

Detection methods of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and its mutant (mutant-AHPND) in shrimp

Dung H. T. Mai^{1,2}, Binh T. Huynh^{1,2}, Hoan P. K. Nguyen^{1,2}, & Hieu V. Tran^{1,2*}

¹Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Short communication

Received: July 09, 2021

Revised: August 02, 2021

Accepted: August 11, 2021

Keywords

AHPND

Detection methods

ToxA

ToxB

V. parahaemolyticus

*Corresponding author

Tran Van Hieu

Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

ABSTRACT

Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) is a globally serious threat, especially for Vietnam shrimp culture since its first discovery in China in 2009. This disease is caused by toxin-carrying bacteria *Vibrio parahaemolyticus* whose plasmid encodes for a binary toxin ToxA and ToxB. The disease has a mortality rate of up to 100% after 3 - 5 days post-infection and fast spread among shrimp culturing regions. In 2017, a bacterial strain *V. parahaemolyticus* XN87 containing plasmid with mutant toxA and normal toxB genes was found. In this mutant form, shrimp did not show hepatopancreatic necrosis symptoms, but the early mortality rate in shrimp was still up to 50%. This mutation was called mutant-AHPND. Depending on different purposes and subjects, the corresponding detection method will be selected. Understanding the specific nature and application of each method is essential for the prevention and treatment of AHPND disease in shrimp to minimize economic losses for shrimp farmers. In this review, we summarized AHPND-detected methods based on detecting genes (toxA and toxB) or protein (ToxA and/or ToxB toxins) as well as a method for early detection of the mutant-AHPND. Eventually, potential detection methods are also addressed and discussed.

Cited as: Mai, D. H. T., Huynh, B. T., Nguyen H. P. K., & Tran, H. V. (2021). Detection methods of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and its mutant (mutant-AHPND) in shrimp. *The Journal of Agriculture and Development* 20(5), 16-27.

Các phương pháp phát hiện bệnh Hoại tử gan tụy cấp (AHPND) và dạng đột biến (mutant-AHPND) trên tôm

Mai Hoàng Thùy Dung^{1,2}, Huỳnh Tuấn Bình^{1,2},
Nguyễn Phước Khải Hoàn^{1,2} & Trần Văn Hiếu^{1,2*}

¹Khoa Sinh Học - Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

²Đại Học Quốc Gia TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học (ngắn)

Ngày nhận: 09/07/2021

Ngày chỉnh sửa: 02/08/2021

Ngày chấp nhận: 11/08/2021

Từ khóa

AHPND

Phương pháp phát hiện

ToxA

ToxB

V. parahaemolyticus

*Tác giả liên hệ

Trần Văn Hiếu

Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

TÓM TẮT

Bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) là mối đe dọa nghiêm trọng trên toàn cầu, đặc biệt đối với ngành nuôi tôm Việt Nam kể từ lần phát hiện đầu tiên tại Trung Quốc năm 2009. Bệnh này do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* mang plasmid mã hóa cho cặp nhị độc tố ToxA và ToxB gây ra. Bệnh có tỷ lệ chết lên đến 100% sau 3 - 5 ngày kể từ khi nhiễm bệnh và lây lan nhanh giữa các vùng nuôi tôm. Năm 2017, một dạng đột biến của căn bệnh này có tên mutant-AHPND được ghi nhận với một đoạn transposon 1053 bp chèn vào gen toxA trong khi gen toxB không bị ảnh hưởng nhưng tỷ lệ chết vẫn lên đến 50% và bệnh vẫn lây lan nhanh chóng. Tùy theo mục đích và đối tượng khác nhau mà phương pháp phát hiện tương ứng sẽ lựa chọn. Việc hiểu rõ bản chất và ứng dụng cụ thể của từng phương pháp đóng vai trò rất cần thiết cho công tác phòng ngừa, xử lý dịch bệnh AHPND trên tôm nhằm giảm thiểu thiệt hại kinh tế cho người nuôi tôm. Bài tổng quan này tổng hợp các phương pháp phát hiện bệnh thông qua phát hiện gen (toxA và toxB) hay protein (độc tố ToxA và/hoặc ToxB) cũng như phương pháp phát hiện sớm dạng đột biến đang được ứng dụng hiện nay. Cuối cùng, một số biện pháp phát hiện tiềm năng khác cũng được thảo luận.

1. Đặt Vấn Đề

Hoạt động nuôi tôm cung cấp đến 55% sản lượng tôm toàn cầu. Ở châu Á, sản lượng tôm đã phục hồi kể từ năm 2015, đạt 3,75 triệu tấn vào năm 2018 và có khả năng tăng lên 4,00 triệu tấn vào năm 2021 (GOAL, 2019). Ở khu vực các nước Châu Mỹ - La tinh, sản lượng tôm của Ecuador dự kiến đạt 700.000 tấn vào năm 2021, với tốc độ tăng trưởng 11,3% từ năm 2015 đến năm 2020. Sự tăng trưởng này được dự đoán sẽ đưa Ecuador trở thành nhà sản xuất lớn thứ ba trên thế giới sau Trung Quốc và Việt Nam (GOAL, 2019). Các kỹ sư và chuyên gia trong ngành của Đại học Florida dự đoán rằng sản lượng tôm thế giới sẽ tăng 5% vào năm 2020 lên trên 5 triệu tấn (GOAL, 2019). Từ đó cho thấy được ngành nuôi tôm hứa hẹn mang lại lợi nhuận cao, nguồn lợi kinh tế lớn cho

các nước đã và đang phát triển.

Tuy ngành nuôi tôm Việt Nam đã ra đời và phát triển từ lâu nhưng mãi tới giai đoạn sau năm 2003 mới được đầu tư và phát triển cạnh tranh với các nước khác trên thế giới. Trong giai đoạn 2015 đến 2021, năm 2015 ngành tôm Việt Nam không được thuận lợi do ảnh hưởng từ biến đổi thời tiết, và biến động tỷ giá trong nước. Nhưng từ 2016 đến nay, nhờ nhu cầu tiêu thụ tôm tăng trong khi nguồn cung trên thế giới giảm nên xuất khẩu tôm hồi phục và liên tục tăng trưởng (VASEP, 2018). Năm 2019, Việt Nam là quốc gia nuôi tôm lớn thứ hai trên thế giới (GOAL, 2019) với khoảng 160 doanh nghiệp tham gia chế biến, xuất khẩu tôm, tập trung chủ yếu ở Miền Trung, Nam Trung Bộ (Khánh Hòa, Phú Yên, Ninh Thuận, ...), Đồng Bằng Sông Cửu Long (Long An, Tiền Giang, Bến Tre, Trà Vinh, Sóc Trăng, Cà Mau, Kiên Gi-

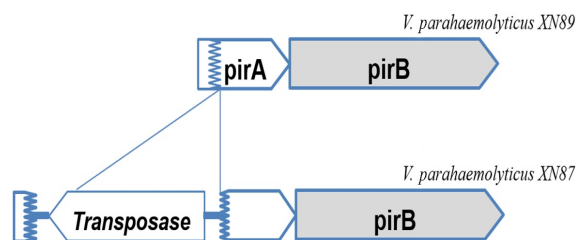
ang,...), với tổng công suất chế biến đạt gần 1 triệu tấn sản phẩm/năm (VASEP, 2019).

Tuy nhiên, sự phát triển của ngành nuôi tôm Việt Nam cũng gặp nhiều khó khăn, thách thức lớn. Giá nguyên liệu đầu vào khá cao, chất lượng tôm giống thấp, sản xuất nuôi tôm nhỏ lẻ, kỹ thuật thấp, giá thức ăn cao và không kiểm soát dẫn đến sản xuất chưa ổn định và nghề nuôi tôm kém bền vững (MARD, 2015). Bên cạnh đó, điều đáng lo ngại hàng đầu là hiện tượng biến đổi khí hậu toàn cầu làm phát sinh hàng loạt dịch bệnh nghiêm trọng trên tôm khiến nhiều hộ nuôi tôm rơi vào cảnh thua lỗ hay mất trắng, gây đe dọa đến sự phát triển bền vững của ngành công nghiệp nuôi tôm và những tổn thất nghiêm trọng về kinh tế. Điển hình trong đó là bệnh Hoại tử gan tụy cấp (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease - AHPND) theo MARD (2015).

Bệnh AHPND trước đây được gọi với tên Hội chứng tôm chết sớm (EMS) vì nó có thể gây ra tỷ lệ chết hàng loạt, đột ngột lên đến 100% ở tôm có thể quan sát thấy trong vòng 30 - 35 ngày sau khi thả nuôi. Bệnh AHPND gây thiệt hại kinh tế hàng năm lên tới hàng tỷ đô la kể từ đợt bùng phát đầu tiên ở Trung Quốc vào năm 2009 và liên tiếp ảnh hưởng đến các nước Đông Nam Á khác như Việt Nam (2010), Malaysia (2011), Thái Lan (2012), Philippines (2013), và Mexico (2013) (Santos & ctv., 2020).

Tác nhân gây bệnh AHPND là *Vibrio parahaemolyticus*, một loại vi khuẩn Gram âm hình que có mặt ở khắp nơi trong tự nhiên. *V. parahaemolyticus* gây AHPND có hại cho tôm nhưng không gây hại cho con người (Santos & ctv., 2020). Plasmid được tìm thấy ở các loài *Vibrio* gây bệnh chứa gen mã hóa các độc tố gây AHPND, là độc tố PirA và PirB làm bong tróc các tế bào biểu mô ống gan tụy của tôm, làm tôm chết hàng loạt (Xiao & ctv., 2017). Năm 2017, một nhóm nghiên cứu ở Thái Lan đã phân lập được chủng *Vibrio parahaemolyticus* XN87 chứa plasmid pVA1 đột biến không tạo ra độc tố PirA và không gây ra những dấu hiệu lâm sàng của bệnh AHPND nhưng vẫn gây chết tôm với tỷ lệ 50% (Phiwsaiya & ctv., 2017) nên gọi là AHPND dạng đột biến (mutant-AHPND). Chủng *V. parahaemolyticus* (XN87) chứa plasmid pVA1 đột biến với việc chèn trình tự transposon vào gen pirAvp của nó theo như mô tả ở Hình 1.

Bệnh AHPND lây lan với tốc độ nhanh là mối nguy rất lớn đối với các khu vực nuôi tôm trọng điểm có nhiều ao gần nhau, vì khi một ao nuôi



Hình 1. Sơ đồ tỉ lệ của vùng gen độc tố pirAvp và pirBvp trong plasmid pVA1 bình thường và trong plasmid đột biến của XN87 với đoạn gen transposon được chèn vào gen pirAvp (Phiwsaiya & ctv., 2017).

có bệnh nếu không kịp thời phát hiện và có biện pháp cách ly khoanh vùng ổ dịch thì khả năng lây lan sang các ao khác là rất lớn, dẫn đến tổn thất diện rộng. Chúng xâm chiếm đường tiêu hóa của tôm và tạo ra độc tố gây phá hủy mô và rối loạn chức năng của gan tụy, cơ quan tiêu hóa của tôm. Dịch bệnh này thường xảy ra ở tôm sú và tôm thẻ chân trắng. Khi bị nhiễm bệnh, tôm có biểu hiện ngừng ăn, bơi chậm, vỏ mỏng, màu tôm nhợt nhạt, gan tụy mềm, dễ vỡ, sưng to, đổi màu, và chết. Tôm bị bệnh lâu ngày có gan tụy teo, dai, nhạt màu, ruột trống không chứa thức ăn. Tỷ lệ chết có thể lên đến 100% chỉ sau 3 - 5 ngày bệnh, khi công bố dịch phải tiêu hủy toàn bộ ao tôm (MARD, 2016).

Bệnh AHPND gây thiệt hại lớn đối với ngành tôm Việt Nam. Năm 2016, bệnh xảy ra ở 305 xã của 82 huyện thuộc 25 tỉnh thành với tổng diện tích bệnh lên đến 6339,15 ha và diện tích vùng nuôi tôm bị nhiễm bệnh đang có dấu hiệu tăng theo thời gian (Lua & ctv., 2016). Các phương pháp sử dụng hiện nay để chẩn đoán bệnh AHPND dựa trên hai mục tiêu chính là phát hiện gen gây bệnh hoặc phát hiện protein gây bệnh. Trong bài tổng quan này, các phương pháp phát hiện phổ biến và bổ sung thêm các phương pháp mới nhất hiện nay đã được tổng hợp nhằm phục vụ công tác chẩn đoán, và phòng chống AHPND cho người nuôi tôm.

2. Phát Hiện AHPND Dựa Trên Gen

2.1. Phương pháp PCR (monoplex PCR)

Để hỗ trợ xác định bệnh ở các ao nuôi, cần dùng phản ứng khuếch đại gen (PCR). Phương pháp phân tích này nhằm xác định DNA của mầm bệnh có hay không tồn tại trong mẫu kiểm tra dựa vào việc xác định đoạn DNA đích có được

Bảng 1. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt của phương pháp AP3

Thành phần	Thể tích (μL)	Chu trình nhiệt
10X PCR buffer	2,5	Tiền biến tính 94°C, 5 phút
50 mM MgCl ₂	0,7	30 chu kỳ
10 mM dNTPs	0,4	Biến tính 94°C, 30 giây
10 μM mỗi F	0,5	Bắt cặp mỗi 53°C, 30 giây
10 μM mỗi R	0,5	Kéo dài mỗi 72°C, 40 giây
Taq DNA polymerase	0,2	Kéo dài cuối 72°C, 5 phút
Tổng cộng	25,0	

Nguồn: Sirikharin & ctv. (2014).

Bảng 2. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt của phương pháp monoplex PCR

Thành phần	Thể tích (μL)	Chu trình nhiệt
10X PCR buffer	2,0	Tiền biến tính 95°C, 10 phút
50 mM MgCl ₂	0,8	29 chu kỳ
10 mM dNTPs	0,8	Biến tính 95°C, 30 giây
10 μM mỗi F	0,6	Bắt cặp mỗi 60°C, 30 giây
10 μM mỗi R	0,6	Kéo dài mỗi 72°C, 15 giây
Taq DNA polymerase	0,1	Kéo dài cuối 72°C, 5 phút
Tổng cộng	20,0	Làm mát 25°C, 2 phút

Nguồn: Mai-Hoang & ctv. (2021).

khuyết đại hay không. Flegel & Lo (2014) đã cùng phát triển phương pháp PCR để phát hiện vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm. Hai cặp mồi được đặt tên là AHPND primer set 1 (AP1) và AHPND primer set 2 (AP2) phát hiện hai vùng biên của đoạn gen mã hóa cho hai loại độc tố. Tuy nhiên trong các thử nghiệm của mình, nhóm nghiên cứu ghi nhận một mẫu dương tính với AP1 nhưng lại âm tính với AP2, điều đó cho thấy hai cặp mồi trên vẫn chưa chính xác tuyệt đối (Santos & ctv., 2020).

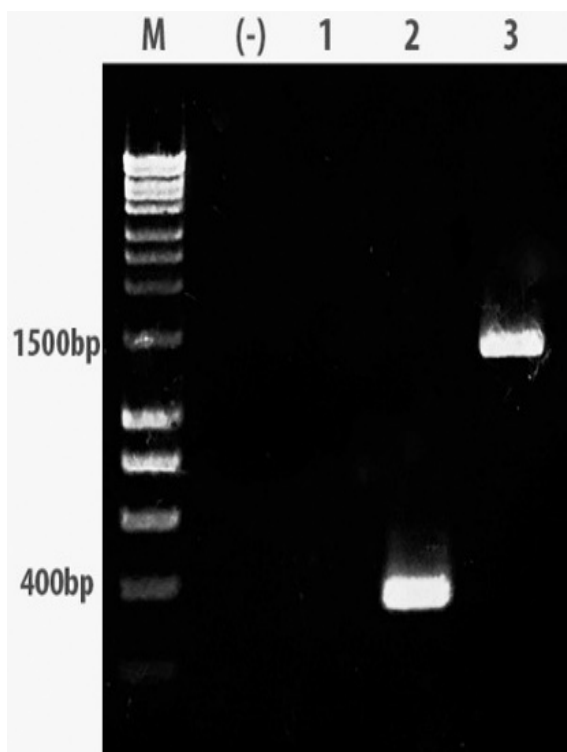
Phương pháp PCR cải tiến (gọi là AP3) để phát hiện bệnh hoại tử gan tụy cấp đã được phát triển bởi Sirikharin & ctv. (2014), nhóm nghiên cứu đề nghị rằng AP3 primer sẽ thay thế AP1 và AP2 đã công bố trước đó. Bệnh hoại tử gan tụy cấp do hai độc tố PirA_{vp} và PirB_{vp} gây ra nên Sirikharin và cộng sự đã thiết lập cặp mồi đơn phát hiện độc tố PirA_{vp}. Mẫu tôm nghi ngờ bệnh sẽ trải qua bước tiền tăng sinh trong bốn giờ ở 30°C dưới điều kiện lắc, sau đó tách plasmid và thực hiện PCR chẩn đoán với cặp mồi như Bảng 5. Thành phần và chu trình nhiệt của phương pháp được thực hiện như Bảng 1.

Với các kết quả về độ nhạy và độ đặc hiệu, nhóm nghiên cứu đã tối ưu hóa và đưa ra quy trình cụ thể để phát hiện bệnh bằng cặp mồi AP3 (Sirikharin & ctv., 2014). Tuy nhiên, khi lượng *V.*

parahaemolyticus trong mẫu ở mức thấp (nhỏ hơn 10 ng plasmid pVA1), phương pháp AP3 có thể không phát hiện được bệnh, dẫn đến đưa ra kết quả âm tính giả, không chính xác và AP3 không phát hiện được chủng gây Hoại tử gan tụy cấp đột biến (mutant-AHPND).

Mai-Hoang & ctv. (2021) đã thiết lập phản ứng PCR sử dụng một cặp mồi duy nhất là GMIF1-2 có thể phát hiện đồng thời AHPND và mutant-AHPND. Cặp mồi này khuếch đại toàn bộ gen *toxA*, 12 nucleotides ở giữa hai gen và một phần gen *toxB*; do đó mồi có khả năng phát hiện cả gen *toxA* bị đột biến của chủng gây mutant-AHPND. Phản ứng PCR được thiết lập bởi cặp mồi này có độ nhạy cao hơn gấp bốn lần phương pháp AP3 đã công bố trước đó và có thể phát hiện chủng gây bệnh AHPND với thời gian kéo dài trong chu trình nhiệt với 5 giây (Hình 2). Phản ứng được thực hiện với thành phần và chu trình nhiệt như Bảng 2 với cặp mồi được thể hiện trong Bảng 5.

Phản ứng PCR này được thiết lập dựa trên hai tiêu chí tiết kiệm thời gian và chi phí. Ngoài ra, xác định các thông số tối ưu của phản ứng dựa trên sự kết hợp của các phần mềm Photoshop (xử lý hình ảnh), ImageJ (cung cấp các thông số về độ sáng của các vạch) và Graphpad Prism5 (thống kê về sự khác biệt có nghĩa của các vạch) đã cải thiện độ chính xác và khách quan hơn so



Hình 2. Kết quả cho thấy cặp mồi GMIF1-2 cho phản ứng PCR phát hiện đồng thời AHPND (vạch 366 bp) và mutant-AHPND (1429 bp). M: thang chuẩn 1 kb; (-): chứng âm; 1: chủng không gây AHPND; 2: chủng AHPND; 3: chủng mutant-AHPND (Mai-Hoang & ctv., 2021).

với phương pháp quan sát bằng mắt (Mai-Hoang & ctv., 2021).

2.2. Các biến thể của phương pháp PCR

2.2.1. Phương pháp nested PCR (AP4)

Tuy phương pháp PCR sử dụng cặp mồi AP3 có độ đặc hiệu 100%, nhưng đối với các mẫu có lượng mầm bệnh thấp cần phải trải qua bước tiền tăng sinh trong bốn giờ trước khi tách các tế bào vi khuẩn để chuẩn bị mẫu DNA cho xét nghiệm PCR. Để giải quyết vấn đề đó, Dangtip & ctv. (2015) đã phát triển phương pháp nested PCR được gọi là AP4 với cặp mồi ngoài khuếch đại toàn bộ vùng gen độc tố; cặp mồi trong khuếch đại một phần gen *toxA*, 12 nucleotides nằm giữa hai gen và một phần gen *toxB* dựa trên khuôn là sản phẩm tạo thành từ cặp mồi ngoài. Do đó, phương pháp AP4 có độ nhạy cao hơn 100 lần so với AP3 (Dangtip & ctv., 2015). Phương pháp

có thành phần và chu trình được thực hiện như Bảng 3 với các cặp mồi được thể hiện trong Bảng 5.

Phương pháp PCR với độ nhạy và độ đặc hiệu cao cùng với đó là thời gian tiến hành nhanh giúp phát hiện bệnh một cách nhanh chóng. Tuy nhiên, AP4 không thể phát hiện được mutant-AHPND, độ nhạy cao cũng là một mối nguy dẫn đến việc dương tính giả nếu phòng thí nghiệm không đảm bảo tiêu chuẩn. Ngoài ra, AP4 đòi hỏi hai bước khuếch đại dẫn đến tốn thời gian và không phù hợp cho công tác chẩn đoán lâu dài.

2.2.2. Phương pháp multiplex PCR

Năm 2018, phương pháp phát hiện PCR 5-plex mới đã được phát triển và thử nghiệm thành công khi kết hợp các đoạn mồi nhằm mục tiêu các gen *pirAvp*, *pirBvp*, *tlh*, *toxR* (hoặc *tetB*) và 16S rRNA. Thành phần và chu trình nhiệt của phương pháp được thực hiện như Bảng 4 với các cặp mồi được thể hiện trong Bảng 5.

Với phương pháp này, các chủng AHPND *V. parahaemolyticus* hoặc kháng tetracycline AHPND *V. parahaemolyticus* có thể được phát hiện trong một phản ứng PCR duy nhất. Việc nhanh chóng xác định các mầm bệnh tiềm ẩn là điều cần thiết để kiểm soát sự lây lan của bệnh. Chẩn đoán các gen mục tiêu thì phụ thuộc rất nhiều vào quá trình chiết tách axit nucleic. Nếu quá trình này có sai sót sẽ dẫn đến kết quả âm tính giả hay định lượng không chính xác. Để kiểm soát quá trình chiết tách, nhóm nghiên cứu đã sử dụng cặp mồi cho gen chứng nội để áp dụng vào xét nghiệm cùng với mẫu bệnh. Chứng nội được sử dụng là gen có biểu hiện bên trong tế bào như gen rRNA 16S. Sự hiện diện của đoạn mồi nhằm vào gen rRNA 16S cho phép chỉ ra phản ứng PCR âm tính giả vì gen luôn được khuếch đại trong phản ứng PCR, điều này làm tăng thêm độ tin cậy của kết quả (Devadas & ctv., 2019). Tuy nhiên, phương pháp multiplex PCR có nhiều cặp mồi sẽ dẫn đến các kết quả không đặc hiệu, quá trình tối ưu hóa phức tạp. Ngoài ra, vì hai gen *toxA* và *toxB* có vị trí cạnh nhau trên cùng một plasmid nên việc thiết kế các cặp mồi khác nhau để khuếch đại gen là không cần thiết.

2.2.3. Phương pháp real-time PCR

Ban đầu, chẩn đoán AHPND chỉ có thể được thực hiện thông qua kiểm tra mô học và xét nghiệm sinh học trong phòng thí nghiệm (MARD,

Bảng 3. Thành phần hóa chất và chu trình nhiệt của phương pháp AP4

Thành phần	Bước 1		Bước 2	
	Thể tích (μL)	Chu trình nhiệt	Thể tích (μL)	Chu trình nhiệt
10X PCR buffer	2,5	Tiền biến tính 94°C, 2 phút	2,5	Tiền biến tính 94°C, 2 phút
50 mM MgCl ₂	1,5	30 chu kỳ	1,5	25 chu kỳ
10 mM dNTPs	0,5	Biến tính 94°C, 30 giây	0,5	Biến tính 94°C, 20 giây
10 μM mỗi F1	0,5	Bắt cặp mỗi 55°C, 30 giây	0,375	Bắt cặp mỗi 55°C, 20 giây
10 μM mỗi R1	0,5	Kéo dài mỗi 72°C, 90 giây	0,375	Kéo dài mỗi 72°C, 20 giây
Taq DNA polymerase	0,3	Kéo dài cuối 72°C, 2 phút	0,3	Kéo dài cuối 72°C, 2 phút
Tổng cộng	25,0		25,0	

Nguồn: Dangtip & ctv. (2015).

2016). Sau đó, các phương pháp chẩn đoán phân tử dựa trên thử nghiệm phản ứng chuỗi polymerase thông thường nhắm vào các gen pirA và/hoặc pirB đã xuất hiện (Dangtip & ctv., 2015). Tuy nhiên, định lượng mầm bệnh AHPND ở động vật bị nhiễm bệnh là một trong những tiêu chí quan trọng nhất để theo dõi sự tiến triển của bệnh.

Số lượng vi khuẩn có thể được xác định thông qua đếm các đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU – colony forming unit), nhưng phương pháp này tốn nhiều thời gian và công sức. Phân tích chuỗi phản ứng polymerase định lượng (qPCR) theo thời gian thực đã trở thành một giải pháp thay thế hấp dẫn nhờ các ưu điểm về tốc độ, độ nhạy và độ đặc hiệu. Han & ctv. (2015c) đã thiết lập phương pháp Taqman qPCR để phát hiện gen toxA trên plasmid gây bệnh và hiện nay vẫn được sử dụng cho việc chẩn đoán AHPND. Phản ứng qPCR này sử dụng bộ kit Taqman Faster Universal PCR Master Mix của hãng Life Technologies. Mẫu DNA được thêm vào thành phần phản ứng chứa 0,3 μM mỗi đoạn mỗi và 0,1 μM đoạn mẫu dò Taqman để đạt thể tích cuối là 10 μL. Chu trình nhiệt của phản ứng qPCR gồm tiền biến tính ở 95°C trong 20 giây, lặp lại 40 chu kỳ với bước biến tính 95°C trong 3 giây và tiếp theo là 60°C trong 30 giây. Phân tích tín hiệu khuếch đại với hệ thống PCR StepOnePlus của hãng Life Technologies (Han & ctv., 2015c).

Cruz-Flores & ctv. (2019) đã phát triển một phản ứng multiplex-qPCR sử dụng SYBR Green để phát hiện pirA, pirB và hai gen chứng nội là gen 18S rRNA của tôm và gen 16S rRNA của vi khuẩn trong một phản ứng duy nhất. Các đoạn mỗi pirB khuếch đại đầu 3' của gen pirB cho phép phát hiện *Vibrio* spp. thể đột biến chứa pirA bị mất hoàn toàn và pirB bị mất một phần. Phản ứng cũng phát hiện các đột biến có chứa toàn bộ gen pirA và loại bỏ gen pirB. Vì cả hai gen độc tố đều cần thiết cho sự phát triển của bệnh, nên phản ứng này có thể phân biệt giữa các chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. gây AHPND ở tôm và các thể đột biến không gây bệnh. Ngoài ra, một phản ứng duplex-qPCR đã được thực hiện bằng cách thiết kế các đầu dò TaqMan cho các mỗi pirA và pirB. Độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán được so sánh giữa hai phương pháp SYBR Green và TaqMan. Cả hai loại phản ứng đều cho thấy độ nhạy tương tự nhau với giới hạn phát hiện là 10 bản sao đối với pirA và pirB, và không phản ứng nào cho thấy bất kỳ phản ứng chéo nào với các

Bảng 4. Thành phần hóa chất và chu trình nhiệt của phương pháp 5-plex PCR

Thành phần	Thể tích (μL)	Chu trình nhiệt	
5X PCR buffer	5,0	Tiền biến tính	94°C, 5 phút
25 mM MgCl_2	3,0		35 - 40 chu kỳ
10 mM dNTPs	1,0	Biến tính	94°C, 30 giây
2,5 μM các mồi F	0,25	Bắt cặp mồi	50-60°C, 30 giây
2,5 μM các mồi R	0,25	Kéo dài mồi	63 - 73°C, 50-60 giây
Taq DNA polymerase	0,2	Kéo dài cuối	72°C, 5 phút
Tổng cộng	20,0	Bảo quản	10°C

Nguồn: Devadas & ctv. (2019).

mầm bệnh vi khuẩn và virus đã biết khác ở tôm. Độ nhạy cao của cả hai phương pháp làm cho chúng phù hợp để phát hiện các bản sao thấp của gen *pirA* và *pirB* trong vi khuẩn *Vibrio* spp. gây ra AHPND cũng như để phát hiện các đột biến không gây bệnh. Do đó, các phương pháp real-time PCR với độ nhạy và độ đặc hiệu cao, giúp giảm thiểu đáng kể thời gian dùng để xét nghiệm so với các phương pháp PCR đơn mồi hay nested PCR (Cruz-Flores & ctv., 2019). Tuy nhiên, các phương pháp real-time PCR cũng đi kèm với những nhược điểm như cần các thiết bị đắt tiền, chi phí hóa chất cao. Bên cạnh đó, các phản ứng real-time PCR cũng không phát hiện được mutant-AHPND.

Phương pháp PCR hiện đang được xem như phương pháp chuẩn hiện nay trong công bố dịch AHPND. Vì thế, phương pháp PCR nhanh và chính xác sẽ là sự lựa chọn của các Chi cục Thú y và Thủy sản các tỉnh trong công tác công bố dịch để xử lý nhanh ao nuôi khi cần. Tuy nhiên, các phương pháp dựa trên gen hiện nay cần điều kiện phòng thí nghiệm phù hợp, kỹ thuật viên được đào tạo nên không thể sử dụng trực tiếp tại thực địa được.

3. Phát Hiện AHPND Dựa Trên Protein

3.1. Phương pháp ELISA

ELISA là một kỹ thuật sinh hóa được dùng trong miễn dịch học để có thể phát hiện sự có mặt của những kháng thể hay kháng nguyên trong mẫu phục vụ chẩn đoán bệnh. Nguyên lý của kỹ thuật ELISA dựa vào tính đặc hiệu của kháng nguyên với kháng thể và được thực hiện bằng những bước cơ bản sau: kháng nguyên hoặc kháng thể đã biết được gắn trên một giá thể rắn, sau đó cho mẫu có chứa kháng thể hoặc kháng nguyên cần tìm vào giếng. Bổ sung thêm kháng thể có gắn với enzyme. Bước cuối cùng thêm cơ chất, en-

zyme sẽ biến đổi cơ chất này và tạo tín hiệu màu có thể xác định được bằng máy đo huỳnh quang. Về cơ bản, ELISA được phân loại thành ELISA trực tiếp, ELISA gián tiếp và sandwich ELISA (Crowther, 1995). Một phương pháp ELISA gián tiếp (iELISA) đã được phát triển để phát hiện cặp độc tố ToxA/ToxB trong chẩn đoán AHPND. Phương pháp này cho thấy kháng thể kháng độc tố toxA và toxB có thể phát hiện cả hai loại độc tố ở 29/30 mẫu tôm đã được gây bệnh AHPND với ngưỡng phát hiện ở mức 0,8 ng độc tố/mL, trong khi đó phương pháp real-time PCR có thể phát hiện được gen độc tố ở 30/30 mẫu tôm. Phương pháp iELISA cũng không cho tín hiệu đối với tất cả mẫu tôm âm tính được thử nghiệm. Nghiên cứu này chỉ ra rằng iELISA là một phương pháp đáng tin cậy để phát hiện PirAvp và độc tố Pir-Bvp trong tôm nhiễm bệnh và sẽ là một công cụ hữu ích trong chẩn đoán AHPND và nghiên cứu vai trò của độc tố nhị phân trong cơ chế gây bệnh AHPND (Mai & ctv., 2020). Tương tự, thử nghiệm iELISA với kháng thể đa dòng kháng ToxB với ngưỡng phát hiện đạt ở mức 0,1 ng độc tố/mL cũng được công bố bởi Duong & ctv. (2021).

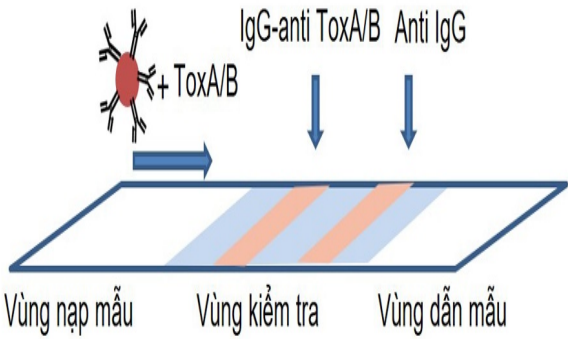
3.2. Phương pháp miễn dịch dòng chảy ngang (Lateral flow assay – LFA)

Bắt cập của các phương pháp trên đưa ra yêu cầu cần một phương pháp phù hợp hơn cho việc phát hiện chính xác, nhanh chóng, và thực hiện tại thực địa đối với bệnh hoại tử gan tụy cấp. Que thử miễn dịch hoạt động theo cơ chế thử nghiệm miễn dịch dòng chảy ngang (Lateral flow assay – LFA) cho thấy tiềm năng trong việc phát triển phương pháp phát hiện AHPND. Cấu trúc của một que thử miễn dịch bao gồm: vùng nạp mẫu, vùng cộng hợp, vùng kiểm tra, vùng dẫn mẫu (Hình 3). Vùng nạp mẫu là nơi mẫu thử được đưa vào que để sau đó được dẫn tuần tự

Bảng 5. Các phương pháp PCR khuếch đại toxA, toxB

Tên phương pháp	Cấp mỗi (5'-3')	Gen mục tiêu	Kích thước (bp)	Tác giả
AP3	AP3-F: ATGAGTAACAATATAAAAAACATGAAAC AP3-R: GTGGTAATAGATTGTACAGAA	PirAvp	333	Sirikharin & ctv., 2014
	Bước 1 AP4-F1(=AP3-F): ATGAGTAACAATATAAAAAACATGAAAC			
	AP4-R1: ACGATTTCGACGTTCCCCAA	PirAvp và một phần lớn PirBvp	1269	Dangtip & ctv., 2015
	Bước 2 AP4-F2: TTGAGAAATACGGGACGTGGG AP4-R2: GTTAGTCATGTGAGCACCTTC	PirAvp (209bp) PirBvp (9bp)		
Taqman qPCR	VpPirA_F: TTGGACTGTGGAACCAACG VpPirA_R: GCACCCCAATTGGTATTGAATG	PirAvp	135	Han & ctv., 2015c
	Probe: AGACAGCAAAACATACACCTATCATCCCGCA			
	toxR-F: AATCCATGGATTCCACGCGTTATTT toxR-R: CACCAATCTGACGGAACTGAGATTTC	ToxR	103	Han & ctv., 2015a
	tetB-F: TTGCGGGGAATTGGCCTATCAATT tetB-R: GTTGAGACGCAATCGAATTCCGGTAT	tetB	103	Han & ctv., 2015b
5-plex PCR	16S-rRNA-F: CCGGGTAGTCCACGCCGTAA 16S-rRNA-R: CGAATTAAACACATGCTCCA	16S-rRNA	168	Wei & ctv., 2014
	MV28-TLF: GTTCACACTCGGTGACAGCTTG MV28-TLR: AGTTTTCGGTAGGTTAAGTAC	tlh	248	Micky & ctv., 2014

qua các vùng khác của que nhờ lực mao dẫn của vùng dẫn mẫu. Vùng cộng hợp là nơi chứa các kháng thể và để phục vụ cho việc quan sát kết quả các kháng thể này thường được đánh dấu bằng các loại hạt như hạt keo vàng, hạt nhựa, hạt sắt,...; vùng cộng hợp cũng là nơi diễn ra phản ứng giữa kháng thể với kháng nguyên có trong mẫu, kháng nguyên sẽ được bắt giữ và tạo thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể đánh dấu. Phức hợp kháng nguyên-kháng thể đánh dấu sẽ được dẫn đến vùng kiểm tra, đây là nơi được cố định kháng thể đặc hiệu kháng nguyên. Tại đây kháng nguyên một lần nữa được bắt giữ và tạo thành phức hợp kháng thể-kháng nguyên-kháng thể đánh dấu, nhờ việc đánh dấu kháng thể bằng các vật liệu có thể quan sát trực tiếp nên kết quả của que thử miễn dịch được quan sát bằng mắt thường mà không cần thông qua các thiết bị đọc; vùng kiểm tra còn bao gồm một vạch đối chứng, nhằm đảm bảo que thử hoạt động một cách bình thường (Koczula & ctv., 2016).



Hình 3. Cấu trúc của que thử miễn dịch.

Ở phương pháp này, mẫu thử chứa kháng nguyên sẽ được kiểm tra bằng cách nhỏ trực tiếp vào vùng nạp mẫu của que thử và kết quả có thể quan sát trực tiếp chỉ sau 15 đến 20 phút vạch tín hiệu ở vùng kiểm tra. Với thao tác thực hiện đơn giản, que thử miễn dịch cho thấy sự tiện lợi của mình nên bất cứ ai cũng có thể tiến hành đánh giá mẫu thử. Với kích thước nhỏ gọn và quan sát kết quả trực quan, que thử có thể được sử dụng để phân tích mẫu thử ngay tại thực địa, đây là ưu điểm lớn nhất mà que thử mang lại trong phát hiện AHPND. Tuy nhiên, cho đến hiện nay vẫn chưa có sản phẩm que thử phát hiện AHPND được thương mại ở Việt Nam và trên thế giới.

Ở bệnh hoại tử gan tụy cấp, các nghiên cứu chỉ ra rằng, khi có sự hiện diện của hai độc tố ToxA và ToxB, tôm sẽ có các triệu chứng của AHPND

Bảng 5. Các phương pháp PCR khuếch đại toxA, toxB				
Tên phương pháp	Cặp mồi (5'-3')	Gen mục tiêu	Kích thước (bp)	Tác giả
5-plex PCR	PirAvp-F1: ACGGAGGCGGTCACAGAAGTA PirAvp-R1: CCAGCCGCCAGCCATAAAT	PirAvp	140	Devadas & ctv., 2019
	VpPirB-392F: TGATGAAGTGATGGGTGCTC VpPirB-392R: TGTAAGCGCCGTTAACTCA	PirBvp	392	Han & ctv., 2015a
	GMIF1-F: TTCTCAGCATTTGGACTGTCG GMIF2-R: GGGTAAATTCCGTCAAAGATG	toxA và toxB	366 (AHPND) 1429 (mutant-AHPND)	toxA và toxB
	Monoplex PCR			

và chết. Do đó, việc phát hiện hai độc tố ToxA và ToxB trong mẫu sẽ giúp phát hiện được tôm có nhiễm AHPND hay không, vì vậy hai độc tố ToxA và ToxB là kháng nguyên mục tiêu phát hiện trong phương pháp que thử miễn dịch. Hiện nay đã có các nghiên cứu gây đáp ứng miễn dịch và tạo thành công hai loại kháng thể đa dòng kháng ToxA và ToxB có độ đặc hiệu cao, không phản ứng chéo, không gây dương tính giả với các mẫu vi sinh vật thường gặp ở tôm nuôi. Kháng thể đa dòng có khả năng phát hiện nhiều chủng thu nhận từ các tỉnh khác nhau ở vùng Tây Nam Bộ và có ngưỡng phát hiện thấp (Duong & ctv., 2021; Nguyen-Phuoc & ctv., 2021). Từ đó, chúng tôi nghiên cứu và phát triển que thử phát hiện nhanh AHPND trên tôm đầu tiên ở Việt Nam, và que thử này có thể sử dụng ngay tại thực địa cho việc chẩn đoán nhanh bệnh này với độ đặc hiệu chẩn đoán 92,7%, độ nhạy chẩn đoán 95,7%, và giới hạn phát hiện đạt mức 15 ng/mL mỗi độc tố ToxA và ToxB (kết quả chưa công bố).

4. Phương pháp sử dụng cảm biến sinh học

Cảm biến sinh học mới được phát triển gần đây và được coi là công cụ tiềm năng để chẩn đoán bệnh. Cảm biến sinh học chẩn đoán định lượng bằng cách tạo ra tín hiệu tỷ lệ thuận với mầm bệnh, enzyme, tế bào hoặc độc tố được phân tích (Oluwaseun & ctv., 2018). Việc phát hiện bằng cảm biến sinh học có thể được dựa trên các phản ứng hóa học, các tín hiệu điện hoặc quang học được tạo ra thông qua sự tương tác của các thành phần protein hoặc axit nucleic. Việc phát hiện các protein liên quan đến bệnh đòi hỏi phải chính xác, nhạy và hiệu quả về mặt chi phí. Cảm biến sinh học gồm ba bộ phận chính: đầu thu sinh học có tác dụng phát hiện sự có mặt của các tác nhân sinh học cần phân tích, tác nhân cố định giúp gắn các đầu thu lên trên điện cực; bộ phận chuyển đổi tín hiệu giúp chuyển các biến đổi sinh học thành các tín hiệu có thể đo đạc được; bộ phận xử lý giúp đọc tín hiệu ra giúp chuyển các tín hiệu không điện thành các tín hiệu điện có thể xử lý. Một cảm biến miễn dịch điện hóa sử dụng graphene oxit cố định xanh methylene đã được sử dụng để phát hiện WSSV trong các mẫu tôm và cua (Natarajan & ctv., 2017). Cho đến hiện tại, chưa có bộ cảm biến sinh học nào được thiết lập để phát hiện AHPND. Cảm biến sinh học dựa trên DNA cho thấy đây là một công cụ đầy hứa hẹn trong việc chẩn đoán AHPND (Santos & ctv., 2020).

5. Kết Luận

Kể từ lần xuất hiện đầu tiên tại Trung Quốc năm 2009, bệnh Hoại tử gan tụy cấp đã lan nhanh khắp thế giới và gây ra thiệt hại về kinh tế vô cùng nặng nề. Các phương pháp chẩn đoán nhanh và sớm đang được tập trung nghiên cứu và phát triển tùy vào mục đích và đối tượng sử dụng. Phương pháp phát hiện dựa trên DNA (gen *tox*A và *tox*B) bao gồm multiplex PCR, nested PCR, real-time PCR và phương pháp ELISA đã được sử dụng để chẩn đoán AHPND. Ngoài ra, phương pháp monoplex dựa trên cặp mồi GMIF1-2 mới nhất hiện nay đã được chứng minh là phát hiện đồng thời AHPND và mutant-AHPND trên tôm. PCR được coi là chuẩn vàng, nhanh và chính xác, phù hợp cho các cơ quan địa phương trong công tác công bố dịch và xử lý cải tạo ao nuôi. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi thiết bị phức tạp như máy PCR và bộ điện di nên chỉ thích hợp thực hiện trong phòng thí nghiệm. Vì thế, phương pháp sử dụng que thử miễn dịch được phát triển để có thể chẩn đoán nhanh chóng ngay tại thực địa giúp nông dân chủ động hơn trong việc phòng tránh và điều trị kịp thời bệnh, góp phần hiệu quả vào sự phát triển kinh tế của hộ nông dân cũng như địa phương sở tại. Cuối cùng, phương pháp sử dụng cảm biến sinh học có nhiều ưu điểm so với các phương pháp truyền thống như tính chọn lọc cao, đáp ứng nhanh, đơn giản và chính xác mang đến nhiều tiềm năng trong chẩn đoán nhanh AHPND.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Crowther, J. R. (1995). *ELISA: theory and practice*. Retrieved July 8, 2021, from <https://doi.org/text>.
- Cruz-Flores, R., Mai, H. N., & Dhar, A. K. (2019). Multiplex SYBR green and duplex TaqMan real-time PCR assays for the detection of photorhabdus insect-related (Pir) toxin genes *pirA* and *pirB*. *Molecular and Cellular Probes* 43, 20-28.
- Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Mavichak, R., Proespraiwong, P., & Flegel, T. W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports* 2, 158-162.

- Devadas, S., Bhassu, S., Soo, T. C. C., Yusoff, F. M., & Shariff, M. (2019). A new 5-plex PCR detection method for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Aquaculture* 503, 373–380.
- Duong, N. D., Nguyen-Phuoc, K. H., Do, K. Y. T., Nguyen, N. T. T., Tran, T. L., & Tran-Van, H. (2021). Production of Polyclonal Antibody against the Recombinant PirBvp protein of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19(1), 1-8.
- Flegel, T. W., & Lo, C. F. (2014). Free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (Bangkok). GOAL (Global Aquaculture Alliance). (2019). *Global shrimp production review*. Retrieved July 8, 2021, from <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/goal-2019-global-shrimp-production-review/>.
- Han, J. E., Tang, K. F., Pantoja, C. R., White, B. L., & Lightner, D. V. (2015). qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture* 442, 12-15.
- Han, J. E., Tang, K. F., Tran, L. H., & Lightner, D. V. (2015a). Photorehabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 113(1), 33-40.
- Han, J. E., Mohny, L. L., Tang, K. F., Pantoja, C. R., & Lightner, D. V. (2015b). Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquaculture Reports* 2, 17-21.
- Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016) Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry* 60(1), 111-120.
- Lua, Đ. T., Khue, N. V., & Van, P. T. (2016). Non-*Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis on brackish shrimps. *Vietnam Journal of Agricultural Sciences* 14(5), 690-698.
- Mai, H. N., Cruz-Flores, R., & Dhar, A. K. (2020). Development of an indirect enzyme linked immunoassay (iELISA) using monoclonal antibodies against photorehabdus insect related toxins, PirAVp and PirBVp released from *Vibrio* spp. *Journal of Microbiological Methods* 176, 106002.
- Mai-Hoang, T. D., Tien, H. L., Chau-Hoang, H. M., Nguyen-Phuoc, K. H., Pham, H. Q., Tran, T. L., & Tran-Van, H. (2021). A novel PCR method for simultaneously detecting acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and mutant-AHPND in shrimp. *Aquaculture* 534, 736336.
- MARD (Ministry of Agriculture and Rural Development). (2016). Decision No. 04/2016/TT-BNNPTNT dated on May 10, 2016. Circular on prevention and control of aquatic animal diseases. Retrieved July 8, 2021, from <http://www.cucthuy.gov.vn/vanban/Pages/thong-tu-04.aspx>.
- MARD (Ministry of Agriculture and Rural Development). (2015). Report No. 5528/QĐ-BNN-TCTS dated on December 31, 2015. Master plan on brackish water shrimp farming in the Mekong Delta until 2020, vision to 2030. Retrieved August 1, 2021, from https://tongcucthuy.gov.vn/Portals/0/BAO%20CAO%20TOM%20NUOC%20LO_1.pdf.
- Micky, V., Nur Quraitu'Aini, T., Velnetti, L., Rowena, P., Christy, C., & Lesley Maurice, B. (2014). Development of a SYBR green based real-time polymerase chain reaction assay for specific detection and quantification of *Vibrio parahaemolyticus* from food and environmental samples. *International Food Research Journal* 21(3), 921-927.
- Natarajan, A., Devi, K. S., Raja, S., & Kumar, A. S. (2017). An elegant analysis of white spot syndrome virus using a graphene oxide/methylene blue based electrochemical immunosensor platform. *Scientific Reports* 7, 46169.
- Nguyen-Phuoc, K. H., Duong, N. D., Van Phan, T., Do, K. Y. T., Nguyen, N. T. T., Tran, T. L., & Tran-Van, H. (2021). Generation and evaluation of polyclonal antibodies specific for ToxA from *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Molecular Biology Research Communications* 10(1), 23-32.
- Oluwaseun, A. C., Phazang, P., & Sarin, N. B. (2018). Biosensors: a fast-growing technology for pathogen detection in agriculture and food sector. In Rinken, T., & Kivirans, K. (Eds.). *Biosensing technologies for the detection of pathogens-a prospective way for rapid analysis* (1st ed.). London, UK: IntechOpen Limited.
- Phisaisaiya, K., Charoensapsri, W., Taengphu, S., Dong, H. T., Sangsuriya, P., Nguyen, G. T. T., Pham, H. Q., Amparyup, P., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., Sithigorngul, P., & Senapin, S. (2017). A Natural *Vibrio parahaemolyticus* δ pirAVp pirBVp+ mutant kills shrimp but produces neither PirVp toxins nor acute hepatopancreatic necrosis disease lesions. *Applied and Environmental Microbiology* 83(16), e00680-17.
- Santos, H. M., Tsai, C. Y., Maquiling, K., Tayo, L. L., Mariatulqabiah, A. R., Lee, C. W., & Chuang, K. P. (2020). Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): a review. *Aquaculture international: Journal of the European Aquaculture Society* 28, 169-185.
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S., Flegel, T. W., Mavichak, R., & Proespraiwong, P. (2014). *A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria*. Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.
- VASEP (Vietnam Association of Seafood Exporters and Producers). (2019). *Shrimp industry overview*. Retrieved June 14, 2021, from <http://vasep.com.vn/san-pham-xuat-khau/tom/tong-quan-nganh-tom>.

- VASEP (Vietnam Association of Seafood Exporters and Producers). (2018). *Vietnam shrimp exports: 20 years in retrospect*. Retrived June 14, 2021, from <http://vasep.com.vn/san-pham-xuat-khau/tom/xuat-nhap-khau/xuat-khau-tom-viet-nam-20-nam-nhin-lai-6287.html>.
- Wei, S., Zhao, H., Xian, Y., Hussain, M. A., & Wu, X. (2014). Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 79(2), 115-118.
- Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y., (2017). Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Scientific Reports* 7, 42177.