

PHÂN LẬP VÀ KIỂM TRA MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CỦA *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* LIÊN QUAN ĐẾN BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TRÊN TÔM Ở TRÀ VINH

Trần Thị Hồng To¹, Du Minh Hiệp¹,
Nguyễn Thị Trúc Linh¹, Trần Thị Phương Lan¹, Hideki Hayashidani²

TÓM TẮT

Vibrio parahaemolyticus mang gen *pir^{vp}* được xem là tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm. Trong nghiên cứu này, mẫu tôm, mẫu nghêu và mẫu nước ở vùng nuôi tôm, nghêu ở Trà Vinh được kiểm tra sự hiện diện của *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực *pir^{vp}* liên quan đến bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm. 30 mẫu tôm và 20 mẫu nước từ ao nuôi tôm thâm canh, 16 mẫu nghêu và 15 mẫu nước từ vùng nuôi nghêu ở Trà Vinh được thu thập để phục vụ cho nghiên cứu này. Một số đặc điểm của *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực *pir^{vp}* như týp huyết thanh và sự kháng kháng sinh cũng được tìm hiểu.

Kết quả nghiên cứu cho thấy *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực *pir^{vp}* được phát hiện từ 3/30 (10%) mẫu tôm và 1/20 (5%) mẫu nước từ ao nuôi tôm. Tuy nhiên, chủng vi khuẩn mang gen độc lực này không được tìm thấy trong mẫu nghêu và mẫu nước vùng nuôi nghêu. Các chủng *V. parahaemolyticus* mang gen *pir^{vp}* được tìm thấy trong nghiên cứu này được xác định týp huyết thanh dựa vào bộ kit antisera test kit và tính kháng kháng sinh dựa vào phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng mang gen *pir^{vp}* được phân lập thuộc nhóm kháng nguyên O1 với sự đa dạng của kháng nguyên K và chúng có tính kháng cao với ampicillin (100%), sulfisoxazole (100%) và streptomycin (75%). Nghiên cứu này cung cấp thêm thông tin giúp hiểu rõ hơn về một số đặc điểm của chủng *V. parahaemolyticus* liên quan đến bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm ở Đồng bằng Sông Cửu Long.

Từ khóa: Bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND), kháng kháng sinh, Gen *pir^{vp}*, týp huyết thanh, *Vibrio parahaemolyticus*

Isolation and examining several characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* related to acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in Tra Vinh province

Tran Thi Hong To, Du Minh Hiep,
Nguyen Thi Truc Linh, Tran Thi Phuong Lan, Hideki Hayashidani

SUMMARY

Vibrio parahaemolyticus carrying *pir^{vp}* gene was considered as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. In this study, shrimp, clam and water samples from shrimp ponds and clam farms were examined for the prevalence of *V. parahaemolyticus* related to AHPND in shrimp. 30 shrimp samples and 20 water samples from intensive shrimp ponds and 16 white hard clam and 15 water samples from clam farms were used as materials in this study. Serotypes and antimicrobial resistance of virulent bacteria were also examined.

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

². Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp và công nghệ Tokyo

The studied results indicated that the *pir^{vp}* gene positive *V. parahaemolyticus* strains were detected with 3/30 (10.0%) from shrimp samples and 1/20 (5.0%) from shrimp pond water samples. However, this pathogenic bacterium was not found from the clam and clam farm water samples. All *pir^{vp}* gene positive *V. parahaemolyticus* strains isolated in this study belonged to O1 antigen with several K antigens. They showed high resistance to ampicillin (100%), sulfisoxazole (100%) and streptomycin (75%). This study provides some information on *V. parahaemolyticus* related to AHPND in shrimp in the Mekong Delta.

Keywords: AHPND, antimicrobial resistance, *pir^{vp}* gene, serotypes, *Vibrio parahaemolyticus*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm hay còn gọi là hội chứng tôm chết sớm được báo cáo đầu tiên ở Trung Quốc vào năm 2009 và sau đó xuất hiện ở một số nước Đông Nam Á (NACA, 2012), Mexico (Gomez-Gil et al., 2014), Nam Mỹ (Restrepo et al., 2016) và Mỹ (Dhar et al., 2019). Bệnh hoại tử gan tụy cấp đã gây thiệt hại đáng kể cho nghề nuôi tôm trên thế giới, được ước tính là 1 tỷ USD hằng năm (FAO, 2013). Ở Việt Nam, bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm được báo cáo từ năm 2010. Bệnh xuất hiện chủ yếu ở các tỉnh ven biển của đồng bằng sông Cửu Long như Bến Tre, Trà Vinh, Sóc Trăng, Bạc Liêu và Cà Mau, và gây thiệt hại khoảng 39.000 ha nuôi tôm vào năm 2011 (FAO, 2013) và 50% lượng tôm giống thả nuôi ở ĐBSCL vào năm 2012 (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012). Năm 2015, bệnh hoại tử gan tụy cấp xuất hiện ở 23 tỉnh/thành của Việt Nam. Bệnh gây thiệt hại cho ngành nuôi tôm Việt Nam ước tính gần 54 triệu USD hằng năm (Hien et al., 2016).

Bệnh hoại tử gan tụy cấp có thể gây chết tôm đến 100% trong tháng nuôi đầu tiên. Tôm bệnh có dấu hiệu lâm sàng như gan tụy nhợt nhạt, bị teo và hoại tử, bao tử và ruột không có thức ăn. Nghiên cứu mô bệnh học gan tụy của tôm bệnh cho thấy có sự thoái hóa chức năng của các tế bào biểu mô B, F và R, sự bong tróc và rơi vào lòng ống của các tế bào ống gan và sự tập trung tế bào máu xung quanh ống gan tụy (FAO, 2013). Ở giai đoạn bệnh mới xuất hiện, tác nhân gây bệnh vẫn chưa được xác định. Đến năm 2013, Lộc et al. (2013) xác định *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) là tác

nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm. Các nghiên cứu khác cho thấy gen độc lực *pir^{vp}* (Photorhabdus insect-related (*pir*) toxin-like genes) trên plasmid của *V. parahaemolyticus* có liên quan đến bệnh này (Lee et al., 2015). Theo FAO (2013), bệnh lây nhiễm chủ yếu trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*), tôm sú (*Penaeus monodon*) và tôm he (*P. chinensis*). FAO (2016) cho rằng một trong những mối nguy quan trọng của sự lây truyền bệnh hoại tử gan tụy trên tôm có thể từ một số loài nhuyễn thể. Để hiểu rõ hơn về sự hiện diện của *V. parahaemolyticus* mang gen *pir^{vp}* trong môi trường ở ĐBSCL và một số đặc điểm của chúng, nghiên cứu này phân lập *V. parahaemolyticus* gen độc lực *pir^{vp}* trong môi trường nước ở Trà Vinh và kiểm tra type huyết thanh và sự kháng kháng sinh của các chủng *V. parahaemolyticus* mang gen *pir^{vp}*.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu tôm và mẫu nước từ các ao nuôi tôm thâm canh và mẫu nghêu và mẫu nước vùng nuôi nghêu ven biển tỉnh Trà Vinh.

2.2. Nội dung

Xác định sự hiện diện của *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực liên quan đến bệnh hoại tử gan tụy cấp trong mẫu tôm, nghêu và mẫu nước ở ĐBSCL.

Xác định type huyết thanh và sự kháng kháng sinh của *V. parahaemolyticus* liên quan đến bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm.

2.3. Địa điểm nghiên cứu

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

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

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Thu mẫu

Mẫu tôm và mẫu nước ao nuôi tôm thâm canh: 30 mẫu tôm và 20 mẫu nước được thu ngẫu nhiên từ ao nuôi tôm sú và tôm thẻ chân trắng thâm canh ở tỉnh Trà Vinh năm 2016. Đối với mẫu tôm, mỗi ao thu một mẫu với 5 con tôm trên mỗi mẫu. Đối với mẫu nước, mỗi ao thu một mẫu với 90 ml nước trên mỗi mẫu. Mẫu được bảo quản trong túi nhựa thanh trùng, đặt trong thùng xốp có đá lạnh và được phân tích ngay sau khi được vận chuyển đến phòng thí nghiệm.

Mẫu nghêu và mẫu nước vùng nuôi nghêu: 16 mẫu nghêu và 15 mẫu nước được thu từ bãi nuôi nghêu xã Hiệp Thạnh và xã Trường Long Hòa, huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh vào năm 2016. Mỗi mẫu nghêu có 10 con và mỗi mẫu nước chứa 90 ml nước. Mẫu được bảo quản trong túi nhựa thanh trùng, đặt trong thùng xốp có đá lạnh và được phân tích ngay sau khi được vận chuyển đến phòng thí nghiệm.

2.4.2. Phân lập *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus từ mẫu tôm, mẫu nghêu và mẫu nước được phân lập dựa vào phương pháp được mô tả của Hara-Kudo et al. (2003) và Alam et al. (2009). Đối với mẫu tôm và nghêu, mẫu được cho vào túi nhựa chứa 225 ml alkaline pepton water (APW, Nissui, Tokyo, Japan). 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 thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose

(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 trử trong môi trường nutrient broth (NB, Nissui) có 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.

2.4.5. Kiểm tra gen độc lực

Gen độc lực *pir^{vp}* được kiểm tra bằng phương pháp PCR theo mô tả của Tinwongger et al. (2014). Trình tự môi và chu trình nhiệt dùng để xác định gen độc lực *pir^{vp}* được mô tả trong bảng 1.

2.4.6. Xác định type huyết thanh

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

2.4.7. Xác định sự kháng kháng sinh của *V. parahaemolyticus* mang gen *pir^{vp}*

Sự kháng kháng sinh của các chủng *V. parahaemolyticus* được xác định dựa theo phương pháp được mô tả của Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) (2012). Chín loại kháng sinh được kiểm tra bao gồm ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), ofloxacin (10 µg), oxytetracycline (30 µg), streptomycin (10 µg) và sulfisoxazole (250 µg). *V. parahaemolyticus* được nuôi cấy trên môi trường TSA (Trypticase soy agar, Becton Dickinson Company) có bổ sung 1% NaCl và ủ ở 37°C trong 24 h. Sau

đó, vi khuẩn được pha loãng trong nước muối sinh lý với mật độ là $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (độ đục được so sánh với ống chuẩn 0,5 McFarland). Tiếp theo, 0,1 ml dung dịch vi khuẩn được tán đều trên đĩa MHA (Muller Hinton agar, Becton Dickinson Company) có bổ sung 1% NaCl. Kế

tiếp, đĩa kháng sinh được đặt lên đĩa MHA với số lượng không quá 5 đĩa kháng sinh/đĩa thạch. Đĩa được ủ ở 37°C trong 24 h. Vòng vô trùng được đo và so sánh với tiêu chuẩn được mô tả trong CLSI (2012) để xác định sự kháng kháng sinh của vi khuẩn.

Bảng 1. Trình tự nucleotide và kích thước phân tử của các cặp mồi và chu trình nhiệt của PCR xác định gen *pir^{vp}* và *toxR*

Gen cần khuếch đại	Đoạn mồi	Kích thước phân tử (bp)	Chu trình nhiệt		Tài liệu tham khảo
			Các giai đoạn	Chu kỳ	
<i>pirA_{vp}</i> (TUM-SAT-Vp3)	5'-GTGTTGCATAATTTTGTGCA-3' 5'-TTGTACAGAAACCACGACTA-3'	360	Tiền biến tính: 95°C trong 2 phút,	1	Tinwongger et al. (2014)
			Biến tính 95°C trong 30 giây, bắt cặp: 56°C trong 30 giây, kéo dài: 72°C trong 30 giây	30	
			Kết thúc: 72°C trong 5 phút	1	
<i>toxR</i>	5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3' 5'-ATACGAGTGGTTGCTGTCATG-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	

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự hiện diện của *V. parahaemolyticus* mang gen *pir^{vp}* trong mẫu tôm, nghêu và mẫu nước ở Trà Vinh

Bảng 2 cho thấy sự hiện diện của *V. parahaemolyticus* trong mẫu tôm, nghêu và mẫu nước ở Trà Vinh. Kết quả cho thấy *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực *pir^{vp}* được phát hiện từ 3/30 (10%) mẫu tôm và 1/20 (5%) mẫu nước từ ao nuôi tôm. Tuy nhiên, chủng vi khuẩn này không được tìm thấy trên mẫu nghêu và mẫu nước vùng nuôi nghêu. Một số loài nhuyễn thể có thể là vật chủ mang mầm

bệnh do chúng là loài ăn lọc và có khả năng tích lũy một số loài vi khuẩn gây bệnh. Nghêu được nuôi với diện tích lớn ở ven biển Duyên hải Trà Vinh và vùng nuôi nghêu tiếp giáp với vùng nuôi tôm thâm canh ở khu vực này. Do đó, nghiên cứu này muốn tìm hiểu sự hiện diện của *V. parahaemolyticus* liên quan đến bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm ở vùng nuôi nghêu để xác định mối nguy lây lan bệnh này. Mặc dù *V. parahaemolyticus* liên quan đến bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm không được tìm thấy trên nghêu trong nghiên cứu này, các khảo sát trên các động vật thủy sản khác nên được thực hiện.

Bảng 2. Sự hiện diện của *V. parahaemolyticus* mang gen *pir^{vp}* trong mẫu tôm, nghêu và mẫu nước ở Trà Vinh

Loại mẫu	Số mẫu	Số mẫu dương tính với <i>V. parahaemolyticus</i> mang gen <i>pir^{vp}</i> (%)
Ao nuôi tôm thâm canh		
Mẫu tôm	30	3 (10) ^a
Mẫu nước	20	1 (5) ^b
Vùng nuôi nghêu		
Mẫu nghêu	16	0 (0)
Mẫu nước	15	0 (0)

^a: *V. parahaemolyticus* mang gen *pir^{vp}* phân lập từ mẫu tôm thẻ

^b: *V. parahaemolyticus* mang gen *pir^{vp}* phân lập từ mẫu nước ao nuôi tôm sú

3.2. Type huyết thanh của các chủng *V. parahaemolyticus* mang gen *pir^{vp}*

Bảng 3 cho thấy *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực *pir^{vp}* phân lập từ ao nuôi tôm thuộc nhóm kháng nguyên O1 với sự đa dạng của kháng nguyên K bao gồm K68 và K_{UT}. Tương tự với nghiên cứu này, Kongrueng et al. (2015) báo cáo *V. parahaemolyticus* liên

quan đến bệnh hoại tử gan tụy cấp phân lập trên tôm nuôi ở Thái Lan cũng thuộc nhóm kháng nguyên O1 với sự đa dạng của kháng nguyên K như K33, K68 và K_{UT}. Một sự tiến hóa của *V. parahaemolyticus* liên quan đến bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm có thể xảy ra trong tự nhiên và dẫn đến sự đa dạng của type huyết thanh của *V. parahaemolyticus* mang gen độc lực.

Bảng 3. Type huyết thanh của *V. parahaemolyticus* mang gen *pir^{vp}*

Chủng vi khuẩn	Type huyết thanh	Gen <i>pir^{vp}</i>	Gen <i>toxR</i>	Nguồn gốc
1	O1:K _{UT} ^a	+	+	Mẫu nước từ ao nuôi tôm sú thâm canh
2	O1:K68	+	+	Mẫu tôm từ ao nuôi tôm thẻ chân trắng thâm canh
3	O1:K _{UT}	+	+	Mẫu tôm từ ao nuôi tôm thẻ chân trắng thâm canh
4	O1:K _{UT}	+	+	Mẫu tôm từ ao nuôi tôm thẻ chân trắng thâm canh

^a: UT: Untypeable (Không xác định)

3.3. Sự kháng kháng sinh của *V. parahaemolyticus* mang gen *pir^{vp}*

V. parahaemolyticus mang gen *pir^{vp}* có tính kháng cao với ampicillin (100%), sulfisoxazole (100%) và streptomycin (75%) (bảng 4). Tỷ lệ kháng cao với ampicillin và các kháng sinh khác cũng được báo cáo ở chủng *V. parahaemolyticus*

liên quan đến bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm ở các quốc gia khác. Kongrueng et al. (2015) báo cáo 100% *V. parahaemolyticus* liên quan đến bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm ở Thái Lan kháng với ampicillin và erythromycin. Han et al. (2015) báo cáo 100% *V. parahaemolyticus* liên quan đến bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm ở Mexico kháng với ampicillin và oxytetracycline.

Bảng 4. Sự kháng kháng sinh của *V. parahaemolyticus* mang gen *pir^{vp}* (n = 4) phân lập ở Trà Vinh

Kháng sinh	Số chủng kháng (%)
Ampicillin	4 (100)
Sulfisoxazole	4 (100)
Streptomycin	3 (75)
Oxytetracycline	1 (25)
Nalidixic acid	1 (25)
Chloramphenicol	0 (0)
Gentamicin	0 (0)
Kanamycin	0 (0)
Ofloxacin	0 (0)

Bảng 5 cho thấy *V. parahaemolyticus* mang gen *pir^{vp}* có tính đa kháng. Chúng kháng ít nhất với 2 loại kháng sinh và cao nhất với 5 loại kháng sinh. Sự đa kháng kháng sinh cũng được báo cáo trên các chủng *V. parahaemolyticus* liên quan đến hoại tử gan tụy trên tôm ở Thái Lan và Mexico

(Kongrueng et al., 2015; Han et al., 2015). Ampicillin, sulfisoxazole và streptomycin được sử dụng trong nông nghiệp và thủy sản trong vài thập kỷ qua (Done et al., 2015). Vì thế, sự kháng của vi khuẩn với các kháng sinh này có thể xuất hiện qua áp lực chọn lọc.

Bảng 5. Kiểu kháng kháng sinh của *V. parahaemolyticus* mang gen *pir^{vp}*

Kiểu kháng kháng sinh	Số chủng vi khuẩn
AMP-SFX ^a	1
AMP-STM-SFX	2
AMP-NA- OTT-SFX-STM	1

^a: AMP: Ampicillin, NA: Nalidixic acid, OTT: Oxytetracycline, SFX: Sulfisoxazole, STM: Streptomycin

IV. KẾT LUẬN

V. parahaemolyticus mang gen độc lực *pir^{vp}* được phân lập trên mẫu tôm với tỷ lệ 10% và mẫu nước từ ao nuôi tôm với tỷ lệ 5%. Các chủng vi khuẩn phân lập thuộc nhóm kháng nguyên O1. Chúng có tính kháng cao với ampicillin, sulfisoxazole và streptomycin.

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. CLSI. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-fourth informational supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
3. Dhar, A. K., Piamsomboon, P., Aranguren Caro, L. F., Kanrar, S., Adami, R. Jr., and Juan, Y. S. 2019. First report of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) occurring in the USA. Dis Aquat Organ. 132, 241-247.
4. Done, H. Y., Venkatesan, A. K. and Halden, R. U. 2015. Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats; Different from

- those associated with land animal production in agriculture? AAPS J. 17: 513–524.
5. Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương. 2012. Các bệnh nguy hiểm trên tôm nuôi ở Đồng Bằng Sông Cửu Long. Tạp chí khoa học, Trường Đại học Cần Thơ. 22c. 106-188.
 6. FAO. 2013. Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304). Hanoi, Viet Nam, 25–27 June 2013. FAO fisheries and aquaculture report No 1053 FIRA/R1053. Rome. 54p.
 7. FAO. 2016. FAO second international technical seminar/workshop on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): there is a way forward. FAO Technical Cooperation Programme: TCP/INT/3501 and TCP/INT/3502, 23–25 June 2016, Bangkok, Thailand.
 8. Gomez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., Lozano, R. and Betancourt Lozano, M. 2014. Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain m0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. Genome Announc. 2, e00055-14.
 9. Han, J. E., Mohney, L. L., Tang, K. F. J., Pantoja, C. R. P. and Lightner, D. V. 2015. Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. Aquacult. Rep. 2, 17-21.
 10. 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.
 11. Hien, N. T., Huong, N. T. L., Chuong, V. D., Nga, N. T. V., Quang, P. H., Hang, B. T. V. and Long, N. V. 2016. Status of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and other emerging diseases of penaeid shrimps in Viet Nam, Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, Tigbauan, Iloilo, Philippines.
 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. Kongrueng, J., Yingkajorn, M., Bunpa, S., Sermwittayawong, N., Singkhamanan, K. and Vuddhakul, V. 2015. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in southern Thailand. J. Fish Dis. 38, 957-966.
 14. Lee, C-T., Chen, I-T., Yang, Y-T., Kod, T-P., Huang, Y-T., Huang, J-Y., Huang, M-F., Lin, S-J., Chen, C-Y., Lin, S-S., Lightner, D. V., Wang, H-C., Wang, A. H-J., Wang, H-C., Hor, L-I. and Lo, C-F. 2015. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 10798-10803.
 15. Loc, T., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K. and Lightner, D. V. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hep creatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 105, 45-55.
 16. NACA. 2012. Report of the Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: Early mortality syndrome (EMS)/ acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS), 9-10 Aug 2012. The Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand..
 17. Restrepo, L., Bayot, B., Betancourt, I. and Pinzon, A. 2016. Draft genome sequence of pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* strain Ba94C2, associated with acute hepatopancreatic necrosis disease isolate from south America. Genom. Data 9, 143-144.
 18. Tinwongger, S., Proespraiwong, P., Thawonsuan, J., Sriwanayos, P., Kongkumnerd, J., Chaweepeak, T., Mavichak, R., Unajak, S., Nozaki, R., Kondo, H. and Hirono, I. 2014. Development of PCR diagnosis method for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. Fish Pathol., 49, 159–164.

Ngày nhận 2-8-2019

Ngày phản biện 20-8-2019

Ngày đăng 1-11-2019