

DOI:10.22144/ctu.jvn.2023.143

KHẢO SÁT SỰ HIỆN DIỆN CỦA VI BÀO TỬ TRÙNG *Enterocytozoon heparopenaei* (EHP) TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*) NUÔI Ở TỈNH KIÊN GIANG

Nguyễn Thị Thu Hằng^{1*}, Nguyễn Thanh Tuyền², Trương Quỳnh Như² và Nguyễn Trọng Ngử²

¹Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Nông Nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Thu Hằng (email: ntthang@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 15/11/2022

Ngày nhận bài sửa: 16/12/2022

Ngày duyệt đăng: 15/01/2023

Title:

Determine the presence of *Enterocytozoon heparopenaei* (EHP) on cultured whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Kien Giang

Từ khóa:

EHP, *Enterocytozoon heparopenaei*, tôm thẻ chân trắng

Keywords:

EHP, *Enterocytozoon heparopenaei*, Pacific whiteleg shrimp

ABSTRACT

The study was conducted to investigate the frequency of *Enterocytozoon heparopenaei* (EHP) presence in white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured in Kien Giang province. The results showed that shrimps infected EHP after 4 weeks of culture. The infected shrimp had not shown external pathological signs, except for a significant decrease in sizes. Hepatopancreas samples of infected shrimp often contained very small spores which were pear-shaped or ovoid. Many EHP spores can be observed intracellularly & extracellularly in the lumen of the hepatopancreas tubes. PCR protocol for the detection of EHP amplified a specific product of 510 bp. The EHP 18s rRNA sequence isolated in this study matched the sequence published on the gene bank with 99.8% similarity. Shrimp can be persistently infected with EHP over months of culture. The prevalence of EHP was 18%-65%. After 12 weeks of culture, healthy shrimps were significantly larger in length and weight (13.6cm; 20.2g) than EHP-infected shrimps (11.3cm; 11.0g).

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát tần suất hiện diện của *Enterocytozoon heparopenaei* (EHP) trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) nuôi ở tỉnh Kiên Giang. Kết quả cho thấy tôm nhiễm EHP trong giai đoạn từ tuần nuôi thứ 4. Các mẫu tôm bệnh đều không có dấu hiệu bệnh lý bất thường, chỉ giảm kích cỡ về chiều dài, khối lượng. Gan tụy của tôm bệnh thường chứa các bào tử dạng hình quả lê hoặc hình trứng, có kích thước rất nhỏ, thường nằm thành từng cụm trong tế bào gan tụy hoặc ở dạng tự do riêng rẽ bên ngoài tế bào. Quy trình PCR cho kết quả với vạch sản phẩm đặc hiệu của EHP là 510bp. Trình tự gen 18s rRNA của EHP được phân lập trong nghiên cứu này tương đồng với trình tự KY643648.1 được đăng trên ngân hàng gen với mức độ tương đồng là 99,8%. EHP nhiễm trên tôm qua các tháng nuôi. Tỷ lệ nhiễm dao động từ 18 đến 65%. Sau 12 tuần nuôi, tôm không nhiễm EHP có chiều dài và khối lượng (13,6cm, 20,2g) lớn hơn có ý nghĩa so với tôm nhiễm EHP (11,3cm, 11,0g).

1. GIỚI THIỆU

Thủy sản được xác định là ngành kinh tế mũi nhọn của Việt Nam. Năm 2021, theo Tổng cục Thống kê Việt Nam, tổng sản lượng thủy sản ước tính đạt 8.726,6 nghìn tấn, trong đó sản lượng thủy sản nuôi trồng đạt 4.805,8 nghìn tấn. Đồng bằng sông Cửu Long với hơn 700.000 ha mặt nước nuôi thủy sản đã trở thành vùng trọng điểm nuôi trồng thủy sản cả nước, hàng năm cung cấp một lượng sản phẩm thủy sản đáng kể cho nước nhà. Trong đó, Kiên Giang là một trong những tỉnh có trữ lượng đa dạng các nguồn thủy sản với giá trị kinh tế cao. Theo Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tỉnh Kiên Giang, năm 2021, việc nuôi tôm nước lợ trên địa bàn tỉnh đạt được nhiều kết quả quan trọng. Cụ thể, diện tích thả nuôi tôm nước lợ đạt 137.415 ha, sản lượng đạt 104.694 tấn. Trong năm 2022, địa phương phát triển nuôi tôm nước lợ với tổng diện tích 140.630 ha, sản lượng 108.500 tấn. Trong đó, diện tích nuôi tôm công nghiệp - bán công nghiệp là 4.200 ha, sản lượng là 39.250 tấn (BT, 2022).

Có thể thấy, nghề nuôi tôm nước lợ đã phát triển nhanh chóng và trở thành ngành kinh tế mũi nhọn với mức độ thâm canh ngày càng cao. Trong đó, ngoài tôm sú thì tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) cũng là một trong những đối tượng thủy sản có giá trị kinh tế cao đang được gia tăng thâm canh hóa. Trước nhu cầu nuôi tôm thương phẩm tăng cao, bên cạnh những thuận lợi khi nuôi tôm theo mô hình sẵn có vẫn còn những khó khăn như thiếu con giống chất lượng tốt, thời tiết bất thường, giá bán không ổn định, dịch bệnh gia tăng, thường xuyên xuất hiện và khó kiểm soát. Các bệnh nguy hiểm trên tôm thường là bệnh do vi rút và vi khuẩn. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, nghề nuôi tôm xuất hiện mỗi đe dọa mới xuất phát từ mầm bệnh ký sinh trùng.

Theo đó, bệnh vi bào tử trùng gan tụy (Hepatopancreatic microsporidiosis - HPM) lần đầu tiên được phát hiện nhiễm trên tôm sú *Penaeus monodon* ở Thái Lan năm 2003 (Chayaburakul et al., 2004). Sau đó, bệnh được mô tả chi tiết và được đặt tên bởi Tourtip et al. (2009). Tác nhân gây bệnh là loài vi bào tử trùng *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), là nhóm vi bào tử trùng có kích thước rất nhỏ (Tourtip et al., 2009). Vi bào tử trùng EHP đã được phân lập trên tôm sú và trên tôm thẻ chân trắng nuôi ở các nước Đông Nam Á. Năm 2010, EHP được ghi nhận xuất hiện trên tôm sú nuôi bị hội chứng phân trắng (WFS) ở Việt Nam. Đây là bệnh mới xuất hiện, gây ảnh hưởng lớn trên tôm thẻ chân trắng nuôi ở Việt Nam (Hà và ctv., 2011; Caro et al., 2021).

Tôm nhiễm bệnh thường không có các dấu hiệu bệnh lý đặc trưng. Biểu hiện chung nhất là tình trạng chậm phát triển, tăng trưởng không đồng đều. Tôm bị còi cọc, suy giảm sức khỏe, giảm tiêu thụ thức ăn từ 50 đến 70%. Tôm bị nhiễm bệnh nặng có thể có biểu hiện phân trắng và mất màu ở gan tụy. Từ đó, tôm chết hoặc bị ảnh hưởng đáng kể đến năng suất thu hoạch (Rajendran et al., 2016; Alavandi et al., 2017; Singh & Singh, 2018). Theo Phước (2020), tỷ lệ nhiễm EHP trên tôm giống là 7,0%; trên tôm nuôi tại các tỉnh Sóc Trăng, Bạc Liêu và Cà Mau là khá cao, 34,1-48,4%. Hiện nay, tình hình nhiễm vi bào tử trùng EHP trên tôm nước lợ ở một số vùng nuôi của tỉnh Kiên Giang đang có chiều hướng gia tăng. Bệnh do vi bào tử trùng EHP không gây chết hàng loạt như các bệnh do vi rút và vi khuẩn, tuy nhiên có ảnh hưởng rất lớn về kinh tế đối với nghề nuôi tôm vì mức độ phân cỡ và tiêu tốn nhiều thức ăn. Trước những thực tế nêu trên, nghiên cứu này được thực hiện là cần thiết, nhằm đánh giá được tình hình, diễn biến của dịch bệnh, song song đó để hiểu rõ hơn về tác nhân gây bệnh này. Từ đó những biện pháp đối phó với dịch bệnh an toàn và hiệu quả được đưa ra trong nghiên cứu.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và địa điểm nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Mẫu tôm thẻ chân trắng (30-120 ngày nuôi) nghi nhiễm vi bào tử trùng EHP, đó là các mẫu tôm có dấu hiệu: tăng trưởng chậm bất thường, phân cỡ rõ rệt, giảm hệ số chuyển đổi thức ăn (FCR).

Thời gian và địa điểm thu mẫu: Thời gian là từ tháng 06/2022 đến tháng 9/2022. Mẫu tôm nuôi theo hình thức công nghiệp (thâm canh) được thu tại 10 ao nuôi tôm thuộc huyện Kiên Lương, tỉnh Kiên Giang.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu mẫu

Mẫu tôm thẻ chân trắng được thu tại các ao nuôi tôm thâm canh. Số ao được thu mẫu cố định là 10 ao. Mỗi ao thu 10 mẫu tôm. Mẫu được thu vào buổi sáng sớm, lúc cho tôm ăn; thu mẫu ở sàn ăn và 4 góc ao; thu 4 đợt ở tuần nuôi thứ 4, tuần nuôi thứ 6, tuần nuôi thứ 8 và tuần nuôi thứ 12. Mẫu được vận chuyển sống về phòng thí nghiệm và phân tích mẫu trong ngày.

Mẫu tôm để soi tươi và nhuộm Giemsa được phân tích tại phòng thí nghiệm Bệnh học Thủy sản - Khoa Thủy sản - Trường Đại học Cần Thơ.

Mẫu tôm phân tích PCR (Polymerase Chain Reaction): Gan tụy và ruột tôm thu từ ao nuôi có dấu hiệu chậm lớn (5-7 mẫu) được cô định trong dung dịch RNAlater và bảo quản ở -20°C để phân tích tình trạng nhiễm bệnh bằng phương pháp PCR tại phòng thí nghiệm Bộ môn Chăn Nuôi Thú Y, Khoa Nông Nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2.2. Phương pháp soi tươi

Phần giáp đầu ngực tôm được tách, lấy khối gan tụy và tách ruột để thu phần dịch ruột, sau đó đặt lên lam kính vô trùng. Kim mũi giáo được dùng để tán nhỏ khối gan tụy hoặc dịch ruột, dàn mỏng trên lam kính, nhỏ 1 giọt nước muối sinh lý 0,85%, đậy lamen lên rồi quan sát dưới kính hiển vi; quan sát với vật kính 100x (Tourtip et al., 2009).

Độc kết quả: Mẫu tôm dương tính nếu quan sát dưới kính hiển vi có sự xuất hiện của các vi bào tử có hình giọt nước, tập trung thành từng cụm/đám.

2.2.3. Phương pháp phết kính nhuộm Giemsa

Phương pháp phết (smear) mô gan tụy và ruột nhuộm Giemsa được dùng để phát hiện sự có mặt của vi bào tử trong gan tụy/ruột tôm. Tách phần giáp đầu ngực và lấy khối gan tụy bên trong rồi đặt lên lam kính vô trùng. Dùng kim mũi giáo tán nhỏ khối gan tụy, dàn mỏng khối gan tụy trên lam kính. Để khô mẫu ở nhiệt độ phòng hoặc hơi nhẹ phết kính trên ngọn lửa đèn cồn. Tiêu bản mẫu được cô định trong ethanol tuyệt đối với thời gian 10 phút, sau đó rửa lame mẫu bằng nước cất; nhỏ dung dịch Giemsa ngập tiêu bản, để từ 20 đến 30 phút; rửa nhanh bằng nước cất và sấy khô; nhỏ một giọt dầu soi kính lên tiêu bản và quan sát dưới kính hiển vi với vật kính 100X (Tourtip et al., 2009).

2.2.4. Quy trình PCR phát hiện EHP

Phương pháp chiết tách ADN

Một phần gan tụy và ruột của 10 con tôm/ao được nghiền chung trong dung dịch đệm NTE (0,2 M NaCl, 0,02 M Tris-HCl và 0,02 M EDTA, pH 7.4) theo tỉ lệ 1:10 (v:v). Hỗn hợp được ly tâm ở 3000 xg trong 15 phút ở 4°C, phần dung dịch nổi phía trên được thu và cho vào ống eppendorf mới. Sau đó, 600 µl dung dịch lysis buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, pH 8.0, 0,5% sodium dodecyl sulphate và 0,1 mg/mL proteinase K) được thêm vào phần dịch nổi thu được. Mẫu được ủ ở 65°C trong 2 giờ. Sau khi ủ, các mẫu tiếp tục được chiết tách theo quy trình phenol/chloroform/isoamyl alcohol. ADN được thu hồi bằng cách kết tủa ethanol và làm khô ở nhiệt độ phòng. ADN được hoà tan trong dung dịch đệm TE

(10mM Tris pH8, 1mM EDTA) và trữ ở -20°C cho phản ứng PCR (Tang et al., 2015).

Hàm lượng DNA chiết tách được xác định bằng máy nanodrop one (Thermo scientific) và chất lượng DNA chiết tách được đánh giá qua tỉ lệ 260/280 nm.

Phương pháp PCR phát hiện vi bào tử trùng trên tôm thẻ chân trắng

Quy trình PCR phát hiện vi bào tử trùng - EHP được thực hiện theo quy trình của Tang et al. (2015), đồng thời được điều chỉnh như sau: i) Thành phần hoá chất tham gia phản ứng bao gồm: 2X master mix (Phusa biochemical, Cantho, Vietnam); 0,2 pMol mỗi EHP-F; 0,2 pMol mỗi EHP-R1; 1 µl DNA chiết tách và nước cất vô trùng; ii) Điều kiện phản ứng: 95°C trong 5 phút, tiếp theo 35 chu kỳ gồm: 95°C trong 30 giây, 60°C trong 1 phút, 72°C trong 30 giây và cuối cùng 72°C trong 5 phút. Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu ở vị trí 510 bp; iii) Trình tự mỗi tham gia phản ứng bao gồm: EHP-F: 5'-GCC TGA GAG ATG GCT CCC ACG T- 3', EHP-R1: 5'-GCG TAC TAT CCC CAG AGC CCG A- 3'. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên agarose gel 1,5% bằng máy (Biorad, USA), nhuộm bằng safe dye và quan sát hình ảnh điện di dưới ánh sáng tử ngoại bằng hệ thống Gel Documentation (Carestream health, INC)

2.2.5. Giải và phân tích trình tự

Sản phẩm PCR sau khi kiểm tra được tinh sạch bằng bộ KIT Isolate II PCR and Gel (BioLine) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và sử dụng làm khuôn trực tiếp cho phản ứng tiền giải trình tự gen theo nguyên tắc dye-labelled dideoxy terminator. Mẫu tôm nhiễm ký sinh trùng được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử với cặp mồi EHP-F và EHP-R1. Mức độ tương đồng của đoạn gen 18s rRNA của EHP trong nghiên cứu này được so sánh với trình tự của các đoạn 18s ribosomal RNA của EHP được đăng ký trên ngân hàng gen bằng phần mềm BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) trên GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Mức độ nhiễm ký sinh trùng được xác định theo phương pháp của Margolis et al. (1982).

Tỷ lệ nhiễm (%) = (tổng số mẫu nhiễm ký sinh trùng/tổng số mẫu kiểm tra) x 100

Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood Tree, sử dụng phần mềm MEGA 11. Tất cả các chuỗi tham chiếu được lấy từ cơ sở dữ liệu GenBank.

Các số liệu được trình bày và xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thông tin chung về mẫu tôm thẻ chân trắng

Tổng cộng có 400 mẫu tôm thẻ chân trắng giai đoạn nuôi thương phẩm được thu tại huyện Kiên Lương, tỉnh Kiên Giang. Các ao nuôi tôm đã được kiểm tra sạch bệnh, không nhiễm EHP trong tôm giống trước khi thả nuôi. Kết quả thu mẫu cho thấy tôm nuôi thâm canh phát hiện bệnh trong giai đoạn từ 30 ngày tuổi (tuần nuôi thứ 4), những ao nuôi này thả tôm ở mật độ từ 75 đến 80 con/m². Ở tuần nuôi thứ 4, tôm có chiều dài từ 4,0 đến 6,8 cm, khối lượng tôm dao động từ 0,5 đến 2,7 g. Kết quả kiểm tra các mẫu tôm sau đó 8 tuần (tuần nuôi thứ 12) cho thấy, tôm gia tăng cả về chiều dài và khối lượng. Chiều dài tôm lúc này dao động khoảng 10,7-14,8 cm và khối lượng trong khoảng 7,0-24,8 g.

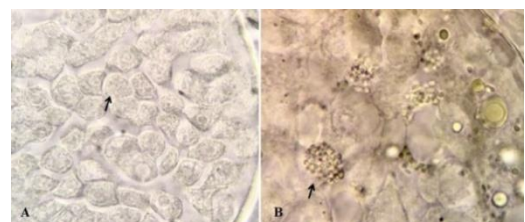
Các mẫu tôm đều không có dấu hiệu bệnh lý bên ngoài bất thường, màu sắc tôm tươi sáng, không bị đóng rong hay loét vỏ, ngoại trừ kích cỡ của tôm có sự suy giảm đáng kể so với các mẫu tôm không nhiễm bệnh. Một số mẫu tôm ở một số ao nuôi nhiễm nặng vẫn có một vài dấu hiệu bệnh lý đặc trưng như: tôm giảm ăn, màu sắc tôm bệnh nhợt nhạt, vỏ sần sùi, nhám, ruột tôm ngắt quãng hoặc trống rỗng. Các dấu hiệu bệnh lý ghi nhận được khá tương đồng với các ghi nhận của nhiều nghiên cứu trước đây. Theo đó, dấu hiệu bệnh lý tổng quát thường được mô tả là: tôm nhiễm bệnh thường không có các dấu hiệu bệnh lý đặc trưng. Biểu hiện chung nhất là tình trạng chậm phát triển, tăng trưởng không đồng đều. Tôm bị còi cọc, suy giảm sức khỏe. Tôm bị nhiễm bệnh nặng có thể có biểu hiện phân trắng và mất màu ở gan tụy (Rajendran et al., 2016; Singh & Singh, 2018; Kim et al., 2021; Kumar et al., 2022a). Mặt khác, nghiên cứu của Suryakodi et al. (2022) lại có những báo cáo rằng, EHP nhiễm trong tôm nuôi các hệ thống nuôi tôm thẻ chân trắng nước ngọt không gây ra bất cứ biểu hiện bệnh lý khác thường nào, mặc dù các kết quả PCR đều thể hiện dương tính với EHP. Cùng nhận định đó, báo cáo của Ma et al. (2019) và Yang et al. (2021) cũng cho rằng, trong giai đoạn đầu của nhiễm EHP, tôm thường không chết và ăn bình thường, màu sắc cơ thể không có dấu hiệu lâm sàng rõ ràng của bệnh. Tuy nhiên, chúng sẽ tăng trưởng chậm trong giai đoạn nhiễm bệnh về sau vụ nuôi, dẫn đến thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho ngành nuôi tôm.

Bảng 1. Thông tin mẫu tôm thẻ chân trắng

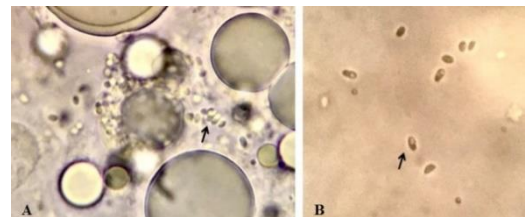
Chỉ tiêu	Tuần 4	Tuần 6	Tuần 8	Tuần 12
Chiều dài (cm)	5,5±0,8	7,4±0,6	9,6±0,7	12,5±1,5
Khối lượng (g)	1,6±0,6	3,4±0,8	7,3±1,4	15,9±5,7
Số mẫu	100	100	100	100

3.2. Sự hiện diện của vi bào tử EHP trên tôm thẻ chân trắng nuôi thương phẩm

Kết quả quan sát 400 tiêu bản tươi các mẫu tôm cho thấy những mẫu tôm nhiễm EHP thường xuất hiện các bào tử có cấu tạo bên ngoài dạng hình quả lê hoặc hình trứng, hơi thon nhỏ ở 1 đầu. Các bào tử này có kích thước rất nhỏ, chỉ quan sát được ở vật kính 100x. Trong hầu hết các mẫu bệnh phẩm đều quan sát thấy các bào tử thường nằm thành từng cụm trong tế bào gan tụy của tôm, ngoài ra, bào tử EHP cũng được tìm thấy ở dạng tự do riêng rẽ bên ngoài tế bào. Bên trong bào tử có thể quan sát thấy không bào ở một đầu của bào tử. Tuy nhiên, sợi cực thì rất khó quan sát ở những bào tử nằm từng cụm/đám cùng một thị trường kính hiển vi. Các mẫu gan tụy của tôm nhiễm EHP nhuộm Giemsa và quan sát ở vật kính 100x có thể nhận thấy các bào tử EHP có hình bầu dục bắt màu xanh tím của thuốc nhuộm và hiện diện trong tế bào biểu mô ở gan tụy hoặc tồn tại ở dạng tự do. Các ghi nhận trong nghiên cứu tương đồng với những ghi nhận của Tourtip et al. (2009).

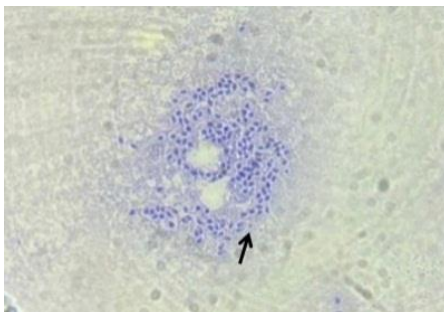


Hình 1. Bào tử EHP quan sát dưới kính hiển vi quang học (100x), (A): bào tử bên trong các ống gan tụy, (B) bào tử tồn tại bên trong tế bào (mũi tên)



Hình 2. Bào tử EHP tồn tại tự do bên ngoài tế bào quan sát dưới kính hiển vi quang học (150x) (mũi tên)

Ngoài ra, khi phân tích các mẫu bệnh phẩm từ gan tụy và ruột giữa của tôm thì chỉ quan sát thấy bào tử EHP tồn tại trong các mẫu bệnh phẩm từ gan tụy của tôm. Ghi nhận này tương đồng với những kết luận của Flegel (2015), tác giả cho rằng loài vi bào tử trùng EHP chỉ lây nhiễm trên các tế bào biểu mô ống của mô gan tụy trên tôm. Nghiên cứu của Kim et al. (2021) cũng ghi nhận tương tự, báo cáo cho rằng, các mẫu tôm nhiễm EHP ở Hàn Quốc hầu như đều chỉ tìm thấy bào tử tồn tại trong mô gan tụy, không xuất hiện ở các mô khác của tôm. Tuy nhiên, nghiên cứu của Oanh et al. (2021) và Prachumwat et al. (2021) đã tìm thấy bào tử EHP tồn tại không chỉ trong tế bào gan tụy mà còn tồn tại trong biểu mô của ruột giữa. Theo báo cáo của Li et al. (2021) cho rằng, gan tụy là mô ưu tiên dễ bị nhiễm EHP, không những vậy, các bào tử EHP cũng được phát hiện trong ruột và dạ dày của tôm.



Hình 3. Bào tử EHP nhuộm Giemsa (100x) (mũi tên)

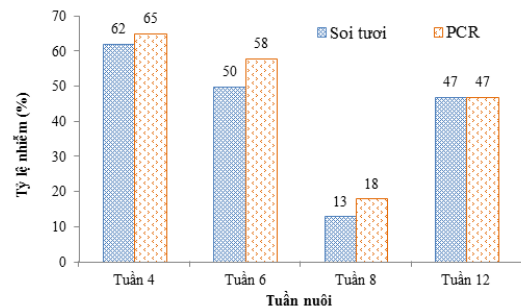
3.3. Tỷ lệ nhiễm của bào tử EHP trên tôm thẻ chân trắng nuôi thương phẩm

Trước khi ứng dụng quy trình PCR, vi bào tử trùng trên tôm thẻ chân trắng được thu ở ao nuôi thâm canh, mẫu gan tụy và ruột của tôm thẻ chân trắng được soi tươi dưới kính hiển vi (độ phóng đại 100x), các tiêu bản mẫu có những bào tử hình ovan hoặc elip và có không bào ở một đầu của bào tử được ghi nhận là mẫu nhiễm EHP. Bên cạnh đó, các mẫu tôm này cũng được sử dụng để tách chiết ADN và thực hiện quy trình PCR phát hiện EHP. Kết quả điện di sản phẩm PCR ghi nhận các mẫu tôm hiện vạch 510 bp đặc hiệu cho vi bào tử trùng EHP (Hình 5), kết quả này tương tự kết quả sản phẩm PCR của Tang et al. (2015). Sau đó, sản phẩm PCR dương tính với EHP được đem đi giải trình tự cho các phân tích tiếp theo.

Kết quả tổng hợp cho thấy tỷ lệ nhiễm EHP trên tôm thẻ chân trắng được phát hiện bằng hai phương pháp soi tươi và PCR có sự khác nhau. Ở kết quả soi tươi, tỷ lệ nhiễm EHP dao động trong khoảng từ 13-62%. Trong khi đó, quy trình PCR phát hiện EHP

hiện trên tôm thẻ chân trắng trong khoảng từ 18 đến 65% qua 4 đợt thu mẫu.

Trước khi thả nuôi, tôm thẻ chân trắng giống được chọn và được tầm soát không nhiễm các bệnh thường gặp như còi (MBV), đốm trắng (WSSV), hoại tử gan tụy cấp (EMS) và bệnh vi bào tử trùng (*Enterocytozoon hepatopenaei* – EHP). Vào thời điểm 30 ngày sau khi thả nuôi, tôm bắt đầu được thu ngẫu nhiên tại các ao nuôi thâm canh ở huyện Kiên Lương, tỉnh Kiên Giang. Kết quả soi tươi và PCR, tầm soát tần suất xuất hiện bệnh do EHP cho thấy hầu hết tất cả các ao (9/10 ao) đều cho kết quả dương tính với EHP sau 4 tuần thả nuôi tôm. Tỷ lệ nhiễm EHP ở thời điểm này được ghi nhận ở mức lần lượt là 62% và 65%. Sự khác biệt này là do có một số mẫu tôm khi soi tươi thì không quan sát thấy bào tử EHP trong gan tụy, nhưng kết quả PCR thì hiện vạch 510 bp đặc hiệu cho vi bào tử trùng EHP.



Hình 4. Tỷ lệ nhiễm (%) bào tử EHP trên tôm thẻ chân trắng

Tần suất xuất hiện bệnh do vi bào tử trùng EHP kéo dài trong các ao nuôi tôm đến tuần thứ 6 sau khi thả nuôi (8/10 ao dương tính với EHP). Tỷ lệ nhiễm EHP ở thời điểm này được ghi nhận lên đến 58% thông qua phương pháp PCR. Tuy nhiên, đến thời điểm tuần thứ 8 sau khi thả nuôi thì tỷ lệ nhiễm EHP lại có chiều hướng giảm đáng kể (2/10 ao dương tính với EHP). Tỷ lệ nhiễm EHP lúc này được ghi nhận thông qua phương pháp soi tươi và PCR lần lượt là 13% và 18%. Do đó, tôm thẻ được tiếp tục nuôi trong ao với quá trình chăm sóc bình thường. Đến thời điểm 3 tháng sau khi thả nuôi, tức tuần thứ 12 sau khi thả nuôi, các mẫu tôm lại được ghi nhận nhiễm EHP trở lại với tỷ lệ nhiễm khá cao, 6/10 ao nuôi bị nhiễm. Tỷ lệ nhiễm EHP lúc này được ghi nhận thông qua phương pháp soi tươi và PCR tương tự nhau, trung bình 47%.

Sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ nhiễm EHP giữa hai phương pháp có thể là do quá trình quan sát mẫu soi tươi dưới kính hiển vi quang học gặp nhiều hạn chế do kích thước bào tử EHP rất nhỏ, bào tử nằm

lẫn trong các mẫu mô gan tụy đến kích thước phóng đại của vật kính chỉ ở mức 100x. Quá trình chẩn đoán nhiễm EHP bằng phương pháp PCR hiệu quả hơn do tính đặc hiệu và độ chính xác của các phương pháp sinh học phân tử. Vì thế, hầu hết các nghiên cứu hiện đại ngày nay đã áp dụng nhiều kiểu phản ứng PCR khác nhau để chẩn đoán tình trạng nhiễm EHP trên tôm với các kết quả tương tự những ghi nhận của nghiên cứu này (Tang et al., 2015; Salachan et al., 2017; Hou et al., 2021).

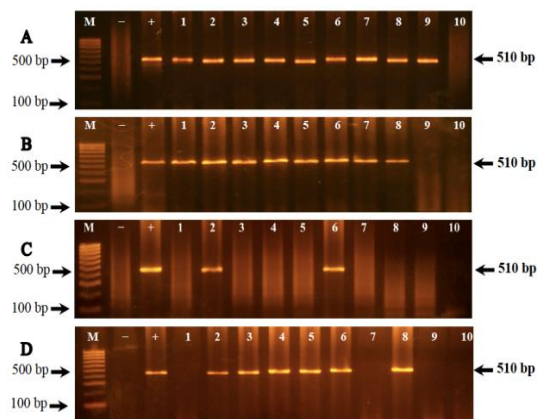
Bảng 2. Tần suất xuất hiện vi bào tử trùng EHP trong ao nuôi tôm thẻ thâm canh

Ao nuôi	Tuần 4	Tuần 6	Tuần 8	Tuần 12
Ao 1	+	+		
Ao 2	+	+	+	+
Ao 3	+	+		+
Ao 4	+	+		+
Ao 5	+	+	+	+
Ao 6	+	+		+
Ao 7	+	+		
Ao 8	+	+		+
Ao 9	+			
Ao 10				

Kết quả tỷ lệ nhiễm EHP kéo dài qua các tháng nuôi (tuần 4 đến tuần 12) cho thấy vi bào tử trùng EHP có thể sống và tồn tại trong các ao nuôi trong thời gian rất dài, khác với mầm bệnh do vi rút và vi khuẩn. Bên cạnh đó, có tồn tại sự lây nhiễm chéo giữa các ao trong suốt chu kỳ nuôi và sự lây nhiễm từ các ký chủ trung gian như sinh vật thủy sinh hoang dã vào trong ao nuôi tôm.

Theo báo cáo của Mây và ctv. (2020), có 3 loài giáp xác được xác định mang bào tử EHP, bao gồm 1 loài giun nhiều tơ, 2 loài nhuyễn thể (hàu và ốc đĩnh). Trong đó, ốc đĩnh và giun nhiều tơ là loài bắt gặp phổ biến trong các ao nuôi tôm thương phẩm tại Việt Nam, còn hàu và giun nhiều tơ được sử dụng làm nguồn thức ăn tự nhiên cho nuôi vỗ tôm bố mẹ, trong đó giun nhiều tơ được sử dụng phổ biến hơn. Bên cạnh đó, trong hệ sinh thái thủy vực, giun nhiều tơ là một mắt xích trong chuỗi thức ăn, đặc biệt là trong sản xuất tôm (Mark, 2019). Mặt khác, EHP cũng được tìm thấy trong môi trường nước ao nuôi, trong phân tôm và trong bùn đáy ao nuôi. Các nghiên cứu khác cũng cho rằng, động vật bị nhiễm bệnh EHP có thể giải phóng vi bào tử ra môi trường thông qua sự phân hủy của con chết hoặc các tế bào gan, biểu mô ruột bong ra được chuyển xuống hệ tiêu hóa và ra ngoài theo phân. EHP đã được ghi nhận có thể tồn tại trong môi trường nước hoặc bùn đáy từ sáu tháng đến một năm, tùy thuộc vào điều kiện môi trường ao nuôi (Giridharan & Uma, 2017;

Mây và ctv., 2020). Mặc dù, bệnh do ký sinh trùng EHP không gây tỷ lệ chết cao trong các ao nuôi tôm nhưng cũng là nguyên nhân làm ảnh hưởng đến sức khỏe tôm, gây chậm lớn, phân cỡ, ảnh hưởng đến năng suất thu hoạch và tạo điều kiện cho những mầm bệnh cơ hội khác xâm nhập. Báo cáo gần đây của Patil et al. (2021) nhận định rằng, thiệt hại về kinh tế do nhiễm *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), hội chứng đốm trắng (WSSV) và các bệnh khác đối với nghề nuôi tôm thẻ chân trắng ở Ấn Độ là rất đáng kể trong giai đoạn 2018-2019. Sản lượng thiệt hại cao nhất trong các bệnh nhiễm trùng là do WSSV (2,58 tấn/ha/vụ), tiếp theo là do EHP (1,80 tấn/ha/vụ), Mặc dù EHP với xác suất xuất hiện thấp hơn WSSV (17%) nhưng chúng có thể gây ra tổn thất lên đến 0,77 triệu tấn với tổn thất doanh thu tương ứng là 567,62 triệu đô la Mỹ.



Hình 5. Kết quả PCR phát hiện vi bào tử trùng EHP trong ao nuôi tôm thâm canh

Ghi chú: 4 tuần (A), 6 tuần (B), 8 tuần (C) và 12 tuần thả nuôi (D). Các giếng lần lượt bao gồm Giếng M: thang ADN 100 bp, giếng -: đối chứng âm, giếng +: Đối chứng dương, giếng 1: ao 1, Giếng 2: ao 2, Giếng 3: ao 3, Giếng 4: ao 4, Giếng 5: ao 5, Giếng 6: ao 6, Giếng 7: ao 7, Giếng 8: ao 8, Giếng 9: ao 9, Giếng 10: ao 10.

So sánh với những nghiên cứu gần đây ghi nhận về sự hiện diện của EHP trên tôm thẻ chân trắng, có thể thấy tỷ lệ nhiễm mà nghiên cứu này ghi nhận được ở Kiên Giang có nhiều khác biệt. Nghiên cứu của Phước (2020) ghi nhận tỷ lệ nhiễm EHP trên tôm giống là khá thấp, khoảng 7,0%. Báo cáo gần đây của Oanh et al. (2021) cũng ghi nhận tỷ lệ nhiễm EHP khá thấp ở tôm thẻ thu tại Sóc Trăng, Bạc Liêu và Cà Mau, dao động khoảng 7,9% các mẫu phân tích. Nghiên cứu của Kim et al. (2021) lần đầu tiên báo cáo về các trường hợp tôm thẻ chân trắng nuôi ở Hàn Quốc nhiễm bào tử trùng EHP cũng ghi nhận tỷ lệ nhiễm thấp. Tỷ lệ nhiễm dao động từ 3,3 đến 56%, trung bình khoảng 25,5%. Tương tự, nghiên

cứ của Suryakodi et al. (2022) cũng có những báo cáo đầu tiên về tình trạng nhiễm EHP trong các hệ thống nuôi tôm thẻ chân trắng nước ngọt. Tuy nhiên, tỷ lệ nhiễm EHP ở các hệ thống nuôi này cũng ở mức rất thấp, dao động chỉ khoảng 1,5%.

Tương tự kết quả ghi nhận của nghiên cứu này, kết quả khảo sát của Hạnh và ctv. (2020) đã ghi nhận tỷ lệ nhiễm EHP rất cao ở Hà Tĩnh. Xu hướng bùng phát EHP được ghi nhận thường ở các giai đoạn nuôi từ mới thả tôm (tháng 8) đến cuối vụ nuôi (tháng 10), đặc biệt cao nhất vào đầu vụ ở vùng nuôi tôm Cẩm Xuyên. Tỷ lệ nhiễm ghi nhận được dao động từ 40 đến 80%. Tương tự, nghiên cứu của Caro et al. (2021) báo cáo tỷ lệ nhiễm EHP trên tôm thẻ chân trắng trong các thí nghiệm thực nghiệm dao động trung bình trong khoảng 28,5-50%, tỷ lệ nhiễm cao nhất đạt tới 87,5% ở các nghiệm thức nuôi tôm ở độ mặn 30ppt. Một số nghiên cứu tại Ấn Độ cũng có ghi nhận tỷ lệ nhiễm EHP cao tương tự kết quả nghiên cứu này ghi nhận được. Nghiên cứu của Singaravel et al. (2021) đã có báo cáo về sự bùng phát của dịch bệnh truyền nhiễm EHP ảnh hưởng đến tôm thẻ chân trắng được nuôi phổ biến nhất ở Ấn Độ, đã dẫn đến thiệt hại kinh tế nghiêm trọng. Tôm nhiễm EHP ngoài việc chậm phát triển, tôm còn có biểu hiện gan tụy bị teo và ruột, dạ dày màu trắng, trống rỗng. Tỷ lệ nhiễm EHP được ghi nhận qua phương pháp PCR dao động khoảng 34,4%. Với

xét nghiệm PCR được phát triển trong nghiên cứu của Hou et al. (2021), tình trạng nhiễm EHP được ghi nhận là rất phổ biến ở bốn khu vực của Sơn Đông, Trung Quốc. Kết quả là tỷ lệ dương tính với EHP đạt 51,2%, cho thấy EHP đang phổ biến trong nuôi tôm ở Trung Quốc. Ngoài ra, gần đây, nghiên cứu của Lee et al. (2022) cho thấy, ở Hàn Quốc, tỷ lệ nhiễm EHP trong các ao nuôi tôm thẻ chân trắng không có biểu hiện chậm lớn là rất cao, dao động ở mức 71,4%.

3.4. Kết quả giải trình tự gen của vi bào tử trùng EHP

Sản phẩm PCR dương tính với EHP được giải trình tự và sử dụng làm đối chứng dương cho các phân tích tiếp theo. Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR đã phát hiện EHP nhiễm trên tôm thẻ chân trắng qua ghi nhận sản phẩm sau khi điện di có tổng cộng 510 nucleotit, tương đồng với kết quả hiện vạch tại 510 bp. Trình tự này cũng được so sánh với trình tự gen 18s ribosomal RNA của EHP phân lập từ tôm thẻ chân trắng (Accession number: KY643648.1) trên ngân hàng gen của Anushya et al. (2017) bằng phần mềm BLASTN. Kết quả so sánh 2 trình tự gen cho thấy EHP phân lập từ tôm thẻ chân trắng trong thí nghiệm này có trình tự gen 18s ribosomal RNA tương đồng với trình tự gen EHP được đăng trên ngân hàng gen NCBI với mức độ tương đồng là 99,8% (Hình 6).

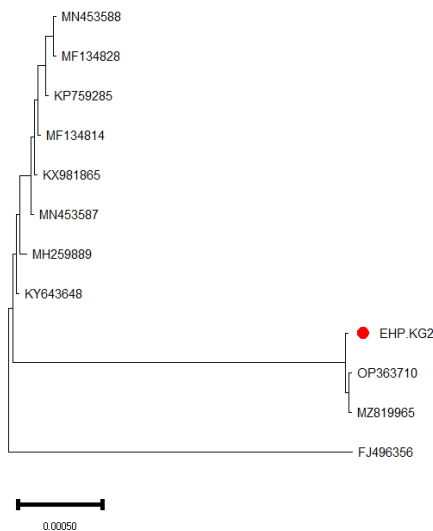
		<u>Mỗi xuôi</u>			
EHP- <i>L. vanamei</i>	1	GCCTGAGAGATGGCTCCACGTC	CCAAGGATGGCAGCAGGCGCGAAAATTGTCCACTCTTT	60	
KY643648.1	180	239	
EHP- <i>L. vanamei</i>	61	TGAGAGGAGACAGTTATGAAACCTGAGTAGAAGGGTCGAGTGTAAAAACCTTGACGTGAA		120	
KY643648.1	240	299	
EHP- <i>L. vanamei</i>	121	GCAATTGGAGGGCAAGTTTTGGTGCCAGCAGCCGCGSTAATTCACACTCCAAGAGTGTCT		180	
KY643648.1	300	359	
EHP- <i>L. vanamei</i>	181	ATGGTGGATGCTGCAGTTAAAGGGTCCGTAGTCTGATGCAATTTAAAAGGTGTGTAA		240	
KY643648.1	360	419	
EHP- <i>L. vanamei</i>	241	AAGCCATTGAGTTTGTGAGAGTAGCGGAACGGATAGGGAGCATGGTATAGTAGGCCAAA		300	
KY643648.1	420G	479	
EHP- <i>L. vanamei</i>	301	GAATGAAATCTCAAGACCCACCTGGACCAACGGAGGCGAAAGCGATGCTCTTAGACGTA		360	
KY643648.1	480	539	
EHP- <i>L. vanamei</i>	361	TCTGGGGATCAAGGACGAAGGCTAGAGTATCGAAAGTGATTAGACACCGCTGTAGTTCTA		420	
KY643648.1	540	599	
EHP- <i>L. vanamei</i>	421	GCAGTAAACTATGCCGACAATGCTGGGTGTTGCGAGACCGATGCTTGGTGGGAGAAAT		480	
KY643648.1	600	659	
EHP- <i>L. vanamei</i>	481	CTTAGTTTTCGGGCTCTGGGGATAGTACGC		510	
KY643648.1	660	689	
		<u>Mỗi ngược</u>			
		GCGTACTATCCCCAGGCCGA			

Hình 6. Kết quả giải và so sánh trình tự gen giữa chủng EHP phân lập từ nghiên cứu (EHP-*L. vanamei*) và chủng EHP được đăng trên ngân hàng gen (KY643648.1)

Cây phát sinh loài của các gen ssu rRNA đã chứng minh trình tự EHP thu được từ tôm thẻ chân trắng chậm tăng trưởng ở Kiên Giang (được chỉ định là EHP.KG2) tách biệt rõ ràng với các trình tự EHP

được báo cáo trước đó và hình thành nhánh đơn của riêng nó (Hình 7). Bên cạnh đó, cây phát sinh loài cũng cho thấy các chủng EHP mà nghiên cứu này thu được có mối quan hệ tương đồng nhất về kiểu

gen với các chủng EHP thu được ở Hàn Quốc (mẫu OP363710.1 thu năm 2022 và mẫu MZ819965.1 thu năm 2021) và ở Thái Lan (mẫu FJ496356.1 thu năm 2008). Đặc biệt, các mẫu gen EHP ký hiệu MF134828.1, MF134814.1, MN453588.1 được thu tại Việt Nam vào năm 2019 thì lại có khoảng cách tiến hóa khá xa so với mẫu EHP thu tại Kiên Giang. Phân tích BLAST cho thấy sự tương đồng về gen 18s rRNA giữa EHP.KG2 và các trình tự EHP khác trong cây phát sinh loài là 99,8% đến 100%. Các nghiên cứu trước đây đã sử dụng phương pháp này để khảo sát mối quan hệ di truyền của các chủng EHP với tỉ lệ tương đồng là 99-100% (Kim et al., 2021; Li et al., 2021).



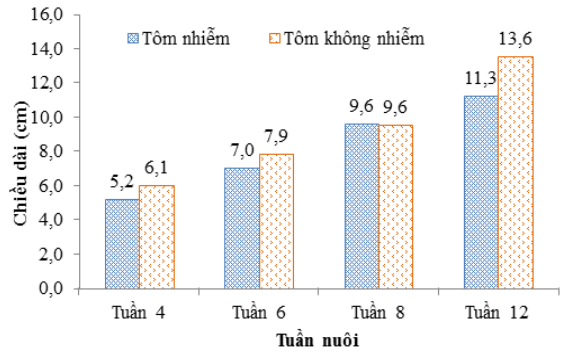
Hình 7. Cây phát sinh loài của chủng EHP thu ở Kiên Giang (EHP.KG2)

3.5. Ảnh hưởng của EHP đến chiều dài và khối lượng của tôm

Kết quả phân tích chiều dài và khối lượng các mẫu tôm cho thấy, đa số các mẫu tôm nhiễm EHP có chiều dài ngắn hơn và khối lượng nhỏ hơn đáng kể so với các mẫu tôm không nhiễm EHP và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Biểu đồ Hình 8 cho thấy mẫu tôm ở giai đoạn 12 tuần có sự gia tăng kích thước về chiều dài. Tuy nhiên, chiều dài của nhóm tôm nhiễm EHP thì lại có sự khác biệt lớn so với nhóm tôm không nhiễm EHP. Ở thời điểm tuần nuôi thứ 4, tôm nhiễm bệnh có chiều dài trong khoảng 4,0-6,5 cm, trong khi đó, những mẫu tôm không nhiễm bào tử EHP có chiều dài trong khoảng 4,3-6,8 cm. Chiều dài trung bình của các mẫu tôm nhiễm bệnh thấp hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với các mẫu tôm không nhiễm EHP. Ở

thời điểm tuần nuôi thứ 6, tôm nuôi có sự gia tăng kích thước. Tôm nhiễm bệnh có chiều dài trong khoảng 6,4-8,4 cm, ngược lại những mẫu tôm không nhiễm bào tử EHP thì có chiều dài trong khoảng 6,8-8,4 cm. Chiều dài trung bình của các mẫu tôm nhiễm bệnh thấp hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với các mẫu tôm không nhiễm EHP.

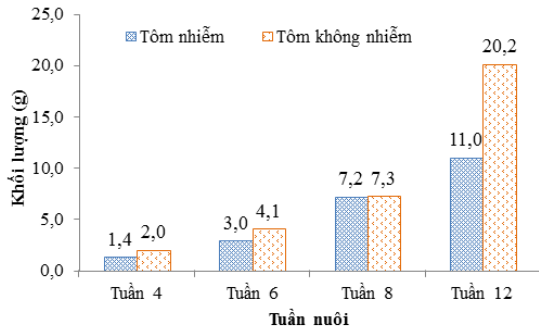


Hình 8. Chiều dài trung bình của tôm nhiễm EHP và tôm không nhiễm EHP

Xét riêng ở tuần nuôi thứ 8, thời điểm tỷ lệ nhiễm EHP ở các ao nuôi tôm ở mức thấp nhất thì chiều dài tôm có sự gia tăng nhanh chóng. Tôm nhiễm bệnh thường có chiều dài trong khoảng 8,3-10,9 cm, trong khi đó, những mẫu tôm không nhiễm bào tử EHP có chiều dài trong khoảng 7,9-10,9 cm. Chiều dài trung bình của các mẫu tôm nhiễm bệnh khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$) so với các mẫu tôm không nhiễm EHP. Tuy nhiên, kết quả phân tích chiều dài tôm ở thời điểm 12 tuần nuôi lại có sự khác biệt đáng kể. Tôm không nhiễm EHP có chiều dài dao động khoảng 11,3-14,8 cm, trong khi đó tôm nhiễm bệnh thường có chiều dài ngắn hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$), dao động khoảng 10,7-14,0 cm. Nhìn chung, từ kết quả phân tích qua 4 đợt thu mẫu ở 4 thời điểm trong vụ nuôi cho thấy EHP có ảnh hưởng tiêu cực đến sự phát triển về chiều dài của tôm nuôi.

Tương tự giá trị chiều dài của tôm, kết quả phân tích khối lượng các mẫu tôm cho thấy đa số các mẫu tôm nhiễm EHP đều có khối lượng thấp hơn so với các mẫu tôm không nhiễm EHP. Mặc dù nhiễm EHP xuyên suốt qua các tuần nuôi nhưng khối lượng của tôm nuôi vẫn có sự gia tăng. Tuy nhiên, có sự phân cỡ đáng ghi nhận giữa các cá thể tôm. Ở thời điểm đầu tiên phát hiện bệnh, tỷ lệ nhiễm đạt mức cao nhất (65%), tôm nhiễm bệnh thường có khối lượng trong khoảng 0,5-2,4 g, trong khi đó, những mẫu tôm không nhiễm EHP thì có khối lượng trong khoảng 0,9-2,7 g. Khối lượng trung bình của các mẫu tôm nhiễm bệnh thấp hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với các mẫu tôm không nhiễm EHP. Ở thời điểm

tuần nuôi thứ 6, tôm nuôi có sự gia tăng khối lượng. Tôm nhiễm bệnh thường có khối lượng trong khoảng từ 2,1-4,5 g, trong khi đó, những mẫu tôm không nhiễm bào tử EHP có khối lượng trong khoảng 2,6-5,0 g. Khối lượng trung bình của các mẫu tôm nhiễm bệnh thấp hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với các mẫu tôm không nhiễm EHP.



Hình 9. Khối lượng trung bình của tôm nhiễm EHP và tôm không nhiễm EHP

Đến tuần nuôi thứ 8, khi thời điểm tỷ lệ nhiễm EHP ở các ao nuôi tôm ở mức thấp nhất thì khối lượng tôm có sự gia tăng. Tôm nhiễm bệnh thường có khối lượng trong khoảng 4,8-10,0 g, trong khi đó, những mẫu tôm không nhiễm bào tử EHP có khối lượng trong khoảng 4,5-9,9 g. Khối lượng trung bình của các mẫu tôm nhiễm bệnh khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$) so với các mẫu tôm không nhiễm EHP. Tuy nhiên, kết quả phân tích khối lượng tôm ở thời điểm 12 tuần nuôi lại có sự khác biệt đáng kể. Tôm không nhiễm EHP có khối lượng dao động khoảng 10,5-24,8 g, trong khi đó tôm nhiễm bệnh thường có khối lượng thấp hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$), dao động khoảng 7,0-23,0 g. Từ kết quả phân tích qua 4 lần thu mẫu ở 4 thời điểm trong vụ nuôi cho thấy EHP có ảnh hưởng tiêu cực đến sự tăng trưởng về khối lượng của tôm nuôi.

Báo cáo của Rajendran et al. (2016) cho rằng tình trạng nhiễm EHP không ảnh hưởng lớn đến quá trình tăng trưởng của tôm. Mặt khác, nghiên cứu gần đây của Kim et al. (2021) lại ghi nhận nhiều trường hợp tôm chậm phát triển do nhiễm EHP, điều này tương tự nhận định của nghiên cứu. Báo cáo này ghi nhận những con tôm không nhiễm và nhiễm EHP có chiều dài chênh lệch khá lớn, lần lượt là 8,5-9,3 cm và 3,7-5,6 cm.

Shen et al. (2021) nghiên cứu về sự chậm phát triển của tôm thẻ *P. vannamei* nhiễm EHP. Các nhóm tôm đã được nuôi trong 70 ngày cho thấy kích thước cơ thể khác nhau đáng kể ($p < 0,05$) khi nhiễm EHP. Kết luận này cũng phù hợp với kết luận trước

đó của Hà và ctv. (2011), Kesavan et al. (2017) và Yang et al. (2021). Thêm vào đó, nghiên cứu của Shen et al. (2021) cũng nhận định rằng mức độ nhiễm EHP cao gây ra sự chậm phát triển nghiêm trọng hơn cho các cá thể tôm. Tương tự, một số nghiên cứu trước đây cũng đã chứng minh mức độ nhiễm EHP trong gan tụy có mối tương quan nghịch với chỉ số khối lượng cơ thể của tôm (Liu, 2017). Ngoài ra, có một số bằng chứng cũng cho thấy mức độ EHP lây lan theo chiều ngang cũng phụ thuộc vào các mức độ nhiễm EHP khác nhau giữa các con tôm có kích thước khác nhau.

Nghiên cứu chuyên sâu hơn về sự khác biệt gen giữa tôm nhiễm EHP và tôm không nhiễm EHP của Yang et al. (2021) đã chứng minh rằng tôm nhiễm EHP có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng chuyển hóa và hấp thu dinh dưỡng. Kết quả cho thấy việc điều chỉnh các gen quan trọng trong các con đường tổng hợp năng lượng đã góp phần rất lớn vào sự chậm phát triển của tôm. Ngoài ra, còn có sự điều chỉnh các gen liên quan đến miễn dịch giúp nâng cao sức đề kháng của tôm chống lại sự lây nhiễm EHP. Đồng quan điểm này, báo cáo của Shen et al. (2022) cũng cho rằng, các hoạt động tiêu hóa đo được ở tôm bị nhiễm EHP thấp hơn đáng kể so với ở tôm khỏe mạnh, trong khi các hoạt động miễn dịch lại có xu hướng ngược lại. Nhiễm EHP trực tiếp làm thay đổi cộng đồng vi khuẩn đường ruột và các hoạt động của enzyme, điều này đã ảnh hưởng tiêu cực đến các đặc điểm tăng trưởng của tôm.

Các thử nghiệm của Kumar et al. (2022b) cũng đã chứng minh tôm nhiễm EHP có FCR là 3,01 cao hơn so với 1,64 của tôm không nhiễm. Tăng trưởng của tôm nhiễm là 12,2 g, giảm đáng kể so với tôm không nhiễm EHP là 19,2 g. Thêm vào đó, các enzyme tiêu hóa α -amylase và lipase đã giảm đáng kể ở nhóm tôm nhiễm EHP. Nhiễm EHP đáng kể ảnh hưởng đến phản ứng miễn dịch không đặc hiệu bằng cách giảm hoạt động của alkaline phosphatase, catalase, γ - glutamyl transferase, tổng khả năng chống oxy hóa, anion superoxide, phenoloxidase. Do đó, tổn thương nghiêm trọng do EHP gây ra ở gan tụy đã ảnh hưởng đến quá trình bài tiết, tiêu hóa, hấp thụ. Những tác động này ảnh hưởng đến sinh lý, chuyển hóa lipid, chuyển hóa carbohydrate, hệ thống miễn dịch và gây ra giảm tiêu thụ thức ăn, tăng FCR và chậm phát triển. Vì vậy, nhiễm EHP không gây chết hàng loạt nhưng làm chậm đáng kể sự tăng trưởng của tôm, làm tăng chi phí sản xuất và dẫn đến thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho các trang trại nuôi tôm.

4. KẾT LUẬN

Tôm thẻ chân trắng nuôi thâm canh ở Kiên Giang phát hiện nhiễm EHP trong giai đoạn từ tuần nuôi thứ 4. Tôm không có dấu hiệu bệnh lý bên ngoài đặc trưng, chỉ giảm kích cỡ về chiều dài và khối lượng.

Bào tử EHP có cấu tạo bên ngoài dạng hình quả lê hoặc hình trứng, hơi thon nhỏ ở 1 đầu, có kích thước rất nhỏ, thường nằm thành từng cụm/đám trong tế bào gan tụy của tôm hoặc ở dạng tự do riêng rẽ bên ngoài tế bào gan tụy. Bào tử EHP chỉ tồn tại trong các mẫu bệnh phẩm từ gan tụy của tôm.

Sản phẩm PCR của các mẫu tôm hiện vạch 510 bp đặc hiệu cho EHP. Trình tự gen EHP phân lập từ

tôm thẻ chân trắng ở Kiên Giang tương đồng với trình tự gen EHP trên ngân hàng gen NCBI (KY643648.1) với mức độ tương đồng là 99,8%.

EHP có thể nhiễm trên tôm kéo dài qua các tháng nuôi. Tỷ lệ nhiễm dao động từ 18 đến 65% qua 4 đợt thu mẫu. EHP có ảnh hưởng tiêu cực đến chiều dài và khối lượng của tôm nuôi. Sau 12 tuần nuôi, tôm không nhiễm EHP có chiều dài và khối lượng trung bình (13,6cm, 20,2g) lớn hơn có ý nghĩa so với tôm nhiễm EHP (11,3cm, 11,0g).

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Công ty TNHH Thương mại Xuất nhập khẩu Mỹ Bình đã hỗ trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alavandi, S. V., Jithendran, K. P., Otta, S. K., Kumar, T. S., Poornima, M., Patil, P. K., & Vijayan, K. K. (2017). *Training Manual on Polymerase Chain Reaction (PCR) detection of Enterocytozoon hepatopenaei (EHP) in Shrimp*. Aquatic Animal Health and Environment Division, ICAR - Central Institute of Brackishwater Aquaculture.
- BT. (2022). *Kiên Giang: sản xuất tôm nước lợ theo chuỗi liên kết*. <https://dangcongsan.vn/kinh-te/kiem-giang-san-xuat-tom-nuoc-lo-theo-chuoi-lien-ket-606110.html>
- Caro, A. L. F., Alghamdi, F., De Belder, K., Lin, J., Mai, H. N., Millabas, J., & Dhar, A. K. (2021). The effect of salinity on *Enterocytozoon hepatopenaei* infection in *Penaeus vannamei* under experimental conditions. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02778-0>
- Chayaburakul, K., Nash, G., Pratanpipat, P., Sriurairatana, S., & Withyachumnarnkul, B. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60(2), 89-96. <https://doi.org/10.3354/dao060089>
- Flegel, T. W. (2015). Diseases of crustaceans - Hepatopancreatic microsporidiosis caused by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). Department of Agriculture. Australian Government.
- Giridharan, M., & Uma, A. (2017). A report on the hepatopancreatic microsporidiosis caused by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in *Penaeus vannamei* (Pacific white shrimp) farms in Thiruvallur district, Tamilnadu, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(6), 147-152. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.606.017>
- Hà, N. T., Hà, Đ. T., Thủy, N. T., & Liên, V. T. K. (2011). Phát hiện *Enterocytozoon hepatopenaei* ký sinh trên tôm sú (*Penaeus monodon*) nuôi ở Việt Nam và liên quan đến hội chứng phân trắng. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 12, 45-50.
- Hạnh, T. T. M., Nguyễn, N. T., Vinh, T. T. T., Là, N. T., Nguyệt, N. T. M., Hạnh, N. T., Mây, L. T., Thiết, C. C., & Nghĩa, N. H. (2020). Thực trạng môi trường và dịch bệnh tại vùng nuôi tôm trên cát ở Thạch Hà, Cẩm Xuyên và Nghi Xuân, Hà Tĩnh. *Tạp chí Khoa học-Công nghệ Thủy sản*, 36-44.
- Hou, Z. H., Yu, J. Y., Wang, J. J., Li, T., Chang, L. R., Fang, Y., & Yan, D. C. (2021). Development of a PCR assay for the effective detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and investigation of EHP prevalence in Shandong Province, China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 184, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107653>
- Kesavan, K., Mani, R., Toshiaki, I., & Sudhakaran, R. (2017). Quick report on prevalence of shrimp microsporidian parasite *Enterocytozoon hepatopenaei* in India. *Aquaculture Research*, 48(7), 3980-3984. <https://doi.org/10.1111/are.13078>
- Kim, B. S., Jang, G. I., Kim, S. M., Kim, Y. S., Jeon, Y. G., Oh, Y. K., & Kwon, M. G. (2021). First Report of *Enterocytozoon hepatopenaei* Infection in Pacific Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Cultured in Korea. *Animals*, 11(11), 1-8. <https://doi.org/10.3390/ani11113150>
- Kumar, T. S., Makesh, M., Alavandi, S. V., & Vijayan, K. K. (2022a). Clinical manifestations of White feces syndrome (WFS), and its association

- with *Enterocytozoon hepatopenaei* in *Penaeus vannamei* grow-out farms: A pathobiological investigation. *Aquaculture*, 547, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737463>
- Kumar, T. S., Praveena, P. E., Sivaramkrishnan, T., Rajan, J. J. S., Makesh, M., & Jithendran, K. P. (2022b). Effect of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infection on physiology, metabolism, immunity, and growth of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 553, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738105>
- Lee, C., Jeon, H. J., Kim, B., Choi, S. K., Kim, J. H., & Han, J. E. (2022). Multiple infections of a new-type decapod hepanhamaparvovirus (DHPV) and *Enterocytozoon hepatopenaei* in Korea and DHPV infectivity in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738922>
- Li, Z., Wang, Y., Fang, W., Zhou, J., & Li, X. (2021). Identification, sequence characteristics and expression analyses of four spore wall protein genes of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in *Litopenaeus vannamei*. *Mar. Fish*, 43, 81-92. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1004-2490.2021.0109>
- Liu, B. B., Yang, B., Wang, L., Wan, X. Y., Liu, Z., & Huang, J. (2017). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) of *Litopenaeus vannamei* by real-time PCR. *Prog. Fish. Sci.*, 38(2), 158-166.
- Ma, B., Yu, H., Fang, J., Sun, C., & Zhang, M. (2019). Employing DNA binding dye to improve detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in real-time LAMP. *Scientific reports*, 9(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52459-0>
- Margolis, L., Esch, G. W., Holmes, J. C., Kuris, A. M., & Schad, G. (1982). The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). *The Journal of parasitology*, 68(1), 131-133. <https://doi.org/10.2307/3281335>
- Mark, S. (2019). Aquatic Animal Diseases Significant to Australia: Identification Field Guide, 5th Edition, Canberra: Australian Government Department of Agriculture, CC BY 4.0 (pp. 295-300).
- Mây, L. T., Hạnh, T. T. M., & Vinh, T. T. T. (2020). Sinh vật mang vi bào tử trùng *Enterocytozoon hepatopenaei* và một số yếu tố ảnh hưởng đến bệnh vi bào tử trùng ở tôm nuôi nước lợ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Vinh*, 49(3A), 43-50.
- Oanh, D. T. H., Thuy, N. T. N. & Ut, V. N. (2021). Investigation of parasites in the digestive tract of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured at coastal farms in the Mekong Delta. *Can Tho University Journal of Science*, 13 (Special issue on Aquaculture and Fisheries), 79-85. <https://doi.org/10.22144/ctu.jen.2021.020>
- Patil, P. K., Geetha, R., Ravisanakar, T., Avunje, S., Solanki, H. G., Abraham, T. J., ... & Vijayan, K. K. (2021). Economic loss due to diseases in Indian shrimp farming with special reference to *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 533, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736231>
- Phước, L. H. (2020). *Khảo sát sự hiện diện của vi bào tử trùng Enterocytozoon hepatopenaei trên tôm giống, thức ăn tôm, tôm thẻ chân trắng và các loài động vật khác trong ao nuôi tôm ở ĐBSCL*. Trung tâm Quan trắc môi trường & bệnh Thủy sản Nam Bộ.
- Prachumwat, A., Munkongwongsiri, N., Eamsaard, W., Lertsiri, K., Flegel, T. W., Stentiford, G. D., & Sritunyalucksana, K. (2021). A potential prokaryotic and microsporidian pathobiome that may cause shrimp white feces syndrome (WFS). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.05.23.445355>
- Rajendran, K. V., Shivam, S., Praveena, P. E., Rajan, J. J. S., Kumar, T. S., Avunje, S., ... & Vijayan, K. K. (2016). Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in farmed *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in India. *Aquaculture*, 454, 272-280. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.034>
- Salachan, P. V., Jaroenlak, P., Thitamadee, S., Itsathitphisarn, O., & Sritunyalucksana, K. (2017). Laboratory cohabitation challenge model for shrimp hepatopancreatic microsporidiosis (HPM) caused by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *BMC Veterinary Research*, 13(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0923-1>
- Shen, H., Fan, X., Qiao, Y., Jiang, G., Wan, X., Cheng, J., & Shen, J. (2021). The links among *Enterocytozoon hepatopenaei* infection, growth retardation and intestinal microbiota in different sized shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 21, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100888>
- Shen, H., Zhang, X., Qian, D., Chen, J., & Xiong, J. (2022). Pathobiology of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in shrimp: Diagnosis and interpretation from the gut bacterial community. *Aquaculture*, 554, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738169>
- Singaravel, V., Gopalakrishnan, A., & Martin, G. G. (2021). Multiple infections of *Enterocytozoon hepatopenaei* and Hepatopancreatic parvovirus in pond-reared *Penaeus vannamei* in India. *Aquaculture*, 545, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737232>
- Singh, M., & Singh, P. (2018). *Enterocytozoon hepatopenaei*: A microsporidian in the midst of

- serious threat to shrimp aquaculture. *J Entomol Zool Stud*, 6, 936-939.
- Suryakodi, S., Nafeez Ahmed, A., Badhusha, A., Santhosh Kumar, S., Sivakumar, S., Abdul Majeed, S., & Sahul Hameed, A. S. (2022). First report on the occurrence of white spot syndrome virus, infectious myonecrosis virus and *Enterocytozoon hepatopenaei* in *Penaeus vannamei* reared in freshwater systems. *Journal of Fish Diseases*, 45(5), 699-706. <https://doi.org/10.1111/jfd.13595>
- Tang, K. F., Pantoja, C. R., Redman, R. M., Han, J. E., Tran, L. H., & Lightner, D. V. (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. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.009>
- Tourtip, S., Wongtripop, S., Stentiford, G. D., Bateman, K. S., Sriurairatana, S., Chavadej, J., & Withyachumnarnkul, B. (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(1), 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.004>
- Yang, L. G., Wang, Y., Wang, Y., Fang, W. H., Feng, G. P., Ying, N., & Li, X. C. (2021). Transcriptome analysis of pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) intestines and hepatopancreas in response to *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107665>