

SỰ HIỆN DIỆN CỦA *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* O3:K6 TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC NUÔI THỦY SẢN, HẢI SẢN TƯƠI SỐNG Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Trần Thị Hồng To¹, Du Minh Hiệp¹, Hideki Hayashidani²

TÓM TẮT

Vibrio parahaemolyticus là một trong những nhân tố quan trọng gây bệnh đường ruột trên người. Phần lớn các trường hợp nhiễm *V. parahaemolyticus* có liên quan đến ăn hải sản sống. Trong các type huyết thanh của *V. parahaemolyticus* phân lập từ bệnh nhân tiêu chảy, O3:K6 là type phổ biến nhất ở người nhiễm bệnh. Trong nghiên cứu này, mẫu hải sản tươi sống và mẫu nước nuôi nghêu, tôm ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) đã được kiểm tra để phát hiện *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực gây bệnh đường ruột. 204 mẫu hải sản tươi sống đã được thu từ các cửa hàng bán lẻ, 16 mẫu nghêu đã được thu từ vùng nuôi nghêu và 39 mẫu tôm đã được thu từ ao nuôi tôm thâm canh cùng với 30 mẫu nước sông, 22 mẫu nước ở vùng nuôi nghêu và 42 mẫu nước ở ao nuôi tôm thâm canh cũng đã được thu để phục vụ cho nghiên cứu này.

Kết quả nghiên cứu cho thấy có 10/172 (5,8%) mẫu nhuyễn thể ở cửa hàng bán lẻ dương tính với *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực *tdh*. Tuy nhiên, chủng vi khuẩn này không được tìm thấy trong mẫu tôm thu ở cửa hàng bán lẻ, mẫu hải sản thu ở trại nuôi và các loại mẫu nước đã thu. 10 chủng *V. parahaemolyticus* mang gen *tdh* phân lập đã xác định được type huyết thanh và dấu hiệu gây bệnh. Trong đó có 4 chủng thuộc type O3:K6 và cả 4 chủng này đều dương tính với dấu hiệu gây bệnh đường ruột ở người. Còn các chủng khác thì âm tính với dấu hiệu gây bệnh. Nghiên cứu này cung cấp thêm thông tin giúp hiểu rõ hơn về mối nguy vi sinh trong thực phẩm hải sản tươi sống ở ĐBSCL.

Từ khóa: O3:K6, hải sản, gen *tdh*, *Vibrio parahaemolyticus*, môi trường nước.

Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in aquaculture water environment and raw seafood in the Mekong Delta

Tran Thi Hong To, Du Minh Hiep, Hideki Hayashidani

SUMMARY

Vibrio parahaemolyticus is one of the important foodborne pathogens in human. Most of the infected cases relate to raw or undercook seafood. Among the serotypes of pathogenic *V. parahaemolyticus*, O3:K6 is the most important serotype because it was predominant serotype isolated from the patients in the worldwide. In this study, the raw seafood and water samples in the Mekong Delta were examined for prevalence of *V. parahaemolyticus* associated with foodborne illness in human. 204 raw seafood samples were collected in the retail markets, 16 clam samples were collected from the clam farms, 39 shrimp samples were collected from the intensive shrimp culture ponds, 30 water samples were collected from Mekong river, 22 water samples were collected from the clam farms and 42 water samples were collected from the intensive shrimp culture ponds, they were used as materials for this study.

The studied results indicated that there were 10/172 (5.8%) mollusca samples positive with *V. parahaemolyticus* carrying *tdh* virulent gene; meanwhile, this pathogenic bacterium was not found in the shrimp samples and other seafood samples collected from the aquaculture farms and river water samples collected from the Mekong Delta. 10 *V. parahaemolyticus* isolates carrying *tdh* gene were analyzed and from that serotypes and pathogenic signs were identified. Of which, 4 strains belonged to

¹ Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh

² Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp và Công nghệ Tokyo

serotype O3:K6 and all of 4 these strains were positive with the signs of causing the intestinal diseases in human. The other strains were negative to cause diseases. This studied result can be used for understanding microbiological risk of raw seafood in the Mekong Delta.

Keywords: O3:K6, seafood, *tdh* gene, *Vibrio parahaemolyticus*, water environment.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vibrio parahaemolyticus là vi khuẩn gram âm, di động, hình dấu phẩy hơi cong và ngắn, và phân bố ở vùng nước lợ mặn (Cục Y tế dự phòng - Bộ Y tế, 2016). Chúng có thể tồn tại tự do trong môi trường nước hoặc bám vào bề mặt của vật chất như hạt hữu cơ lơ lửng, động vật phù du, cá và giáp xác (Kaneko và Colwell, 1973). Chúng được phân loại dựa vào 13 loại kháng nguyên O và 71 loại kháng nguyên K (Iguchi et al., 1995). *V. parahaemolyticus* được xem là một trong những nhân tố quan trọng gây bệnh đường ruột trên người (Nelapati et al., 2012). Bệnh đường ruột do nhiễm *V. parahaemolyticus* được phát hiện đầu tiên vào năm 1950 ở Nhật Bản ở bệnh nhân ăn cá sống (Fujino et al., 1953). Sau đó, sự nhiễm *V. parahaemolyticus* được báo cáo khắp nơi trên thế giới và hầu hết các trường hợp nhiễm bệnh đều liên quan đến ăn hải sản sống (Daniels et al., 2000; Nelapati et al., 2012). Người nhiễm *V. parahaemolyticus* có triệu chứng buồn nôn, đau bụng, nhức đầu, tiêu chảy và sốt nhẹ (Daniels et al., 2000). Một số gen độc lực ở *V. parahaemolyticus* có liên quan đến bệnh đường ruột, trong đó quan trọng nhất là gen *tdh* (thermostable direct hemolysin) vì nó mã hóa hemolysin bền nhiệt và phần lớn *V. parahaemolyticus* phân lập từ bệnh nhân tiêu chảy mang gen độc lực này (Serichantalergs et al., 2007; Nelapati et al., 2012). *V. parahaemolyticus* gây bệnh đường ruột được nhận diện với nhiều type huyết thanh, trong đó O3:K6 xuất hiện phổ biến nhất ở bệnh nhân tiêu chảy do *V. parahaemolyticus*. Ở Tokyo, Nhật Bản, dịch tiêu chảy do O3:K6 tăng từ 10% năm 1995 đến 75% năm 1998 (Obata et al., 2001). Type huyết thanh O3:K6 chiếm 46.8% chủng *V. parahaemolyticus*

phân lập từ bệnh nhân ở Thái Lan giai đoạn từ năm 2006 đến năm 2010 (Thongjun et al., 2013) và 50% bệnh nhân ở miền Nam Đài Loan giai đoạn từ năm 2004 đến 2013 (Lin et al., 2015). Một số phương pháp được phát triển để nhận diện dấu hiệu gây dịch của *V. parahaemolyticus*. Nasu et al. (2000) nhận diện dấu hiệu gây dịch dựa vào gen *orf8*, một trong các khung đọc mở (ORFs) trong hệ gen của *V. parahaemolyticus*. Matsumoto et al. (2000) dựa vào gen *toxRS* và phát triển phương pháp GS (group specific)-PCR để phát hiện dấu hiệu gây dịch. Một số nghiên cứu cho thấy phương pháp dựa vào gen *toxRS* cho kết quả nhạy hơn so với phương pháp dựa vào gen *orf8* (Serichantalergs et al., 2007; Chowdhury et al., 2004).

Ở Việt Nam, bệnh đường ruột do nhiễm *V. parahaemolyticus* được báo cáo từ năm 1983 (Cục Y tế dự phòng - Bộ Y tế, 2016). Tại Nha Trang (Khánh Hòa), từ năm 1997 đến 1999 có 548 ca bị tiêu chảy dương tính với *V. parahaemolyticus* với sự phổ biến của chủng O3:K6 (Tuyết et al., 2002; Chowdhury et al., 2004). Ở ĐBSCL, vào năm 2010, *V. parahaemolyticus* được phân lập từ người bị tiêu chảy với tỷ lệ 8,3%, trong đó chủng mang gen độc lực chiếm 41,7% (Tai et al., 2004). Hiện nay, thông tin về sự hiện diện của *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực gây bệnh đường ruột, đặc biệt là chủng O3:K6 trong môi trường ở ĐBSCL vẫn còn hạn chế. Nghiên cứu này nhằm tìm hiểu sự hiện diện của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực *tdh* trên hải sản và môi trường nước ở ĐBSCL và kiểm tra type huyết thanh của chúng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu hải sản tại các cửa hàng bán lẻ, mẫu hải sản tại các trang trại nuôi và mẫu nước từ sông, vùng nuôi nghêu và ao nuôi tôm ở ĐBSCL.

2.2. Nội dung

Xác định sự hiện diện của *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực *tdh* gây bệnh đường ruột trên người, trên hải sản và môi trường nước ở ĐBSCL

Xác định type huyết thanh và dấu hiệu gây dịch của các chủng vi khuẩn mang gen độc lực được phân lập.

2.3. Địa điểm nghiên cứu

Xử lý mẫu và ủ mẫu được thực hiện tại phòng thí nghiệm nghiên cứu bệnh thủy sản, Khoa Nông nghiệp-Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh

Phân lập, định danh và kiểm tra đặc điểm của *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực được thực hiện tại Phòng thí nghiệm vi sinh vật, Bộ môn Khoa học động vật, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp và Công nghệ Tokyo, Nhật Bản.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Thu mẫu

Mẫu hải sản: Mẫu hải sản được thu tại các cửa hàng bán lẻ và ở trang trại nuôi. Tổng cộng có 259 mẫu hải sản bao gồm 204 mẫu hải sản bán lẻ (87 mẫu nghêu, 85 mẫu sò huyết và 32 mẫu tôm thẻ và tôm đất) được mua tại các cửa hàng bán lẻ ở Cần Thơ và Trà Vinh vào tháng 6 năm 2015 và tháng 2 năm 2016 và 16 mẫu nghêu tại vùng nuôi nghêu và 39 mẫu tôm (tôm sú và tôm thẻ chân trắng) từ ao nuôi thâm canh được thu tại Trà Vinh vào tháng 2 và tháng 8 năm 2016.

Mẫu nước: Tổng cộng có 94 mẫu nước bao gồm 30 mẫu được thu ở sông Hậu, ĐBSCL vào tháng 2 năm 2015, 22 mẫu được thu ở vùng nuôi nghêu và 42 mẫu được thu ở ao nuôi tôm thâm canh tại Trà Vinh vào tháng 2 và tháng 8 năm 2016.

2.4.2. Phân lập *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus từ mẫu hải sản và mẫu nước được phân lập dựa vào phương pháp được mô tả bởi Hara-Kudo et al. (2003) và Alam et al. (2009). Đối với mẫu hải sản, 25g thịt hải sản được trộn với 225 ml alkaline pepton water (APW, Nissui, Tokyo, Japan) tạo thành một hỗn hợp đồng nhất. Đối với mẫu nước, 90 ml mẫu nước được trộn với 10 ml APW (10 x APW). Mẫu được ủ ở 37°C trong 24 h. Dung dịch sau khi ủ được cấy lên môi trường TCBS (Nissui) và CHROMagar™ *Vibrio* (CV) (CHROMagar Microbiology, Paris, France). Khuẩn lạc có màu xanh trên TCBS và màu tím trên CV agar được phân lập và trữ trong môi trường nutrient broth (NB, Nissui, Japan) được bổ sung 20% glycerol và bảo quản ở -80°C.

2.4.3. Ly trích DNA

DNA được ly trích bằng cách đun sôi theo phương pháp được mô tả bởi Hara-Kudo et al. (2003).

2.4.4. Định danh *V. parahaemolyticus*

Gen đặc trưng cho loài (*toxR*) được xác định bằng phương pháp PCR như mô tả của Kim et al. (1999). Trình tự môi và chu trình nhiệt dùng để định danh *V. parahaemolyticus* được mô tả trong bảng 1. Sản phẩm PCR được điện di trong 1.5% agarose gel. Sau đó, agarose gel được nhuộm với ethidium bromide (0.5 mg/l) trong 20 phút và rửa lại với nước cất trong 20 phút. Tiếp theo, kết quả được đọc bằng máy đo UV (Bio-rad).

2.4.5. Kiểm tra gen độc lực

Gen độc lực *tdh* được kiểm tra bằng phương pháp PCR theo mô tả của Bilung et al. (2005). Trình tự môi và chu trình nhiệt dùng để xác định gen độc lực *tdh* được mô tả trong bảng 1. Sản phẩm PCR được điện di và đọc kết quả theo mô tả trong mục 2.4.4.

2.4.6. Xác định dấu hiệu gây dịch

Dấu hiệu gây dịch của chủng *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực được xác định dựa vào phương pháp GS-PCR theo mô tả

của Matsumoto et al. (2000). Trình tự mỗi và chu trình nhiệt xác định dấu hiệu gây dịch tiêu chảy được mô tả trong bảng 1. Sản phẩm PCR được điện di và đọc kết quả theo mô tả trong mục 2.4.4.

Bảng 1. Trình tự nucleotide và kích thước phân tử của các cặp mồi và chu trình nhiệt của PCR xác định gen *tdh*, *toxR* và *toxRS*

Gen cần khuếch đại	Đoạn mồi	Kích thước phân tử (bp)	Chu trình nhiệt		Tài liệu tham khảo
			Các giai đoạn	Chu kì	
<i>tdh</i>	5'-CCACTACCACTCTCATATGC-3' 5'-GGTACTAAATGGCTGACATC-3'	251	Tiền biến tính: 96°C trong 1 phút,	1	Bilung et al. (2005)
			Biến tính 94°C trong 1 phút, bắt cặp: 63°C trong 1.5 phút, kéo dài: 72°C trong 1.5 phút	20	
			Kết thúc: 72°C trong 5 phút	1	
<i>toxR</i>	5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3' 5'-ATACGAGTGGTTGCTGT-CATG-3'	368	Tiền biến tính: 96°C trong 5 phút	1	Kim et al. (1999)
			Biến tính: 94°C trong 1 phút, bắt cặp: 55°C trong 1 phút, kéo dài: 72°C trong 1 phút	35	
			Kết thúc: 72°C trong 7 phút	1	
<i>toxRS</i>	5'-TAATGAGGTAGAAACA-3' 5'-ACGTAACGGGCCTACA-3'	651	Tiền biến tính: 96°C trong 5 phút	1	Matsumoto et al. (2000)
			Biến tính: 94°C trong 1 phút, bắt cặp: 45°C trong 2 phút, kéo dài: 72°C trong 3 phút	25	
			Kết thúc: 72°C trong 7 phút	1	

2.4.7. Xác định type huyết thanh

Kháng nguyên O và K của *V. parahaemolyticus* mang gen *tdh* được xác định theo hướng dẫn trong bộ kit antisera test kit (Denka Seiken, Tokyo, Japan).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự hiện diện của *V. parahaemolyticus* mang

gen *tdh* trên mẫu hải sản và mẫu nước ở ĐBSCL

Mẫu hải sản: Bảng 2 cho thấy sự hiện diện của *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực *tdh* trên hải sản ở ĐBSCL. Chúng được phân lập trên hải sản bán lẻ ở ĐBSCL với tỷ lệ 8,0% ở nghêu và 3,5% ở sò huyết. Tuy nhiên, chúng không được phát hiện trên mẫu tôm thẻ, tôm đất.

Bảng 2. Sự hiện diện của *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực *tdh* trên hải sản ở ĐBSCL

Nguồn gốc	Mẫu	Số lượng mẫu	Mẫu dương tính với <i>V. parahaemolyticus</i> mang gen <i>tdh</i>
Cửa hàng bán lẻ	Nhuễn thể		
	Nghêu	87	7 (8,0)
	Sò huyết	85	3 (3,5)
	Tổng	172	10 (5,8)
	Tôm		
	Tôm thẻ	28	0 (0,0)
	Tôm đất	4	0 (0,0)
	Tổng	32	0 (0,0)
	Tổng cộng	204	10 (4,9)
Trại nuôi	Nhuễn thể		
	Nghêu	16	0 (0,0)
	Tôm		
	Tôm thẻ chân trắng	35	0 (0,0)
	Tôm sú	4	0 (0,0)
	Tổng	39	0 (0,0)
	Tổng cộng	55	0 (0,0)

Mẫu nước: Bảng 3 cho thấy *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực *tdh* không được tìm thấy trong

mẫu nước trên sông, ở vùng nuôi nghêu và ao nuôi tôm ở ĐBSCL.

Bảng 3. Sự hiện diện của *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực *tdh* (%) trong mẫu nước ở ĐBSCL

Mẫu nước	Số mẫu	Số mẫu dương tính với <i>V. parahaemolyticus</i> mang gen <i>tdh</i> (%)
Nước sông	30	0 (0,0)
Vùng nuôi nghêu	22	0 (0,0)
Ao tôm	42	0 (0,0)
Tổng	94	0 (0,0)

V. parahaemolyticus mang gen độc lực *tdh* cũng được phát hiện tương đối cao trên nhuyễn thể bán lẻ ở các nước Đông Nam Á khác như 12% ở Thái Lan (Changchai và Saunjit, 2014), 11,1% ở Indonesia và 9,1% ở Malaysia (Nakaguchi, 2013). Trong nghiên cứu này, *V. parahaemolyticus* mang gen *tdh* không được phát hiện ở vùng nuôi nhuyễn thể. Bilung et al. (2005) báo cáo một tỷ lệ thấp (2%) của vi khuẩn này được phát hiện trên sò huyết ở vùng nuôi ven biển ở Thái Lan. *V. parahaemolyticus* mang gen *tdh* hiện diện tương

đối cao trong hải sản bán lẻ so với mẫu ở vùng nuôi, có thể do hải sản trong các cửa hàng bán lẻ được bảo quản ở nhiệt độ thường, dẫn đến sự phát triển và sự nhiễm chéo của vi khuẩn gây bệnh.

Mặc dù vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh đường ruột được phát hiện trên nhuyễn thể ở ĐBSCL, chúng không được phát hiện trên mẫu tôm thẻ, tôm đất, tôm thẻ chân trắng và tôm sú. Malcolm et al. (2015) cũng báo cáo kết quả tương tự khi khảo sát mẫu tôm và nhuyễn thể ở

Malaysia. Có thể do nhuyễn thể là loài ăn lọc nên có khả năng tích lũy chủng vi khuẩn mang gen độc lực trong ruột. Vì vậy, tỷ lệ phân lập vi

khuẩn gây bệnh từ nhuyễn thể cao hơn so với các loài thủy sản khác như cá và tôm.

3.2. Type huyết thanh

Bảng 4. Type huyết thanh của chủng *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực *tdh* phân lập trên hải sản ở ĐBSCL

Mã số	Type huyết thanh	Gen <i>tdh</i>	Gen <i>toxR</i>	GS-PCR
VP1	O1:K _{UT} ^a	+	+	-
VP2	O1:K _{UT}	+	+	-
VP3	O1:K _{UT}	+	+	-
VP4	O3:K6	+	+	+
VP5	O3:K6	+	+	+
VP6	O3:K6	+	+	+
VP7	O3:K6	+	+	+
VP8	O3:K7	+	+	-
VP9	O3:K7	+	+	-
VP10	O3:K _{UT}	+	+	-

^a: Không xác định

Bảng 4 cho thấy *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực *tdh* phân lập từ ngẫu nhiên và sò huyết thuộc 2 nhóm kháng nguyên O bao gồm O1 và O3 và 3 nhóm kháng nguyên K bao gồm K6, K7 và K_{UT}, trong đó type huyết thanh O3:K6 được tìm thấy ở 4 chủng. Tất cả 4 chủng O3:K6 này đều dương tính với dấu hiệu gây dịch (gen *toxRS*). Trong các loại huyết thanh của *V. parahaemolyticus* phân lập từ bệnh nhân tiêu chảy, loại huyết thanh O3:K6 là quan trọng nhất vì nó phổ biến ở bệnh nhân tiêu chảy do *V. parahaemolyticus*. Trong nghiên cứu này, O3:K6 được phát hiện ở 4 chủng dương tính với gen độc lực *tdh*. Vì thế, chúng ta nên chú ý nhiều hơn đến sự nhiễm *V. parahaemolyticus* ở ĐBSCL.

IV. KẾT LUẬN

V. parahaemolyticus mang gen độc lực *tdh* liên quan đến bệnh đường ruột trên người được phân lập với tỷ lệ 5,8% trên nhuyễn thể bán lẻ ở ĐBSCL. Chủng *V. parahaemolyticus* O3:K6 mang dấu hiệu gây dịch cũng được phát hiện từ mẫu nhuyễn thể bán lẻ. Do đó, cần lưu ý bảo quản và chế biến hải sản phù hợp để tránh nhiễm *V. parahaemolyticus* gây bệnh đường ruột.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alam, M., Chowdhury, W. B., Bhuiyan, N. A., Islam, A., Hasan, N. A., Nair, G. B., Watanabe, H., Siddique, A. K., Huq, A., Sack, R. B., Akhter, M. Z., Grim, C. J., Kam, K. -M., Luey, C. K. Y., Endtz, H. P., Cravioto, A. and Colwell, R. R. 2009. Serogroup, virulence, and genetic traits of *Vibrio parahaemolyticus* in the estuarine ecosystem of Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6268-6274.
2. Bilung, L. M., Radu, S., Bahaman, A. R., Rahim, R. A., Napis, S., Ling, M. W. C. V., Tanil, G. B. and Nishibuchi, M. 2005. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in cockle (*Anadara granosa*) by PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 252, 85-88.
3. Changchai, N. and Saunjit, S. 2014. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in retail raw oysters from the eastern coast of Thailand. *Trop. Med. Public Health* 45, 662-669.
4. Chowdhury, A., Ishibashi, M., Thiem, V. D., Tuyet, D. T. N., Tung, T. V., Chien, B. T., Seidlein, L. V., Canh, D. G., Clemens, J., Trach, D. D. and Nishibuchi, M. 2004. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999. *Microbiol. Immunol.* 48, 319-327.

5. Cục Y tế dự phòng - Bộ Y tế, 2016. Bệnh viêm ruột do *Vibrio parahaemolyticus*.
6. Daniels, N. A., Ray, B., Easton, A., Marano, N., Kahn, E., McShan, A. L., Rosario, L. D., Baldwin, T., Kingsley, M. A., Puh, N. D., Wells, J. G. and Angulo, F. J. 2000. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters. A prevention quandary. *JAMA*. 284, 1541-1545.
7. Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Fukai, K., Mukai, T. and Ueho, T. 1953. On the bacteriological examination of shirasu-food poisoning. *Med. J. Osaka Univ.* 4, 299 -304.
8. Hara-Kudo, Y., Sugiyama, K., Nishibuchi, M., Chowdhury, A., Yatsuyanagi, J., Ohtomo, Y., Saito, A., Nagano, H., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Miyahara, M. and Kumagai, S. 2003. Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3883-3891.
9. Hsern Malcolm, T. T. H., Cheah, Y. K., Radzi, C. W. J. W. M., Kasim, F. A., Kantilal, H. K., John, T. Y. H., Martinez-Urtaza, J., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. and Son, R. 2015. Detection and quantification of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by using multiplex PCR and loop-mediated isothermal amplification assay. *Food Control*, 47, 664-671.
10. Iguchi, T., Kondo, S. and Hisatsune, K. 1995. *Vibrio parahaemolyticus* O serotypes from O1 to O13 all produce R-type lipopolysaccharide: SDS-PAGE and compositional sugar analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 130, 287-92.
11. Kaneko, T. and Colwell, R.R. 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J. Bacteriol.* 113, 24-32.
12. Kim, Y. B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S. and Nishibuchi, M. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1173-1177.
13. Lin, C-C, Lin, P-S., Kou, L-L., Hong, Y-P. and Wu, H-S. 2015. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* in Southern Taiwan, 2004–2013. *Epidemiol. Bull.* 31, 548-558.
14. Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H-C., DePaola, A., Kim, Y. B., Albert, M. J. and Nishibuchi, M. 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *J. Clin. Microbiol.* 38, 578-585.
15. Nakaguchi, Y. 2013. Contamination by *Vibrio parahaemolyticus* and its virulent strains in seafood marketed in Thailand, Vietnam, Malaysia, and Indonesia. *Trop. Med. Health* 41, 95-102.
16. Nasu, H., Iida, T., Sugahara, T., Yamaichi, Y., Park, K-S., Yokoyama, K., Makino, K., Shinagawa, H. and Honda, T. 2000. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Strains. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2156-2161.
17. Nelapati, S., Nelapati, K. and Chinnam, B. K. 2012. *Vibrio parahaemolyticus* - An emerging foodborne pathogen - A review. *Vet. World* 5, 48-62.
18. Obata, H., Kai, A. and Morozumi, S. 2001. The trends of *Vibrio parahaemolyticus* foodborne outbreaks in Tokyo: 1989-2000. *Kansenshogaku Zasshi* 75, 485-9.
19. Serichantalergs, O., Bhuiyan, N. A., Nair, G. B., Chivaratanond, O., Srijan, A., Bodhidatta, L., Anuras, S. and Mason, C. J. 2007. The dominance of pandemic serovars of *Vibrio parahaemolyticus* in expatriates and sporadic cases of diarrhoea in Thailand, and a new emergent serovar (O3 : K46) with pandemic traits. *J. Med. Microbiol.* 56, 608-613.
20. Tai, D. T., Thuy, A. V., Nhi, N. T. N., Ngoc, N. T. K. and Lan, N. T. P. (2011). Virulence and antimicrobial resistance characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environment, food and clinical samples in the South of Vietnam, 2010. *BMC Proc.* 5, P94.
21. Thongjun, J., Mittraparp-arhorn, P., Yingkajorn, M., Kongreung, J., Nishibuchi, M. and Vuddhakul, V. 2013. The trend of *Vibrio parahaemolyticus* infections in Southern Thailand from 2006 to 2010. *Trop. Med. Health* 41, 151-156.
22. Tuyet, D. T., Thiem, V. D., Seidlein, L.V., Chowdhury, A., Park, E., Canh, D. G., Chien, B. T., Tung, T. V., Naficy, A., Rao, M. R., Ali, M., Lee, H., Sy, T. H., Nishibuchi, M., Clemens, J. and Trach, D. D. 2002. Clinical, epidemiological, and socioeconomic analysis of an outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* in Khanh Hoa province, Vietnam. *J. Infect. Dis.* 186, 1615-20.

Ngày nhận 16-4-2019

Ngày phản biện 20-5-2019

Ngày đăng 1-7-2019