.
- [25] C. T. Lee *et al.*, "The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 112, no. 34, pp. 10798-10803, 2015.
- [26] P. Lopez-Leon, A. Luna-Gonzalez, R. Escamilla-Montes, M. C. Flores-Miranda, J. A. Fierro-Coronado, P. Alvarez-Ruiz, and G. Diarte-Plata, "Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)," *Latin American Journal of Aquatic Research*, vol. 44, no. 3, pp. 470-479, 2016.