

KHẢO SÁT TỶ LỆ NHIỄM VÀ PHÂN TÍCH GEN SSU rRNA CỦA VI BÀO TỬ TRÙNG GÂY BỆNH TRÊN TÔM NUÔI NƯỚC LỢ

Vũ Khắc Hùng¹, Nguyễn Thị Thu Giang¹,
Trịnh Thị Thu Hằng¹, Nguyễn Xuân Trường¹, Nguyễn Văn Duyệt²

TÓM TẮT

Tổng số 238 mẫu tôm, trong đó có 52 mẫu tôm giống (post-larva) và 186 mẫu tôm thương phẩm đã được thu thập từ các ao nuôi tôm nghi mắc bệnh do vi bào tử trùng tại ba tỉnh Ninh Thuận, Kiên Giang và Bạc Liêu để sử dụng trong nghiên cứu này. Áp dụng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu EHP-510F/ EHP-510R để xác định tỷ lệ nhiễm vi bào tử trùng EHP từ số lượng mẫu nêu trên. Kết quả PCR cho thấy tỷ lệ tôm bị nhiễm bệnh ở 3 tỉnh Ninh Thuận, Kiên Giang và Bạc Liêu lần lượt là: 19,44%; 1,16% và 2,27%; trong đó tỷ lệ nhiễm bệnh của tôm thương phẩm là cao hơn so với tôm giống. Kết quả phân tích trình tự nucleotide SSU rRNA từ 23 mẫu tôm cho thấy tất cả vi bào tử trùng phân lập được đều thuộc loài *Enterocytozoon hepatopenaei*. Kết quả xây dựng cây phân loại cho thấy loài vi bào tử trùng này ở Việt Nam có quan hệ gần với loài vi bào tử *Nucleospora salmonis*, *Agmasoma penae* gây bệnh trên cá.

Từ khóa: vi bào tử trùng, bệnh trên tôm, tôm nước lợ, EHP

Infection rate and SSU rRNA gene analysis of microsporidium caused disease in brackishwater shrimp

Vu Khắc Hung, Nguyen Thi Thu Giang,
Trinh Thi Thu Hang, Nguyen Xuan Truong, Nguyen Van Duyệt

SUMMARY

A total of 238 shrimps (52 post-larvae and 186 commodity shrimps) were collected from the shrimp farms, suspecting infection with microsporidium in Ninh Thuan, Kien Giang and Bac Lieu provinces as materials for this study. Total DNA from these samples were extracted to identify the EHP infection rate by PCR method using specific primers EHP-510F/ EHP-510R. The PCR result showed that the EHP infection rate of shrimps in Ninh Thuan, Kien Giang and Bac Lieu provinces was 19.44%; 1.16%; 2.27%, respectively; of which, the infection rate of the commodity shrimps was higher than that of the post-larvae. The result of analyzing 23 SSU rRNA sequences from 23 shrimp samples indicated that the isolated microsporidium strains in Viet Nam belonged to *Enterocytozoon hepatopenaei* species, and this species related closely with *Nucleospora salmonis*, *Agmasoma penae*, which caused diseases in fish.

Keywords: microsporidian, shrimp disease, brackish water shrimp, EHP.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh do vi bào tử trùng là một bệnh rất phổ biến và nguy hiểm cho ngành nuôi tôm (Karthikeyan Kesavan và cs., 2016). Theo Perschbacher (1995); Tourtip và cs., (2009), ở Đông Nam Á, tỷ lệ tôm chết do nhiễm vi bào tử

trùng *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) gia tăng đáng kể trong những năm gần đây.

Hiệp hội chế biến và xuất khẩu thủy sản Việt Nam (VASEP) họp ngày 10/2/2015 tại Cần Thơ đã nêu ra tình trạng tôm nuôi bị chậm lớn diễn ra tại nhiều vùng nuôi tôm Việt Nam từ giữa năm 2014, gây thiệt hại đáng kể. Tại cuộc họp, tiến

¹. Phân viện Thú y miền Trung

². Đại học Nha Trang

sĩ Trần Hữu Lộc đã nhận định: tôm chậm lớn do nhiều nguyên nhân, trong đó cần kể đến là nhiễm vi bào tử trùng EHP.

Cho đến hiện nay, các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào việc phát hiện bệnh do vi bào tử trùng bằng phương pháp mô học và chưa có một nghiên cứu cụ thể nào xác định tỷ lệ cảm nhiễm vi bào tử trùng cũng như thành phần loài vi bào tử trùng trên tôm nuôi tại Việt Nam.

Trước tình hình trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu “Khảo sát tỷ lệ nhiễm và phân tích gen SSU rRNA của vi bào tử trùng gây bệnh trên tôm nuôi nước lợ”. Mục tiêu của nghiên cứu là nhằm xác định tỷ lệ nhiễm vi bào tử trùng của tôm nuôi tại ba tỉnh Ninh Thuận, Kiên Giang, Bạc Liêu; đồng thời xác định loài vi bào tử trùng gây bệnh trên tôm.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu mẫu tôm

238 mẫu tôm có dấu hiệu còi cọc được thu thập từ các ao nuôi nghi ngờ nhiễm bệnh ở các tỉnh Ninh Thuận, Kiên Giang và Bạc Liêu từ tháng 4 – 9/2016. Mẫu được cho vào hộp nhựa sạch, trữ lạnh và được chuyển trực tiếp về phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, Phân viện thú y miền Trung – Nha Trang. Mẫu được xử lý tách chiết DNA ngay hoặc cố định trong cồn ethanol 96%.

Đồng thời với việc lấy mẫu tôm, chúng tôi thu mẫu nước để đo hàm lượng muối trung bình tại từng ao nuôi. Nồng độ muối được đo bằng máy đo độ mặn ATAGO ES-421.

2.2. Phương pháp chiết tách DNA tổng số

DNA từ những mẫu gan tụy đã qua xử lý được tách chiết bằng bộ kit QIAGEN Dneasy Blood & Tissue Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

DNA tổng số sau khi tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp điện di trong đệm TAE dưới nguồn điện 130V, DNA sau khi tách chiết được bảo quản -20°C để sử dụng cho các phản ứng PCR sau đó.

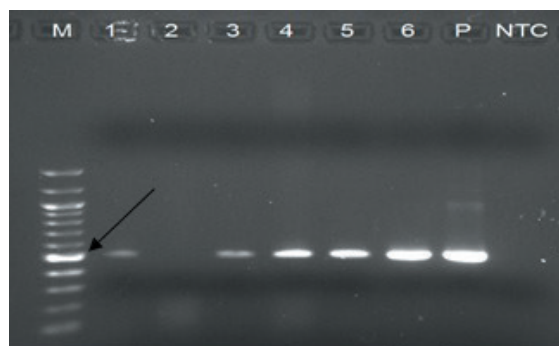
2.3. Phương pháp PCR xác định tỷ lệ nhiễm vi bào tử trùng

Cặp mồi được sử dụng cho phản ứng PCR là EHP-510F (5'-GCCTGAGAGATGGCTCCCACGT-3') EHP-510R (5'-GCGTACTATCCCCAGAGCCC-GA-3') theo mô tả của Tang và cs, 2015. Hỗn hợp phản ứng PCR bao gồm: 12,5μl GoTaq colorless master mix 2x (Promega); 9,5μl nước; 0,5μl mồi, 2μl DNA. Chu trình nhiệt được thực hiện trong 35 chu kỳ bao gồm: 94°C: 30 giây, 60°C: 30 giây, 72°C: 90 giây. Sản phẩm của phản ứng được điện di trên gel agarose 1,5%.

Sản phẩm PCR được tách chiết và tinh sạch từ gel bằng bộ kit sinh phẩm QIAquick Gel Extraction Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR được gửi đi giải trình tự tại công ty Macrogen Hàn Quốc. Trình tự DNA được xử lý kết quả bằng phần mềm Mega 6 và dữ liệu ở <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định tỷ lệ nhiễm vi bào tử trùng trên tôm



Hình 1. Kết quả điện di mẫu tôm bị nhiễm vi bào tử trùng EHP

M: Marker kích thước 100bp

P: Đối chứng dương

NTC (Non-template control): Đối chứng âm

1-6: Mẫu vi bào tử trùng được tách từ gan tụy tôm

Phản ứng PCR cho band có kích thước khoảng 500bp, là kích thước mong muốn của Tang và cs., (2015). Nhóm tác giả này đã phát triển kỹ thuật

PCR với cặp mồi đặc hiệu EHP-510F/ EHP-510R để phát hiện EHP trên tôm nuôi và đã khuếch đại được đoạn gen có kích thước 510bp. Cặp mồi trên được xây dựng đặc hiệu riêng cho loài *Enterocytozoon hepatopenaei*, chỉ nhân lên với DNA của loài này và phân biệt rõ ràng (không nhân lên) với DNA của loài có quan hệ gần nhất là *Enterocytozoon bieneusi*. Mặt khác, nhóm tác

giả cũng đã chứng minh rằng cặp mồi này cũng không nhân lên với các loài vi bào tử giống với *Pleistophora* có liên quan đến bệnh tôm bông gòn.

Kết quả điện di cho thấy 23/238 mẫu dương tính, trong đó có 21 mẫu được thu từ Ninh Thuận (chiếm 19,44%), 1 mẫu ở Kiên Giang (1,16%) và 1 mẫu ở Bạc Liêu (2,27%) (bảng 1).

Bảng 1. Tỷ lệ mẫu dương tính với phản ứng PCR theo địa phương

Tỉnh	Số mẫu	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Ninh Thuận	108	21	19,44
Kiên Giang	86	1	1,16
Bạc Liêu	44	1	2,27
Tổng mẫu	238	23	9,66

Nguyễn Thị Hà (2010) trước đây cho thấy tỷ lệ nhiễm vi bào tử trùng trên tôm là 78,78% - 85,45%; tỷ lệ này khá cao vì các mẫu để kiểm tra đều lấy từ tôm được xác định là đã nhiễm bệnh, có dấu hiệu bệnh lý rõ ràng. Trong nghiên cứu của Bùi Quang Tề (2010), kết quả phân tích mẫu gan tụy tôm nuôi thương phẩm trong các ao đang bị bệnh bằng phương pháp mô bệnh học cho tỷ lệ nhiễm vi bào tử (*Enterocytozoon* sp.) là 92,77%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi không cao, nguyên nhân do mẫu tôm được lấy ngẫu nhiên từ các ao hồ nuôi tôm bình thường. Tuy nhiên, cũng theo tác giả Bùi Quang Tề (2010), tỷ lệ cảm nhiễm trong các ao tôm khỏe (bình thường) là 22%. Một nghiên cứu khác của Prasertsri (2009) xác định được tỷ lệ nhiễm vi bào tử là 25 – 28% đối với tôm thả ao 60 ngày.

Khi xem xét tỷ lệ dương tính giữa các tỉnh, chúng tôi nhận thấy ở Ninh Thuận có tỷ lệ nhiễm

vi bào tử cao hơn so với hai tỉnh Bạc Liêu và Kiên Giang. Điều này có thể là do sự thay đổi nồng độ muối trong nước tại ao nuôi. Để khẳng định nhận định trên, chúng tôi đã tiến hành đo nồng độ muối trung bình tại ao nuôi của ba tỉnh. Tại thời điểm lấy mẫu, chúng tôi nhận thấy các ao nuôi ở Ninh Thuận có nồng độ muối trung bình là 2,28%, cao hơn so với các ao nuôi ở Kiên Giang (1,78%) và Bạc Liêu (1,82%). Năm 2015, khi nghiên cứu về các yếu tố môi trường làm phát sinh bệnh do vi bào tử, John Sackton đã khẳng định độ mặn thấp tạo thuận lợi gây ít tác động và tăng trưởng của tôm tốt hơn; độ mặn cao xuất hiện tương quan với tăng trưởng kém và tác động lớn hơn. Ngoài ra, vi bào tử trùng lây lan trong nước, và gần như không thể phá hủy, do đó trong quá trình nuôi, khi nhiều ao nuôi trong một khu vực bị nhiễm bệnh, các đường dẫn nước sẽ mang bào tử đưa tới các ao, các trại giống và tôm bố mẹ chưa bị nhiễm bệnh khác.

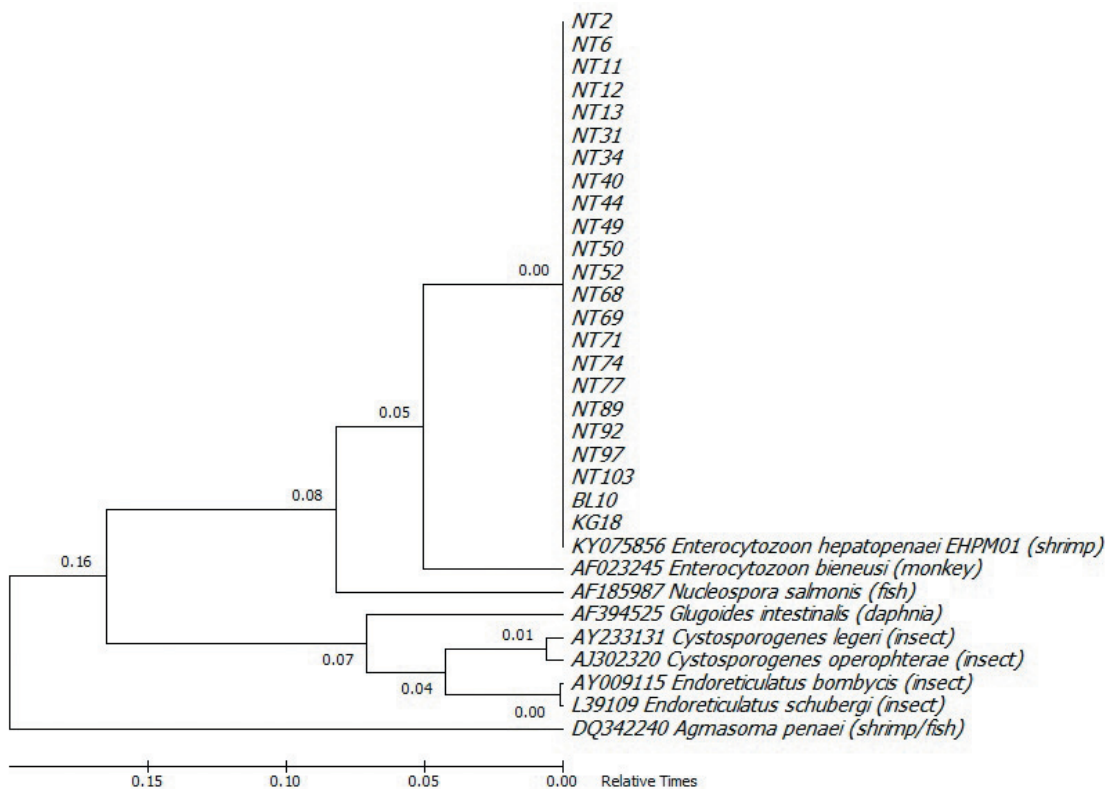
Bảng 2. Tỷ lệ mẫu dương tính với phản ứng PCR theo cỡ tôm

Loại tôm	Số mẫu	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ %
Tôm post	52	3	5,77
Tôm thương phẩm	186	20	10,75
Tổng mẫu	238	23	9,6

Theo kết quả tỷ lệ nhiễm bệnh theo giai đoạn phát triển tôm, chúng tôi nhận thấy tôm thương phẩm có tỷ lệ nhiễm vi bào tử trùng cao hơn so với tôm post (10,75% và 5,77%). Theo nghiên cứu của Bùi Quang Tề và cs., (2010), tỷ lệ nhiễm của tôm post thu được là 19,44%, thấp hơn so với tôm thương phẩm 92,77%. Ngoài ra, Chalor Limsuwan và cs., (2008) khi nghiên cứu tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) tại tỉnh Prachup Khiri Khan đã kết luận tôm đã bị nhiễm kí sinh trùng vi bào tử lúc 20 ngày tuổi sau khi thả giống vào ao.

Kết quả giải trình tự gen các mẫu dương tính với phản ứng PCR.

Sau khi được xác định dương tính với vi bào tử trùng bằng phản ứng PCR, chúng tôi gửi tất cả mẫu đi giải trình tự ở công ty Macrogen Inc., Hàn Quốc. Sản phẩm PCR của 23 chủng sau khi gửi đi giải trình tự được sử dụng chương trình BLAST N (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) để so sánh với trình tự 18S rRNA của vi bào tử trùng EHP có trong ngân hàng dữ liệu của NCBI (National Center for Biotechnology Information).



Hình 2. Cây phả hệ của 23 loài *Enterocytozoon hepatopenaei* phân lập được 500bp

Kết quả cho thấy 23 mẫu phân lập có trình tự 18S rRNA tương đồng 100% với trình tự 18S rRNA của *Enterocytozoon hepatopenaei*.

Khi so sánh độ tương đồng nucleotide của 23 chủng EHP với nhau, chúng tôi nhận thấy tất cả 23 chủng đều tương đồng 100%. Điều này chứng tỏ trình tự nucleotide SSU rRNA giữa các chủng

EHP có mức tương đồng cao.

Kết quả giải trình tự bằng cặp môi đặc hiệu cho thấy 23 mẫu từ tôm nghi bị bệnh vi bào tử trùng thuộc loài *Enterocytozoon hepatopenaei*. Kết quả xây dựng cây phân loài, các chủng *Enterocytozoon* này có quan hệ gần với các chủng gây bệnh trên cá như *Nucleospora salmonis*,

Agmasoma penaei; các chủng gây bệnh trên côn trùng như *Cytosporogenes legeri*, *Cytosporogenes operophtherae*, *Endoreticulatus bombyds*, *Endoreticulatus schubergi*. Theo nghiên cứu của Tourtip và cs., (2009), nhóm tác giả nhận thấy trình tự SSU rRNA của EHP giống 84% so với trình tự SSU rRNA của *Enterocytozoon bieneusi* và có quan hệ gần với *Nucleospora salmonis*. Kết quả này hoàn toàn tương đồng với kết quả mà chúng tôi thu được.

IV. KẾT LUẬN

Tỷ lệ nhiễm vi bào tử trùng EHP ở các tỉnh Ninh Thuận, Kiên Giang, Bạc Liêu lần lượt là 19,44%; 1,16%; 2,27%, trong đó tôm thương phẩm có tỷ lệ nhiễm (10,75%) cao hơn so với tôm post (5,77%). 100% mẫu tôm dương tính là tôm thẻ.

Kết quả giải trình tự cho thấy vi bào tử trùng gây bệnh trên tôm ở ba tỉnh Ninh Thuận, Kiên Giang, Bạc Liêu thuộc loài *Enterocytozoon hepatopenaei* và tỷ lệ tương đồng giữa các chủng là 100%. Kết quả phân tích cây phân loài các chủng *Enterocytozoon* phân lập được có quan hệ gần gũi với các chủng gây bệnh trên cá như *Nucleospora salmonis*, *Agmasoma penaei*, và các chủng gây bệnh trên côn trùng như *Cytosporogenes legeri*, *Cytosporogenes operophtherae*, *Endoreticulatus bombyds*, *Endoreticulatus schubergi*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Quang Tề, Lê Ngọc Quân, Nguyễn Thị Biên Thủy, Bùi Quang Tâm, Hoàng Thị Yên, Nguyễn Thị Niên, Nguyễn Văn Thành, Phan Thị Hường. (2010). Kết quả nghiên cứu bệnh gan tụy trên tôm sú (*Penaeus monodon*) nuôi ở Việt Nam và biện pháp phòng ngừa. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y, 18(2): 64-73.
2. Chalor Limsuwan, Niti Chuchird and Kesinee Laisutisan. (2008). Efficacy of Calcium Hypochlorite on the Prevalence of Microsporidiosis (*Thelohania*) in Pond-Reared *Litopenaeus vannamei*. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 42: 282 – 288.
3. John Sackton. (2015). EHP Disease in Shrimp May be Hard to Control, Likely Will Increase Volatility in Market. Seafood.com (an online, subscription-based, fisheries news service).
4. Kathy F.J. Tang, Carlos R. Pantoja, Rita M. Redman, Jee Eun Han, Loc H. Tran, Donald V. Lightner. (2015). Development of in situ hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp. Journal of Invertebrate Pathology. 130. 37–41.
5. Karthikeyan Kesavan, Ravi Mani, Itami Toshiaki & Raja Sudhakaran. (2016). Short communication quick report on prevalence of shrimp microsporidian parasite *Enterocytozoon hepatopenaei* in India. Aquaculture research. 1–5.
6. Nguyễn Thị Hà, Đồng Thanh Hà, Nguyễn Thanh Thủy, Vũ Thị Kim Liên. (2010). Phát hiện vi bào tử *Enterocytozoon hepatopenaei* ký sinh trên tôm sú (*Penaeus monodon*) bị bệnh phân trắng nuôi tại Việt Nam. Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn. Kỳ 2.
7. Perschbacher P.W. 1995. Recirculation-Aeration: Bibliography for Aquaculture. DIANE Publishing, Beltsville, MD, USA.
8. Satit Prasertsri, Chalor Limsuwan and Niti Chuchird. (2009). The Effects of Microsporidian (*Thelohania*) Infection on the Growth and Histopathological Changes in Pond-reared Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Kasetsart J. (Nat. Sci.) 43: 680 – 688.
9. Somjintana Tourtip, Somjai Wongtripop, Grant D. Stentiford, Kelly S. Bateman, Siriporn Sriurairatana, Jittipan Chavadej, Kallaya Sritunyalucksana, Boonsirm Withyachumnarnkul. (2009). *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. Journal of Invertebrate Pathology. 102 (2009). 21–29.
10. Trung tâm VASEP.PRO (Hiệp hội VASEP). 2015. Phương pháp phát hiện và chiến lược phòng bệnh hoại tử gan tụy và bệnh vi bào tử trùng trên tôm nuôi.

Ngày nhận 20-9-2017

Ngày phản biện 15-10-2017

Ngày đăng 1-1-2018