

# ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG VI RÚT ĐỐM TRẮNG CỦA CHỦNG *Vibrio harveyi* ĐỘT BIẾN CHỨA DNA VECTOR MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN VỎ VP28 TRÊN ĐỐI TƯỢNG TÔM THẺ CHÂN TRẮNG

Trần Phạm Vũ Linh<sup>1</sup>, Mai Thu Thảo<sup>1</sup>, Nguyễn Quốc Bình<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Vi rút gây hội chứng đốm trắng (WSSV) là một vi rút lây nhiễm cao và là nguyên nhân gây tử vong hàng loạt trên tôm nuôi như tôm sú *Penaeus monodon* và tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* trên toàn thế giới. Nghiên cứu khả năng gây đáp ứng miễn dịch của chủng *Vibrio harveyi* nhược độc bằng phương pháp gây đột biến gen wzz (O-antigen chain length determinant gene) đồng thời chèn gen mã hóa protein vỏ VP28 của vi rút gây bệnh đốm trắng tại vị trí đột biến gen được thực hiện. Ở thử nghiệm đầu tiên, tôm thịt 1 - 1,5 g được tiêm vi khuẩn đột biến ở các nồng độ:  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  CFU/tôm; sau 3 ngày theo dõi, tiến hành công độc liều  $LD_{70}$  của WSSV và theo dõi trong 5 ngày sau công độc. Ở thử nghiệm thứ hai, tôm P15 được ngâm vi khuẩn đột biến ở các nồng độ  $10^7$ ,  $10^6$  CFU/ml, sau 7 ngày công độc liều  $LD_{70}$  của WSSV và cũng theo dõi trong 7 ngày. Kết quả cho thấy, ở thí nghiệm ngâm chỉ số hiệu quả bảo vệ (RPS) là 43% ở nghiệm thức vi khuẩn ngâm là  $10^7$  và  $10^6$  CFU/ml, ở thí nghiệm tiêm RPS là 62% ở nghiệm thức tiêm là  $10^5$  CFU/tôm. Kết quả cho thấy có thể phát triển vắc xin sống nhược độc kháng lại WSSV cho tôm.

**Từ khóa:** WSSV, *Vibrio harveyi*, vắc xin, RPS

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam đã xác định thủy sản là ngành kinh tế mũi nhọn của đất nước. Trong báo cáo mới nhất của Bộ Nông nghiệp và PTNT, xuất khẩu thủy sản trong năm 2017 đạt trên 8,3 tỷ USD, xuất khẩu tôm tăng trưởng trên 21% và giá trị xuất khẩu đạt 3,8 tỷ USD (Ngô Bảo Châm, 2017). Tuy nhiên, dịch bệnh luôn là mối đe dọa lớn đối với xuất khẩu tôm. Trong đó, dịch bệnh đốm trắng là đặc biệt nguy hiểm, tôm nhiễm bệnh có tỷ lệ chết lên tới 100% trong vòng 3 - 10 ngày (Namikoshi *et al.*, 2004). Do đó, việc nghiên cứu cách phòng và trị bệnh đốm trắng cho tôm đang đặt ra thách thức cho các nhà khoa học. Hàng rào miễn dịch ở tôm chủ yếu dựa trên hệ thống miễn dịch không đặc hiệu. Tuy nhiên, có một số thí nghiệm đã chỉ ra rằng những tôm được tiêm vắc xin tiểu phần VP28 - protein vỏ của vi rút WSSV (vi rút gây bệnh đốm trắng ở tôm) có tỉ lệ sống cao hơn sau khi tái cảm nhiễm (Witteveldt *et al.*, 2004). Trong nghiên cứu này, *Vibrio harveyi*, vi khuẩn gây bệnh phát sáng trên tôm, được sử dụng để vận chuyển protein vỏ VP28 của vi rút gây bệnh đốm trắng WSSV vào trong cơ thể tôm. *Vibrio sp.* xâm nhiễm vào cơ thể vật chủ theo 3 bước: đầu tiên vi khuẩn này xâm nhiễm vào mô vật chủ theo cơ chế hóa hướng động; tiếp theo *Vibrio sp.* phá hủy hệ thống sắt (iron-sequestering systems) tại mô vật chủ, hệ thống này giúp bảo vệ cơ thể chống lại sự oxy hóa; cuối cùng *Vibrio sp.* tấn công và phá hủy toàn bộ cơ thể vật chủ bằng hệ thống ngoại độc tố. *Vibrio sp.* xâm nhiễm đầu tiên tại biểu mô ruột, sau đó theo dòng máu chúng xâm nhiễm sang các cơ quan nội tạng khác (Katarina, 2005). Vi khuẩn *V. harveyi* nhược độc và mang protein vỏ VP28 được bổ sung vào bên trong cơ thể tôm liên tục. Mục tiêu nghiên

cứu nhằm đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch của chủng vi khuẩn đột biến đối với tôm thẻ chân trắng, đồng thời xác định tiềm năng ứng dụng chế phẩm vắc xin có khả năng kháng lại bệnh đốm trắng do WSSV trong thực tế.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Tôm thẻ chân trắng (postlarvae 10 ngày tuổi) được vận chuyển từ trại giống từ Vũng Tàu về thành phố Hồ Chí Minh. Tôm và mẫu nước nuôi tôm được xác định không nhiễm *V. harveyi* với cặp môi F-luxN/R-luxN tự thiết kế dựa vào trình tự gen tham khảo của *Thaithongnus* và cộng tác viên (2006), sản phẩm PCR khoảng 2000 bp và WSSV bằng WSSV PCR mono 1 kit (Trung tâm Công nghệ sinh học TP. Hồ Chí Minh), sản phẩm PCR khoảng 300 bp. Tôm được ương nuôi trong hệ thống lọc tuần hoàn tại khu sản xuất thử nghiệm Trung tâm CNSH TP. HCM, trước khi đưa vào thí nghiệm cảm nhiễm ngâm và tiêm. Tôm được ương với mật độ 1000 tôm/m<sup>3</sup>, cho ăn 4 lần/ngày với thức ăn viên (công ty sản xuất). Các chỉ tiêu môi trường được đảm bảo nằm trong khoảng thích hợp cho tôm nuôi, bao gồm pH 7,8 - 8,0; độ mặn 10 - 20‰; độ kiềm 50 - 70 mg/lit, NO<sub>2</sub>- khoảng 5 mg/l.

Chủng *Vibrio harveyi* đột biến và mẫu tôm nhiễm đốm trắng, được cung cấp từ phòng Công nghệ sinh học Thủy sản, Trung tâm CNSH TP. HCM.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Chuẩn bị vi khuẩn *Vibrio harveyi* nhược độc chứa DNA vector mang gene gen mã hóa protein vỏ VP28

Vi khuẩn được cấy ria lên đĩa thạch thiosulfate

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ sinh học thành phố Hồ Chí Minh

citrate bile sucrose agar (TCBS), ủ 28°C trong 16 giờ. Những khuẩn lạc có hình thái điển hình: khuẩn lạc tròn, màu xanh xám đến xanh lục (Lachlan *et al.*, 1996) được chọn, nuôi cấy lắc ở 28°C trong môi trường Luria-Bertani (LB) có bổ sung 2% NaCl cho đến OD = 1 ở bước sóng 600 nm, tương đương mật độ tế bào là 10<sup>9</sup> CFU/ml. Vi khuẩn được ly tâm 2500 g/30 phút, được huyền phù và hoà lại trong nước muối 1,5%, sử dụng như dịch gốc vi khuẩn ban đầu.

### 2.2.2. Chuẩn bị dịch vi rút gây chết 70% quần thể tôm (LD<sub>70</sub>)

Cân 10 g tôm thẻ nhiễm bệnh được nghiền 2 lần trong dung dịch đệm TN (Tris-HCl 50 mM, NaCl mM), dịch nghiền thu tối đa 300 ml, sau đó ly tâm 6000 vòng/phút, 4°C trong 30 phút, thu dịch nổi, trữ ở 4°C (Can-hua *et al.*, 2001). DNA vi rút tổng số được ly trích và định lượng bằng real time PCR theo bộ Real 1 (WSSV) Kit (Trung tâm CNSH TP. HCM).

Cảm nhiễm WSSV vào tôm 1 - 1,5 g bằng phương pháp ngâm 6 giờ, sau đó vớt tôm ra hủ nhựa 1 lít chứa nước biển sạch, nuôi riêng từng con tôm và theo dõi trong thời gian 5 ngày. Thí nghiệm bố trí gồm 5 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần (LLL) và 10 tôm/LLL: (1) đối chứng âm ngâm bằng đệm TN, (2) (3), (4) và (5) lần lượt được ngâm nồng độ vi rút pha loãng 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> và 10<sup>-4</sup> lần từ dịch vi rút ban đầu. Tôm được ghi nhận tỷ lệ sống và kiểm tra sự hiện diện của vi rút bằng bộ kit WSSV PCR bằng mono 1. WSSV, với sản phẩm khuếch đại 300 bp. Dựa vào kết quả thí nghiệm, liều LD<sub>70</sub> của WSSV được xác định bằng công thức Reed và Muench (1938).

$$LD_{50} = 10^{(a+x)}$$

Trong đó: 10<sup>a</sup>: Nồng độ tại đó số lượng cá sống và cá chết sau thí nghiệm là 50%.

$$x = (Pa - 50)/(Pa - Pu)$$

Trong đó, Pa, Pu là tỉ lệ cận trên và cận dưới của nồng độ gây chết 50%.

### 2.2.3. Đánh giá hiệu quả bảo vệ bằng phương pháp tiêm trên tôm thịt 1 - 1,5 g

Tôm thịt (1 - 1,5 g/tôm) được nuôi lớn từ tôm giống Pl10, được nuôi thuần trong hệ thống bể 40 lít 3 ngày trước thí nghiệm. Tôm được tiêm với 50µl dịch vi khuẩn nhược độc được chuẩn bị tương tự mục 2.2.1. Thí nghiệm gây đáp ứng miễn dịch bằng phương pháp tiêm (a) có 5 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức có 3 LLL với 15 tôm/LLL, riêng nghiệm thức (5) có 30 tôm/LLL. Ở các nghiệm thức (a.1), (a.2), (a.3) và (a.4), tôm được tiêm 50 µl ở đốt bụng thứ 2 của tôm với dịch vi khuẩn tương ứng ở 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> CFU/tôm. Ở nghiệm thức (a.5) (đối chứng âm), tôm được tiêm 50 µl nước muối 1,5%. Tôm được cho

ăn 3 lần/ngày, theo dõi các chỉ tiêu môi trường đảm bảo nằm trong giới hạn cho phép. Ba ngày sau tiêm, tiến hành công độc lại với liều LD<sub>70</sub> của WSSV bằng phương pháp ngâm. Thí nghiệm công độc đánh giá hiệu quả bảo vệ bằng phương pháp tiêm (b) gồm 6 nghiệm thức, 3 LLL, 10 tôm/LLL, như sau: (b.1), (b.2), (b.3) và (b.4) tôm tiêm với dịch vi khuẩn ở 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> CFU/tôm, có công độc; (b.5) tôm tiêm nước muối 1,5%, có công độc; (b.6) tôm tiêm nước muối 1,5%, không công độc. Sau công độc, tôm được vớt riêng ra các hủ nhựa 1 lít có sục khí, cho tôm ăn 3 lần/ngày, theo dõi các chỉ tiêu môi trường đảm bảo nằm trong giới hạn cho phép. Theo dõi tỷ lệ sống tôm sau công độc trong vòng 7 ngày, mẫu tôm sống hay sắp chết được kiểm tra sự nhiễm WSSV bằng Real 1 WSSV Kit. Dựa vào kết quả trên, xác định được chỉ số RPS được xác định bằng công thức của Amend (1981): RPS = 1 - % tỷ lệ chết ở nghiệm thức chủng vaccine/ % tỷ lệ chết ở nhóm đối chứng.

### 2.2.4. Đánh giá hiệu quả bảo vệ bằng phương pháp ngâm tôm P15

Tôm thẻ chân trắng (Pl10) được nuôi thuần trong hệ thống thí nghiệm đến giai đoạn thí nghiệm Pl15. Tôm Pl15 được ngâm với dịch lên men vi khuẩn (được chuẩn bị theo mục 2.2.1.) trong 2 giờ. Thí nghiệm gây đáp ứng miễn dịch bằng phương pháp ngâm (c) được bố trí gồm 3 nghiệm thức: (c.1) và (c.2), tôm ngâm với dịch lên men vi khuẩn nồng độ 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup> CFU/ml; (c.3) đối chứng âm ngâm NaCl 1,5%. Sau thời gian ngâm, tôm được vớt ra bể chứa nước biển sạch. Cho tôm ăn 4 lần/ngày, theo dõi các chỉ tiêu môi trường đảm bảo nằm trong giới hạn cho phép. Sau 7 ngày, tiến hành công độc xác định hiệu quả bảo vệ bằng phương pháp ngâm (d) với liều LD<sub>70</sub> của WSSV với 4 nghiệm thức, 3 LLL, 10 tôm/LLL: (d.1) tôm ngâm 10<sup>7</sup> CFU/ml, có công độc; (d.2) tôm ngâm 10<sup>6</sup> CFU/ml, có công độc; (d.3) tôm ngâm ngâm NaCl 1,5%, có công độc; (d.4) tôm ngâm ngâm NaCl 1,5%, không công độc. Sau công độc, theo dõi thí nghiệm tương tự mục 2.2.3. Tôm được ghi nhận tỷ lệ sống chết, kiểm tra sự hiện diện của vi rút WSSV PCR bằng mono 1. WSSV Kit, dựa vào kết quả trên, xác định được chỉ số RPS của chủng vi khuẩn đối với tôm thẻ chân trắng bằng phương pháp ngâm.

### 2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Toàn bộ kết quả được xử lý bằng phần mềm GraphPad Prism 5.

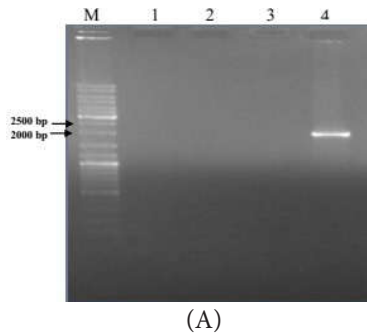
## 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 1/2016 đến tháng 1/2018, tại phòng CNSH Thủy sản, Trung tâm CNSH TP. HCM.

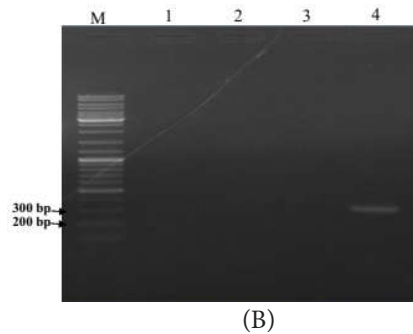
### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kiểm tra tôm và nước biển

Kiểm tra PCR với cặp môi F-LuxN/R-LuxN phát



hiện vi khuẩn *Vibrio harveyi* và W2aF/474inR để phát hiện WSSV. Kết quả kiểm tra ở Hình 1 cho thấy mẫu tôm và mẫu nước biển đều không nhiễm *V. harveyi* và WSSV, đạt tiêu chuẩn nuôi và làm thí nghiệm.



**Hình 1.** Kết quả PCR kiểm tra tôm và nước biển trước cảm nhiễm, gel agarose 1%, 100V trong 30 phút.

(A) PCR kiểm tra với cặp môi F-LuxN/R-LuxN; (B) kiểm tra với cặp môi W2aF/474inR; Giếng 1: mẫu tôm; Giếng 2: mẫu nước biển; Giếng 3: đối chứng âm; Giếng 4: đối chứng dương; giếng M: thang DNA

#### 3.2. Liều gây chết 70% quần thể tôm của WSSV ( $LD_{70}$ )

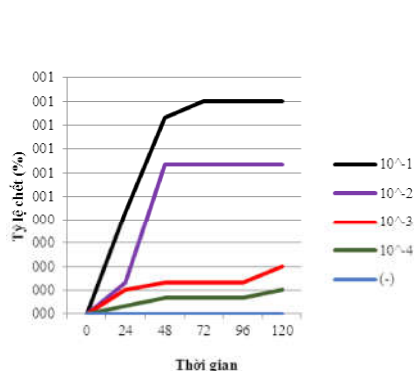
Kết quả lây nhiễm WSSV trên tôm thẻ chân trắng khỏe mạnh bằng phương pháp ngâm cho thấy vi rút có khả năng xâm nhiễm và gây chết tôm. Ở độ pha loãng  $10^{-1}$  và  $10^{-2}$ , tôm chết tập trung 2 ngày đầu sau lây nhiễm (Hình 2) với tỷ lệ chết lần lượt là 90% và 63% (Bảng 1), tôm chết có dấu hiệu rõ ràng của tôm bị nhiễm đốm trắng như: lơ đờ, bỏ ăn, có đốm trắng xuất hiện. Ở các độ pha loãng thấp hơn, tôm chết rải rác trong suốt quá trình theo dõi, và không có dấu hiệu bệnh lý rõ ràng. Tôm ở nghiệm thức

đối chứng âm (ngâm với đệm TN) vẫn khỏe mạnh, bắt mồi tốt và không có dấu hiệu bệnh đốm trắng. Kết quả PCR kiểm tra sau lây nhiễm WSSV cho thấy tôm chết do quá trình lây nhiễm cho kết quả dương tính, trong khi đó tôm đối chứng âm cho kết quả âm tính (Hình 3). Dung dịch pha loãng 100 lần từ dịch gốc ( $3,3 \times 10^5$  bản sao/ml) cho tỷ lệ chết 63% sau 5 ngày lây nhiễm được sử dụng như liều công độc. Tương tự, mật độ vi rút WSSV lớn hơn  $2,6 \times 10^3$  bản sao/ml khi ngâm công độc đã được xác định gây tỷ lệ chết lớn hơn 50% ở tôm 2 - 4 g/tôm (Phạm Kiên Cường, 2015).

**Bảng 1.** Tỷ lệ tôm chết thí nghiệm ngâm xác định liều gây chết 70% quần thể tôm

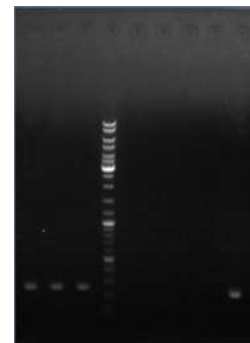
Độ pha loãng	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	Đối chứng (-)
Tỷ lệ chết (%)	$90 \pm 10^a$	$36 \pm 15^b$	$20 \pm 0^c$	$10 \pm 10^c$	$0 \pm 0^c$

Ghi chú:  $P < 0.01$ ; Giá trị  $\pm$  độ lệch chuẩn;  $N = 30$  tôm/nghiệm thức



**Hình 2.** Tỷ lệ chết tích lũy thí nghiệm cảm nhiễm virus WSSV bằng phương pháp ngâm

1 2 3 M 4 5 6 7 8



**Hình 3.** Kết quả PCR kiểm tra tôm sau lây nhiễm WSSV, gel agarose 1%, 100V trong 30 phút.

Giếng 1 - 3: DNA tách ngẫu nhiên từ 3 tôm bệnh; Giếng 4 - 6: DNA tách ngẫu nhiên từ 3 tôm chứng âm; Giếng 7 chứng âm PCR; Giếng 8 chứng dương PCR.

### 3.3. Đánh giá hiệu quả bảo vệ bằng phương pháp tiêm trên tôm thịt 1 - 1,5 g

Ở thí nghiệm bổ sung vi khuẩn nhược độc bằng phương pháp tiêm, tôm có dấu hiệu nhiễm bệnh, tôm lơ đờ, bỏ ăn vào ngày thứ 2 sau công độc. Tôm chết tập trung vào ngày thứ 2 và thứ 3 sau khi cảm nhiễm vi rút (Hình 4). Tỷ lệ tôm chết cao nhất được ghi nhận ở nghiệm thức đối chứng dương khoảng 87%. Các nghiệm thức còn lại có tỷ lệ chết thấp hơn nghiệm thức đối chứng dương, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê (Bảng 2). Ngoài trừ nghiệm thức tiêm  $10^5$  CFU/tôm có tỷ lệ chết là 33,33%, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng dương. Tỷ lệ bảo hộ tương đối RPS được xác định là 62%. Kết quả trên cho thấy tiềm năng của việc nghiên cứu ứng dụng vắc xin này trong thời gian tới. Kết quả nghiên cứu tương đồng với Vaseehara khi sử dụng vector pVAX1 để biểu hiện các protein vỏ VP28, tiêm trực tiếp loại DNA

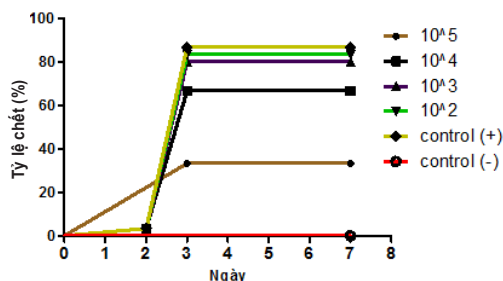
vector có gắn chèn các gen mã hóa cho protein vỏ VP28 vào mô tôm, lập lại 2 lần, mỗi lần cách nhau 7 ngày; nhóm tiến hành công độc ở ngày thứ 7 và 14 có tỉ lệ chết tích lũy trong 20 ngày tiếp theo là 23,3% và 30% tương ứng với hiệu quả bảo vệ là 73% và 65% (Vaseehara *et al.*, 2006). Năm 2012, Yumiao tiến hành biểu hiện protein VP28 trên *Escherichia coli* bằng plasmid biểu hiện bề mặt, ông tiến hành tiêm chủng vi khuẩn vào tôm *Exopalamon carincauda Holthuis*, khi tiến hành công độc lại ông thấy: nhóm tiêm *E. coli* mang plamid biểu hiện VP28 cho tỷ lệ sống 76% so nhóm tiêm *E. coli* không mang plamid chỉ 41%, dữ kiện cho thấy vi sinh vật sống có thể mang VP28 và kích thích hệ thống miễn dịch không đặt hiệu của tôm (Yumiao *et al.*, 2012).

Kết quả real time định tính các mẫu tôm sống và chết ở các nghiệm thức cho thấy, những mẫu tôm chết cho kết quả dương tính, mẫu tôm sống cho kết quả âm tính (Bảng 2).

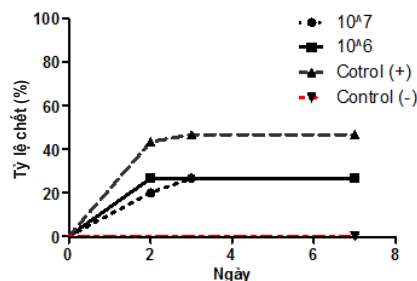
**Bảng 2.** Kết quả thí nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ bằng phương pháp tiêm trên tôm thịt 1 - 1,5 g/tôm

Nghiệm thức (CFU/tôm)	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	Đối chứng (+)	Đối chứng (-)
Tỷ lệ chết (%)	33 ± 15,2 <sup>a</sup>	67 ± 15,2 <sup>b</sup>	80 ± 10 <sup>b</sup>	83 ± 5,7 <sup>b</sup>	87 ± 5,7 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>
Ct trung bình	28,4 ± 6,7	26,7 ± 9,1	25,3 ± 7,8	25,2 ± 7,8	28,9 ± 4	0 ± 0

Ghi chú:  $P < 0,01$ ; Giá trị ± độ lệch chuẩn; N = 30 tôm/nghiệm thức.



**Hình 4.** Tỷ lệ chết tích lũy các nghiệm thức đánh giá hiệu quả bảo vệ bằng phương pháp tiêm trên tôm thẻ chân trắng 1 - 1,5 g/con.



**Hình 5.** Tỷ lệ chết tích lũy nghiệm thức đánh giá hiệu quả bảo vệ bằng phương pháp ngâm trên tôm P15 thẻ chân trắng.

### 2.4. Đánh giá hiệu quả bảo vệ bằng phương pháp ngâm tôm P15

Ở thí nghiệm bổ sung vi khuẩn nhược độc bằng phương pháp ngâm, tôm bắt đầu chết ở ngày thứ 2 sau công độc (Hình 5). Nghiệm thức ngâm tôm  $10^7$ ,  $10^6$  CFU/ml có tỷ lệ tôm chết (26,7%) ít hơn nghiệm thức đối chứng dương (46,7%) và khác biệt có ý nghĩa thống kê (Bảng 3). Tỷ lệ bảo hộ tương đối được xác định là 43% cho cả 2 nghiệm thức bổ sung vi khuẩn nhược độc. Dấu hiệu tôm chết sau công độc: tôm mất đường chỉ lưng, gan tụy và thân trắng đục, trái ngược tôm đối chứng âm: thân tôm trong, gan tụy và đường chỉ rõ ràng (Hình 7). Tuy không quan sát thấy rõ các đốm trắng là dấu hiệu

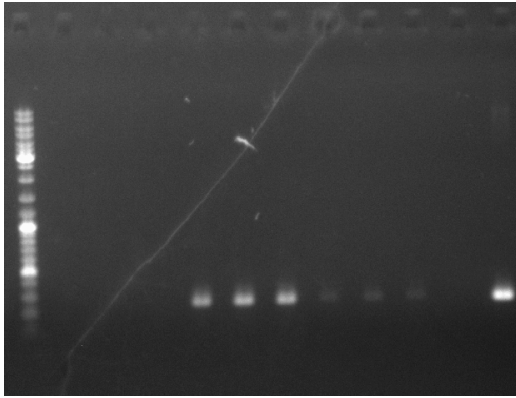
đặc trưng của bệnh, nhưng kết quả PCR kiểm tra sau lây nhiễm với mono 1. WSSV Kít cho thấy tôm chết do quá trình lây nhiễm ở nghiệm thức và đối chứng dương cho kết quả dương tính, trong khi đó tôm đối chứng âm cho kết quả âm tính (Hình 7). Kết quả nghiên cứu tương đồng với nghiên cứu của Syed và Jimmy, nhóm tác giả biểu hiện VP28 trên bề mặt *Baculovirus* dưới điều khiển của WSSV ie1 promoter, tiến hành thử nghiệm tôm 10 - 12 g/tôm bằng phương pháp ngâm sau đó công độc lại sau 3 và 15 ngày, cho chỉ số RPS 75% và 68,4% (Syed M.S. and Jimmy K., 2011). Tuy đối tượng nghiên cứu có khác nhau nhưng thấy tiềm năng của việc ứng dụng vắc xin ngâm phòng đốm trắng cho tôm.

**Bảng 3.** Kết quả thí nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ bằng phương pháp ngâm tôm P15

Nghiệm thức (CFU/tôm)	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	Đối chứng (+)	Đối chứng (-)
Tỷ lệ chết (%)	26,7 ± 20,8 <sup>a</sup>	26,7 ± 5,8 <sup>a</sup>	46,7 ± 5,8 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>

Ghi chú: P < 0.01; Giá trị ± độ lệch chuẩn; N = 30 tôm/nghiệm thức.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



**Hình 6.** Kết quả PCR kiểm tra tôm postlarva sau công độc với WSSV, gel agarose 1%, 100V trong 30 phút

Giếng M: Thang DNA; Giếng 1 - 3: DNA tách từ 3 tôm sống đối chứng âm; Giếng 4 - 6: DNA từ 3 tôm chết đối chứng dương; Giếng 7-9 DNA tách từ 3 tôm chết nghiệm thức công độc; Giếng 10: chứng âm PCR; Giếng 11: chứng dương PCR.



**Hình 7.** Hình tôm postlarva sống và chết sau công độc với WSSV.

Hình 1 và 2: tôm sống; Hình 3 và 4: tôm chết.

#### IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

##### 4.1. Kết luận

- Chủng *Vibrio harveyi* đột biến gen wzz và mang gen mã hóa protein vỏ VP28, cho hiệu quả bảo vệ với tôm thẻ chân trắng.

- Ở phương pháp tiêm tôm với RPS = 62% ở liều tiêm 10<sup>5</sup> CFU/tôm. Phương pháp ngâm tôm, với RPS = 43 % ở nồng độ ngâm 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup> CFU/ml. Hiệu quả bảo vệ có được sau 3 ngày tiêm và 7 ngày ngâm.

##### 4.2. Đề nghị

- Tối ưu hóa quá trình biểu hiện protein VP28 trong *Vibrio harveyi*, vì mức độ biểu hiện của chủng vắc xin đề tài là chưa cao.

- Lập lại thí nghiệm ở tôm nhiều độ tuổi khác nhau để đánh giá hiệu quả vắc xin ở các độ tuổi tôm.

- Nghiên cứu gây đáp ứng miễn dịch tôm với vắc xin bằng phương pháp cho ăn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

**Ngô Bảo Châm**, 2017. *Kim ngạch xuất khẩu thủy sản năm 2017*, ngày truy cập 03/01/2018. Địa chỉ <https://baomoi.com/kim-ngach-xuat-khau-thuy-san-nam-2017-dat-8-3-ty-usd/c/24487470.epi>.

**Phạm Kiên Cường**, 2015. *Nhân dòng và biểu hiện trên bề mặt bào tử Bacillus Subtilis gen mã hóa kháng nguyên VP28 của virus gây bệnh đốm trắng ở tôm*. Tiến sĩ. Trường Đại học quốc gia Hà Nội, Đại học Khoa học Tự nhiên.

**Amend D.F.**, 1981. Potency testing of fish vaccines. *Developments in Biological Standardization*. 49: 447-454.

**Can-hua H., Li-ren Z., Jian-hong Z., Lian-chun X., Qing-jiang W., Di-hua C., Joseph K. -K L.**, 2001. Purification and characterization of White Spot Syndrome Virus (WSSV) produced in an alternate host: crayfish. *Camburus clarkii*. Elsevier, 76: 115-125.

**Katarina S. T.**, 2005. *Detection and characterisation of Vibrio harveyi isolates*. Thesis BSc Biomedical Sciences. School of Biological Sciences. Dublin Institute of Technology, Kevin Street, Dublin 8.

**Lachilan H., Leigh O., Sandra S.**, 1996. A selective and differential medium for *Vibrio harveyi*. *Microbiology*. 62(9): 3548-3550.

**Namikoshi A., Wu J. L., Yahamshita T., Nishizawa T., Nishioka T., Arimoto M., Muroga K.**, 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 229: 25-35.

- Reed L.J., Muench H., 1938. A simple method of estimating fifty per centend points. *Am. J. Hyg.*, 27: 493-497.
- Syed M., Jimmy K., 2011. Oral vaccination of *Baculovirus*-Expressed VP28 displays enhanced protection against White spot syndrome virus in *Penaeus monodon*. *PloS ONE*, 6(11).
- Thaithongnum S., Ratanama P., Weeradechapol K., Sukhoon A., Vuddhakul V., 2006. Detection of *V.harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by the Most Probable Number technique with PCR. *Aquaculture*, 261: 1-9.
- Vaseehara B., Prem Anand T., Murugan T., Chen J.C., 2006. Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. *Microbiology*, 43(2): 137-142.
- Witteveldt J., Vlask J.M., van Hulst MC., 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. *Fish Shellfish Immunology*, 16 (5): 571-579.
- Yumiao S., Fuhua L., Yanhong C., Jianhai X., 2012. Enhanced resistance of marine shrimp *Exopalaemon carinicauda* Holthuis to WSSV by injecting live VP28-recombinant bacteria. *Acta Oceanologica Sinica*, 32 (2): 52-58.

## Evaluation of resistant ability of *Vibrio harveyi* encoding VP28 gene to white spot syndrome virus (WSSV) in whiteleg shrimp

Tran Pham Vu Linh, Mai Thu Thao, Nguyen Quoc Binh

### Abstract

White spot syndrome virus (WSSV) is a highly contagious virus and causes mass mortality in shrimp as prawn (*Penaeus monodon*) and white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) worldwide. The study aims to test the effect of vaccination on a mutant *Vibrio harveyi* which is knocked-out wzz gene (O-antigen gene determinant chain length) and VP28 gene encoding the envelop protein of the virus that causes white spots was inserted in gene knocking-out site - resistance of WSSV, *L. vannamei*. In the first test, shrimp (1-1,5 gram/shrimp) was vaccinated by intramuscular injection of the mutant *V. harveyi*  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  CFU/shrimp and was challenged with a virulent WSSV ( $LD_{70}$ ) after 3 days of post vaccination and tracked in 5 days. In the second test, shrimp P15 was immersed in the mutant *V. harveyi* with the  $10^7$  and  $10^6$  CFU/ml concentrations, and *L. vannamei* post larvae 15 was challenged with a virulent WSSV ( $LD_{70}$ ) after 7 days of post vaccination, and tracked in 7 days. The maximum Relative Percent Survival (RPS) was 62% at  $10^5$  CFU/shrimp in the first test and was 43% at  $10^7$ ,  $10^6$  CFU/ml in the second test, after 7-day infectivity. Results from this study show that there is a possibility to develop live vaccines against the WSSV infection in shrimp.

**Keywords:** WSSV, *Vibrio harveyi*, vaccine, RPS

Ngày nhận bài: 17/6/2018

Ngày phản biện: 26/6/2018

Người phản biện: GS.TS. Trần Thị Tuyết Hoa

Ngày duyệt đăng: 19/7/2018

## ĐIỀU TRA THÀNH PHẦN SÂU HẠI LÚA VÀ BIỆN PHÁP PHÒNG TRỪ SÂU CUỐN LÁ NHỎ BẰNG CHẾ PHẨM THUỐC THẢO MỘC VỤ XUÂN TẠI HUYỆN GIA BÌNH, TỈNH BẮC NINH

Nguyễn Tuấn Điệp<sup>1</sup>, Nguyễn Bình Nhự<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Thí nghiệm được theo dõi trên 2 giống lúa Q5 và Khang dân 18 vụ Xuân 2016 tại huyện Gia Bình, tỉnh Bắc Ninh. Thuốc trừ sâu thảo mộc được chiết xuất từ hạt củ đậu và quả ớt tươi chín để diệt trừ sâu cuốn lá nhỏ hại lúa. Kết quả thí nghiệm cho thấy có 12 loài sâu hại lúa, thuộc 8 họ, 6 bộ, trong đó bộ cánh vảy Lepidoptera chiếm nhiều nhất (6 loài). Các loài sâu cuốn lá nhỏ, rầy nâu và rầy lưng trắng xuất hiện trong suốt vụ với mức độ phổ biến cao còn các loài sâu hại khác xuất hiện rải rác với mức độ phổ biến thấp. Sâu cuốn lá nhỏ gồm 2 loài *Cnaphalocrocis medinalis* Guenee và *Marasmia ruralis*, trong đó loài *C. medinalis* Guenee là chủ yếu. Trong vụ Xuân xuất hiện 2 lứa sâu cuốn lá nhỏ nhưng lứa 2 gây hại nặng nhất từ giai đoạn lúa làm đòng đến trổ, mật độ của chúng trên giống Q5 là 20 con/m<sup>2</sup>, trên giống Khang dân 18 là 15 con/m<sup>2</sup>. Hiệu lực phòng trừ sâu cuốn lá nhỏ của các loại thuốc thảo mộc được pha chế từ dịch chiết hạt củ đậu và ớt có hiệu quả cao nhất từ 81,47 - 82,61% sau 7 ngày phun thuốc.

**Từ khóa:** Bắc Ninh, giống lúa Q5, Khang dân 18, sâu cuốn lá nhỏ, thuốc trừ sâu thảo mộc, vụ Xuân

<sup>1</sup> Trường Đại học Nông Lâm Bắc Giang