

NON-VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP (AHPND) TRÊN TÔM NUÔI

Đặng Thị Lua*, Nguyễn Viết Khuê, Phan Thị Vân

Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 1

Email*: danglua@ria1.org

Ngày gửi bài: 22.01.2016

Ngày chấp nhận: 29.04.2016

TÓM TẮT

Bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) hay còn gọi là hội chứng chết sớm (EMS) đã và đang trở thành một trong những mối nguy hại nhất đối với nghề nuôi tôm công nghiệp khu vực Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam. Bệnh xuất hiện trên cả tôm sú và tôm thẻ chân trắng và thường xảy ra ở tôm 20 - 45 ngày tuổi với tỷ lệ chết lên tới 100%. Tác nhân gây bệnh AHPND được xác định là do vi khuẩn mang Plasmid có chứa gen Toxin gây hoại tử gan tụy cấp. Dựa trên đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn, kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu nhận biết gen Toxin và giải trình tự đoạn gen 16S-rRNA, kết quả nghiên cứu đã khẳng định có ít nhất 3 chủng vi khuẩn gây bệnh AHPND trên tôm nuôi nước lợ ở Việt Nam, bao gồm 02 chủng vi khuẩn thuộc loài *Vibrio parahaemolyticus*, đó là *V. parahaemolyticus* KC12.020 và *V. parahaemolyticus* KC13.14.2 và 01 chủng vi khuẩn non - *V. parahaemolyticus*, đó là *V. harveyi* KC13.17.5. Việc phát hiện thêm loài vi khuẩn không phải là *V. parahaemolyticus* (non-*V. parahaemolyticus*) gây bệnh AHPND là phát hiện mới không chỉ đối với các nhà khoa học Việt Nam mà còn là phát hiện mới đối với thế giới.

Từ khóa: AHPND/EMS, non-*V. parahaemolyticus*, tôm chân trắng, tôm sú, *Vibrio parahaemolyticus*.

Non-Vibrio Parahaemolyticus Causing Acute Hepatopancreatic Necrosis on Brackish Shrimps

ABSTRACT

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), also known as Early Mortality Syndrome (EMS), has become one of the most harmful threats to the shrimp aquaculture industry in Southeast Asia, including Vietnam. It occurs on both tiger and white leg shrimps at 20 - 45 days of age with a mortality rate up to 100%. AHPND pathogens were identified as bacteria containing plasmid carrying toxin genes that cause acute hepatopancreatic necrosis. Observation of biochemical characteristics, the use of PCR technique using specific primers to detect the toxin genes and sequence analysis of 16S-rRNA gene confirmed that there were at least three strains of AHPND pathogenic bacteria on brackish shrimp cultured in Vietnam, of which two strains belong to *Vibrio parahaemolyticus* species, including *V. parahaemolyticus* KC13.14.2 and *V. parahaemolyticus* KC12.020; and the other strain of *Vibrio* sp. KC13.17.5. *Vibrio* sp. KC13.17.5 was confirmed as *V. harveyi* KC13.17.5, a non *V. parahaemolyticus* species. The detection of non - *V. parahaemolyticus* that caused AHPND is a new finding not only in Vietnam but also worldwide.

Keywords: AHPND/EMS, non - *V. parahaemolyticus*, tiger shrimp, *Vibrio parahaemolyticus*, white leg shrimp.

1. MỞ ĐẦU

Bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease - AHPND) hay còn gọi là hội chứng chết sớm (Early

Mortality Syndrome - EMS) đã và đang được xem là mối nguy hại nhất đối với nghề nuôi tôm công nghiệp ở khu vực Đông Nam Á mấy năm gần đây (FAO, 2013; Leñaño and Mohan, 2012). Dịch bệnh được ghi nhận đầu tiên ở Trung Quốc

năm 2009, sau đó tiếp tục được ghi nhận ở Thái Lan năm 2010, Việt Nam năm 2011, Malaysia năm 2012 (FAO, 2013) và gần đây đã xuất hiện ở Mexico năm 2013 (Schryver *et al.*, 2014). Ở Việt Nam, năm 2012, bệnh hoại tử gan tụy cấp tính xuất hiện ở 192 xã thuộc 54 huyện của 16 tỉnh, thành. Năm 2013, dịch bệnh xuất hiện ở 199 xã thuộc 19 tỉnh, thành và năm 2014 dịch bệnh xuất hiện ở 233 xã thuộc 22 tỉnh, thành có nuôi tôm nước lợ trên phạm vi cả nước (Cục Thú y, 2014).

AHPND xảy ra ở cả tôm sú và tôm thẻ chân trắng, chủ yếu ở các vùng nuôi tôm thâm canh và bán thâm canh ở giai đoạn 20 - 45 ngày sau khi thả nuôi và tỷ lệ chết có thể lên đến 100%. Tôm bệnh có biểu hiện ngừng ăn, bơi chậm, vỏ mỏng, màu tôm nhợt nhạt, gan tụy có biểu hiện sưng, nhũn hoặc teo và dịch bệnh xảy ra ở hầu hết các tháng trong năm (Schryver *et al.*, 2014; Leano and Mohan, 2012). Tác nhân gây bệnh AHPND được cho là vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (Tran *et al.*, 2013), ngoài ra còn có thể do vi khuẩn *Vibrio* sp. (Kwai *et al.*, 2014). Kết quả nghiên cứu sâu về tác nhân gây bệnh AHPND cho thấy bản chất gây ra AHPND là vi khuẩn mang Plasmid có chứa gen độc lực gây hoại tử gan tụy cấp (Lightner, 2014; Lo *et al.*, 2014; Tinwongger *et al.*, 2014a).

Trong nghiên cứu này, một số chủng vi khuẩn phân lập từ tôm nuôi nước lợ trong các đợt dịch bệnh AHPND xuất hiện ở miền Bắc được nuôi cấy và định danh dựa trên kết quả sinh hóa API 20E, sàng lọc dựa trên kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu nhận biết gen Toxin gây hoại tử gan tụy cấp và được định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn (*Vibrio* sp. KC12.020, *Vibrio* sp. KC13.14.2, *Vibrio* sp. KC13.17.5 và *Vibrio* sp. KC13.24.2) sử dụng trong nghiên cứu này được phân lập từ tôm chân trắng có biểu hiện bị bệnh AHPND thu tại một số tỉnh miền Bắc trong các đợt dịch bệnh và hiện đang lưu giữ ở -80°C tại Phòng thí nghiệm thuộc

Trung tâm Quan trắc môi trường và Bệnh thủy sản miền Bắc, Viện nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản 1. Chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. KC12.020 được thu tại Hải Phòng năm 2012, các chủng *Vibrio* sp. KC13.14.2, *Vibrio* sp. KC13.17.5 và *Vibrio* sp. KC13.24.2 được thu tại Nghệ An năm 2013.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Định danh vi khuẩn phân lập từ tôm bị bệnh AHPND bằng kit sinh hóa API 20E

Vi khuẩn được lấy ra từ -80°C và nuôi cấy lại trên môi trường TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts). Các khuẩn lạc mọc rời và điển hình trên đĩa TCBS được lựa chọn nuôi cấy sang Nutrient Agar (+) để nuôi cấy thuần. API-20E được sử dụng để thử phản ứng sinh hóa, định danh loài bằng cách tra trực tiếp trên trang web hỗ trợ định danh APIweb (<https://apiweb.biomerieux.com>).

2.2.2. Nhận biết vi khuẩn gây bệnh AHPND bằng kỹ thuật PCR

Để nhận biết các chủng vi khuẩn đã phân lập từ tôm bệnh có phải là các chủng gây bệnh AHPND hay không, các chủng vi khuẩn nuôi cấy trong môi trường NB (Nutrient Broth) được sử dụng để tách chiết DNA và sử dụng như nguồn ADN khuôn mẫu cho phản ứng PCR sử dụng các cặp mồi AP3 (Sirikharin *et al.*, 2014) và cặp mồi Toxin được cung cấp bởi giáo sư Ikuo Hirono, trưởng phòng thí nghiệm công nghệ gen, Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Tokyo (Bảng 1). Chu kỳ nhân nhiệt của phản ứng PCR được áp dụng như sau: giai đoạn tiền biến tính ở 94°C trong 5 phút, theo sau với 35 chu kỳ nhiệt gồm giai đoạn biến tính trong 1 phút ở 94°C, giai đoạn bắt cặp trong 30 giây ở 53°C và giai đoạn tổng hợp trong 40 giây ở 72°C, kết thúc với một giai đoạn kéo dài trong 5 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1% trong dung dịch 1X TAE (Tris-acetate-EDTA) có bổ sung Ethelium Bromine và đọc kết quả dưới ánh sáng đèn UV.

2.2.3. Định danh vi khuẩn gây bệnh AHPND bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Các chủng vi khuẩn gây bệnh AHPND tiếp tục được định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên sự tương đồng của gen 16S-rRNA. ADN của vi khuẩn được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 16S-rRNA (Bảng 1) để khuếch đại đoạn gen 16S-rRNA 874 bp.

Giải trình tự đoạn gen 16S-rRNA, đánh giá mức độ tương đồng và định danh vi khuẩn: Sản phẩm PCR dương tính từ phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 16S-rRNA được gắn vào pGEM-T easy vector (Promega, Madison, USA) và biến nạp vào competent cells (*E. coli* MJ 109).

Plasmid có chứa 16S-rRNA ADN trong T vector được giải trình tự bằng máy sequencer sử dụng Big Dye Terminator (Applied Biosystems). Mức độ tương đồng của đoạn gen 16S-rRNA ở các chủng trong nghiên cứu này được so sánh với trình tự Nucleotide của các đoạn 16S-rRNA của các chủng vi khuẩn khác đã được đăng ký trên ngân hàng gen bằng cách BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) trên GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) theo phương pháp Blastx. Sau đó, việc định danh chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu này sẽ được căn cứ dựa trên mức độ tương đồng với gen 16S-rRNA của loài vi khuẩn đã công bố trên GenBank.

Bảng 1. Các cặp mồi đã sử dụng trong nghiên cứu

Cặp mồi	Trình tự Nucleotides	Kích thước(bp)	Nguồn gốc cặp mồi
AP3	F: ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC R: GTGGTAATAGATTGTACAGAA	336	Sirikharin <i>et al.</i> (2014)
Toxin	F: GTGGAAATGGTGAACCTTGCG R: TACGAGCATTGTTAGGGGTTA	630	Phòng thí nghiệm của giáo sư Hirono
16S-rRNA	F: CGTGCCAGCAGCCGCGGTAA R: GCCCGGGAACGTATTCACCG	874	Được thiết kế trong nghiên cứu này



Hình 1. Kết quả thử phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập từ tôm bị bệnh AHPND

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và định danh vi khuẩn gây bệnh AHPND bằng kit sinh hóa API 20E

Kết quả định danh các chủng vi khuẩn được phân lập từ tôm bị bệnh AHPND bằng kit sinh hóa API 20E (Hình 1) được so sánh với khóa định danh vi khuẩn trên APIweb cho thấy *Vibrio* sp. KC12.020 và *Vibrio* sp. KC13.24.2 được định danh lần lượt là *V. parahaemolyticus* KC12.020 và *V. parahaemolyticus* KC13.24.2 trong khi *Vibrio* sp. KC13.14.2 và *Vibrio* sp. KC13.17.5 không cho phản ứng sinh hóa tương đồng với bất kỳ loài vi khuẩn nào nhưng gần gũi nhất với đặc điểm sinh hóa của chủng vi khuẩn đối chứng *V. parahaemolyticus* ATCC 43996 hoặc *V. vulnificus* biotype 1 trong hệ thống phân loại APIweb.

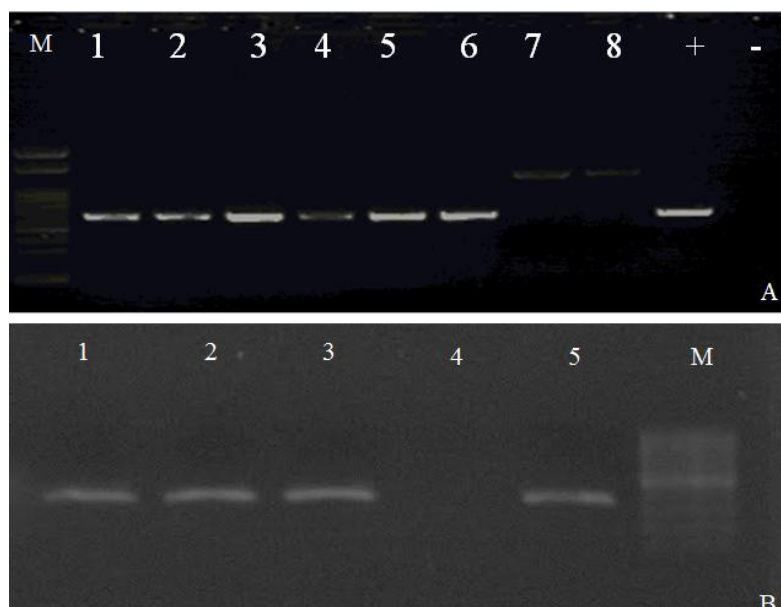
Vibrio sp. KC13.14.2 khác với chủng *V. parahaemolyticus* ATCC 43996 đối chứng ở 2 phản ứng sinh hóa, ONPG (β -galactosidase) và ARA (ARabinose) và khác với chủng *V. vulnificus* biotype 1 đối chứng ở 1 phản ứng sinh hóa GEL (GELatinase) (số liệu không trình

bày). Trong khi đó, *Vibrio* sp. KC13.17.5 khác với chủng *V. parahaemolyticus* ATCC 43996 đối chứng ở 4 phản ứng sinh hóa, ONPG, URE (UREase), GEL và ARA và khác với chủng *V. vulnificus* biotype 1 đối chứng ở 1 phản ứng sinh hóa URE (số liệu không trình bày).

3.2. Nhận biết vi khuẩn gây bệnh AHPND bằng kỹ thuật PCR

Bằng việc sử dụng cặp mồi AP3 và Toxin để nhận biết đoạn gen Toxin gây hoại tử gan tụy cấp đã xác định 3 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC12.020, *Vibrio* sp. KC13.14.2 và *Vibrio* sp. KC13.17.5 là các chủng vi khuẩn gây bệnh AHPND (Hình 2).

Cùng với việc xác định tác nhân gây bệnh AHPND là do chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* riêng biệt (unique) (Tran *et al.*, 2013), một số nhóm nghiên cứu sau đó đã đồng thời khẳng định vi khuẩn gây bệnh AHPND chứa Plasmid mang gen độc lực Toxin gây ra hiện tượng hoại tử gan tụy cấp (Lo *et al.*, 2014; Tinwongger *et al.*, 2014a) và cũng xuất phát từ những kết quả nghiên cứu khoa học này,



Hình 2. Kết quả xác định vi khuẩn gây bệnh AHPND bằng kỹ thuật PCR

Ghi chú: A (Sử dụng cặp mồi Toxin: (1, 2) *V. parahaemolyticus* KC12.020; (3, 4) *Vibrio* sp. KC13.7.5; (5, 6) *Vibrio* sp. KC13.14.2; (7, 8) *V. parahaemolyticus* KC13.24.2; (+) Đối chứng dương AHPND (cung cấp bởi giáo sư Hirono) và (-) Nước cất); B (sử dụng cặp mồi AP3: (1) *V. parahaemolyticus* KC12.020; (2) *Vibrio* sp. KC13.7.5; (3) *Vibrio* sp. KC13.14.2; (4) *V. parahaemolyticus* KC13.24.2 và (5) Đối chứng dương AHPND (cung cấp bởi giáo sư Hirono); M (Market 100bp).

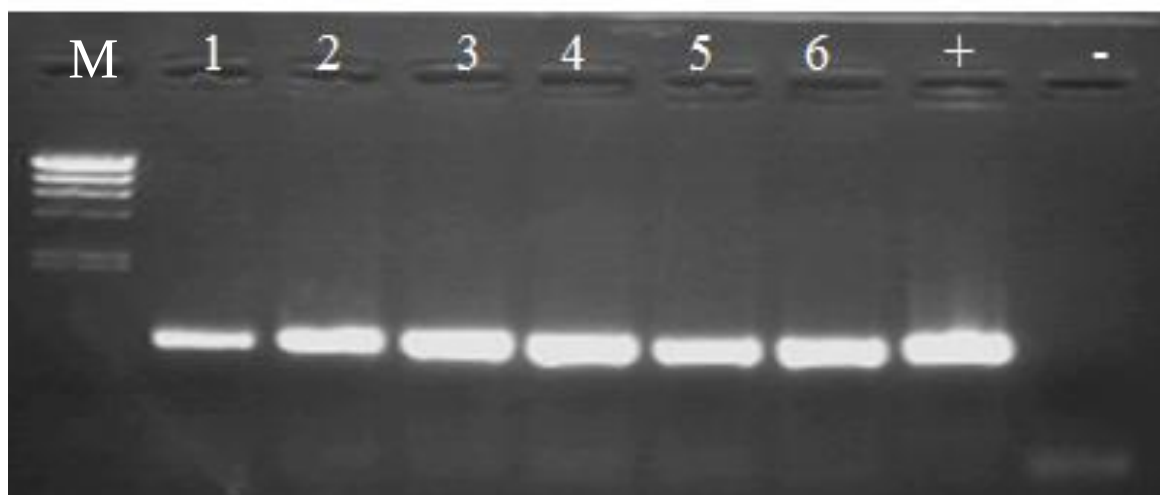
phương pháp chẩn đoán nhanh tác nhân gây bệnh AHPND được phát triển dựa trên việc nhận biết gen Toxin (Sirikharin *et al.*, 2014; Tinwongger *et al.*, 2014b). Theo kết quả nghiên cứu gần đây nhất, Kwai *et al.* (2014) đã bước đầu nhận định tác nhân gây bệnh AHPND ngoài *V. parahaemolyticus* có thể còn do *Vibrio* sp. Dựa vào kết quả nghiên cứu của chúng tôi có thể khẳng định có ít nhất 3 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC12.020, *Vibrio* sp. KC13.14.2 và *Vibrio* sp. KC13.17.5 gây bệnh AHPND trên tôm nuôi nước lợ ở Việt Nam. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước (Tran *et al.*, 2013; Kwai *et al.*, 2014). Dựa trên đặc điểm sinh hóa, *Vibrio* sp. KC13.14.2 và *Vibrio* sp. KC13.17.5 không hoàn toàn trùng với các đặc điểm của *V. parahaemolyticus*, như vậy chúng có thể là những chủng vi khuẩn thuộc loài *Vibrio* khác. Kết quả này đã củng cố cho nhận định bước đầu của nhóm Kwai *et al.* (2014) rằng *V. parahaemolyticus* có thể không phải là loài *Vibrio* duy nhất gây ra AHPND. Để làm rõ chủng vi khuẩn gây bệnh AHPND, *Vibrio* sp. KC13.14.2 và *Vibrio* sp. KC13.17.5, có phải *V. parahaemolyticus* hay không, chúng tôi đã tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về sinh học phân tử được trình bày ở mục 3.3.

Những kết quả nghiên cứu này cũng góp phần khẳng định Việt Nam có thể chẩn đoán, xét nghiệm bệnh AHPND trên tôm nuôi nước lợ sử dụng cặp mồi đã được công bố bởi các nhóm nghiên cứu trên thế giới như mồi AP3 của nhóm nghiên cứu Thái Lan và mồi Toxin của nhóm nghiên cứu Nhật Bản.

3.3. Định danh vi khuẩn gây bệnh AHPND bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Ba chủng vi khuẩn được xác định là chủng gây bệnh AHPND tiếp tục được định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên việc giải trình tự gen 16S-rRNA. Sản phẩm dương tính của phản ứng PCR với cặp mồi nhận biết đoạn gen 874 bp của 16S-rRNA (Hình 3) đã được tinh sạch, biến nạp vào T vector và giải trình tự Nucleotides (Hình 4, 5 và 6).

Kết quả BLAST trên ngân hàng GenBank đối với trình tự đoạn gen 16S-rRNA của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC.12.020 (Hình 4) cho thấy có sự tương đồng cao nhất với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* K5030 (mức tương đồng 98%; E-value: 2e-51). Như vậy, kết quả giải trình tự gen 16S-rRNA khẳng định việc phân loại vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC.12.020 dựa trên đặc điểm sinh hóa là chính xác.



Hình 3. Kết quả khuếch đại đoạn gen 16S-rRNA của chủng vi khuẩn gây bệnh AHPND

Ghi chú: (1, 2) *V. parahaemolyticus* KC.12.020; (3, 4) *Vibrio* sp. KC13.17.5; (5, 6) *Vibrio* sp. KC13.14.2; (+) Đối chứng dương AHPND (cung cấp bởi giáo sư Hirono); (-) Nước cất và (M) Marker.

Kết quả BLAST trên ngân hàng GenBank đối với trình tự đoạn gen 16S-rRNA của chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. KC.13.14.2 (Hình 5) cho thấy có sự tương đồng cao với 16S-rRNA của *V. parahaemolyticus*, đặc biệt với *V. parahaemolyticus* K5030 (mức tương đồng 100%; E-value: 2e-52). Vì gen 16S-rRNA bảo thủ và đặc trưng cho mỗi loài nên việc định danh vi khuẩn dựa trên việc giải trình tự gen 16S-rRNA thường có độ chính xác cao. Như vậy, kết quả này có thể khẳng định chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. KC13.14.2 thuộc loài *V. parahaemolyticus* và từ đây chủng vi khuẩn này ước đổi tên thành *V. parahaemolyticus* KC13.14.2.

Kết quả BLAST trên ngân hàng GenBank đối với trình tự đoạn gen 16S-rRNA của chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. KC.13.17.5 (Hình 6) cho thấy có sự tương đồng cao với trình tự đoạn gen

16S-rRNA của một số loài vi khuẩn công bố trên ngân hàng GenBank, bao gồm partial *V. harveyi* WP017190965.1 (mức tương đồng 100%; E-value: 7e-24); *V. scopthalmi* LMG19158 (mức tương đồng 98%; E-value: 8e-22) và *V. anguillarum* (mức tương đồng 96%; E-value: 7e-21). So sánh với kết quả định danh dựa trên đặc điểm sinh hóa được trình bày ở mục 3.1 thì *Vibrio* sp. KC.13.17.5 lại được xem là gần gũi nhất với *V. parahaemolyticus* và *V. vulnificus* biotype 1. Như vậy, kết hợp cả phương pháp định danh dựa trên đặc điểm sinh hóa và dựa trên trình tự gen 16S-rRNA có thể khẳng định *Vibrio* sp. KC13.17.5 không thuộc loài *V. parahaemolyticus*, tuy nhiên vẫn chưa đủ cơ sở khoa học để phân loại *Vibrio* sp. KC13.17.5 thuộc loài vi khuẩn nào trong số 3 loài có mức tương đồng cao là *V. harveyi* (partial), *V. scopthalmi* hay *V. anguillarum*.



Hình 4. Trình tự nucleotides của đoạn gen 16S-rRNA của chủng vi khuẩn *V. parahaemolitycus* KC.12.020



Hình 5. Trình tự nucleotides của đoạn gen 16S-rRNA của chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. KC13.14.2

Sau này ở một nghiên cứu khác, bằng cách giải trình tự bộ gen của *Vibrio* sp. KC13.17.5, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã có đủ cơ sở khoa học để định danh *Vibrio* sp. KC13.17.5 là *V. harveyi* KC13.17.5. Đây là một thông tin mới và có ý nghĩa về mặt khoa học nên đã được nhóm công bố nhanh kết quả dưới dạng thông báo trên tờ GenomeA (Kondo *et al.*, 2015).

4. KẾT LUẬN

Có ít nhất 3 chủng vi khuẩn gây bệnh AHPND trên tôm nuôi nước lợ ở Việt Nam,

trong đó 2 chủng thuộc loài *V. parahaemolyticus*, bao gồm chủng *V. parahaemolyticus* KC12.020 và chủng *V. parahaemolyticus* KC13.14.2; và 01 chủng non-*V. parahaemolyticus*, đó là chủng *V. harveyi* KC13.17.5.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin được gửi lời cảm ơn chân thành nhất đến giáo sư Ikuo Hirono và các cộng sự về sự hỗ trợ trong việc cung cấp mẫu ADN đối chứng của chủng vi khuẩn gây bệnh AHPND và sự giúp đỡ trong việc giải trình tự gen.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
KC13.17.5  TCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGGAGGGTGGGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTG

      90     100     110     120     130     140     150     160
KC13.17.5  TTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGT

      170    180    190    200    210    220    230    240
KC13.17.5  AGAATTTCAAGTGTAGCGGTGAAATCGGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTG

      250    260    270    280    290    300    310    320
KC13.17.5  ACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAG

      330    340    350    360    370    380    390    400
KC13.17.5  GTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTC

      410    420    430    440    450    460    470    480
KC13.17.5  AAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTT

      490    500    510    520    530    540    550    560
KC13.17.5  GACATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCG

      570    580    590    600    610    620    630    640
KC13.17.5  TGTTCGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTGTTCGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTCCA

      650    660    670    680    690    700    710    720
KC13.17.5  GGGAGACTGCCCGGTGATAAACCGGGAGGAAGTGGGGGACGACGTCGAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACA

      730    740    750    760    770    780    790    800
KC13.17.5  CACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGCGGCCAACTTTCGAGAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTCTAGTCCGGAT

      810    820    830    840    850    860    870    880
KC13.17.5  CCGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGG

KC13.17.5  C

```

Hình 6. Trình tự nucleotides của đoạn gen 16S-rRNA của chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. KC13.17.5

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cục Thú y (2014). Tổng kết Nuôi tôm nước lợ năm 2014 và xây dựng kế hoạch năm 2015. Bến Tre, ngày 4/11/2014.
- FAO (2013). Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPND) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304) FAO Fisheries and Aquaculture Report No 1053, Ha Noi, Viet Nam. p.54
- Kondo, H., Van, P.T., Dang, T.L. and Hirono, I. (2015). Draft genome sequence of Non-*Vibrio parahaemolyticus* Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Viet Nam. Genome Announc, 3(5): e00978-15. doi:10.1128/genomeA.00978-15.
- Kwai, L.T, Ung, E. H, Choo, S. W, Yew, S. M, Wee, W. Y, and Yap, K. P. (2014). An AP1, 2 & 3 PCR Positive non - *Vibrio parahaemolyticus* bacteria with AHPND histopathology. Paper presented at the 9th Symposium on Diseases in Asian

- Aquaculture (DAA9), Ho Chi Minh city, Vietnam, 24-28 November, 2014. Book of abstract, p. 77.
- Leaño, E. M., and Mohan, C.V. (2012). Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms. *GlobalAquaculture Advocate*, pp. 38 - 39.
- Lightner, D. V. (2014). Documentation of a unique strain of *Vibrio parahaemolyticus* as the agent of Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) affecting Penaeid shrimp with note on the putative toxins. Paper presented at the 9th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (DAA9), Ho Chi Minh city, Vietnam, 24-28 November, 2014. Book of abstract, p. 71.
- Lo, C.F., Lee, C.T., Chen, I.T., Yang, Y.T., and Wang, H. C. (2014). Recent Advances in the newly emergent acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Paper presented at the 9th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (DAA9), Ho Chi Minh city, Viet Nam, 24-28 November, 2014. Book of abstract, p. 72.
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S., Flegel, T. W., Mavichak, R., and Proespraiwong, P. (2014). A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2030.
- Schryver, D. P., Defoirdt, T., and Sorgeloos, P. (2014). Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming *PLoS pathogens*, 10(4): e1003919.
- Tinwongger, S., Thawonsuwan, J., Kongkumnerd, J., Nozaki, R., Kondo, H., and Hirono, I. (2014a). Characterization of virulence factor of AHPND *Vibrio parahaemolyticus* which is the causative agent of shrimp disease. Paper presented at the 9th Symposium on Diseases in Asian aquaculture (DAA9), Ho Chi Minh city, Viet Nam 24-28 November, 2014. Book of abstract, p. 73.
- Tinwongger, S., Proespraiwong, P., Thawonsuwan, J., Sriwanayos, P., Kongkumnerd, J., Chaweepeak, T., Mavichak, R., Unajak, S., Nozaki, R., Kondo, H., and Hirono, I. (2014b). Development of PCR diagnosis for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathology* 49(4): 159-164.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., and Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Disease of Aquatic Organisms*, 105: 45 - 55.