HỌC VIỆN NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

TRƯƠNG THỊ MỸ HẠNH

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐỘNG VẬT THỦY SINH CHỦ YẾU MANG VIRUS GÂY BỆNH ĐỐM TRẮNG Ở TÔM NUÔI NƯỚC LỢ TẠI MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP-2018

HỌC VIỆN NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

TRƯƠNG THỊ MỸ HẠNH

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐỘNG VẬT THỦY SINH CHỦ YẾU MANG VIRUS GÂY BỆNH ĐỐM TRẮNG Ở TÔM NUÔI NƯỚC LỢ TẠI MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC

Chuyên ngành : Dịch tễ học thú y

Mã số : 9 64 01 08

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. Phan Thị Vân

2. PGS.TS. Huỳnh Thị Mỹ Lệ

HÀ NỘI - 2018

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận án là trung thực, khách quan và chưa từng để bảo vệ ở bất kỳ học vị nào.

Tôi xin cam đoan rằng mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện luận án đã được cám ơn, các thông tin trích dẫn trong luận án này đều được chỉ rõ nguồn gốc.

Hà Nội, ngày 30 tháng 11 năm 2017

Tác giả luận án

LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn Ban Giám đốc Học Viện Nông Nghiệp Việt Nam, Ban Quản lý đào tạo đã tạo điều kiện và hướng dẫn tôi các vấn đề có liên quan đến học tập, nghiên cứu ngay từ những ngày đầu nhập học, cũng như trong quá trình học tập, thực hiện đề tài và hoàn thành luận án.

Qua đây, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới tập thể cán bộ và Lãnh đạo Trung tâm Quan trắc Môi trường và Bệnh thủy sản miền Bắc, Viện nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I và các thầy cô giáo thuộc bộ môn Vi sinh vật truyền nhiễm, khoa Thú Y, Học Viện Nông Nghiệp Việt Nam.

Xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến hai giáo viên hướng dẫn, người đã luôn động viên, khích lệ đúng lúc và có những góp ý phản biện khoa học sâu sắc giúp tôi hoàn thành luận án này.

Cuối cùng, tôi xin giành lời cảm ơn đặc biệt tới gia đình đã luôn ở bên cạnh, động viên và lo lắng mọi công việc gia đình để tôi yên tâm nghiên cứu học tập và hoàn thành luận án.

Một lần nữa xin được cảm ơn tất cả vì sự ủng hộ cho bản luận án này!

Hà Nội, ngày 30 tháng 11 năm 2017

Tác giả luận án

Trương Thị Mỹ Hạnh

MỤC LỤC

Lời cam đoan i
Lời cảm ơn ii
Mục lục iii
Danh mục chữ viết tắt vi
Danh mục bảng vii
Danh mục hình ix
Trích yếu luận án xi
Phần 1. Mở đầu 1
1.1. Tính cấp thiết của đề tài 1
1.2. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài 2
1.3. Phạm vi nghiên cứu 3
1.4. Những đóng góp mới của đề tài 3
1.5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài 3
Phần 2. Tổng quan tài liệu 5
2.1. Nghề nuôi tôm nước lợ ở việt nam 5
2.1.1. Một số đặc điểm chung của nghề nuôi tôm trên cả nước 5
2.1.2. Hiện trạng nuôi tôm tại Quảng Ninh, Nam Định và Nghệ An 9
2.2. Bệnh đốm trắng ở tôm nuôi nước lợ 11
2.2.1. Tác nhân gây bệnh 12
2.2.2. Dấu hiệu bệnh lý 16
2.2.3. Phương thức lan truyền bệnh đốm trắng 18
2.2.4. Yếu tố nguy cơ dẫn đến tôm nhiễm bệnh do virus đốm trắng 19
2.3. Sinh vật mang virus đốm trắng gây bệnh cho tôm nuôi 20
2.3.1. Nghiên cứu sinh vật mang WSSV gây bệnh đốm trắng cho tôm trên thế giới 21
2.3.2. Nghiên cứu sinh vật mang WSSV gây bệnh đốm trắng cho tôm ở Việt Nam 32
Phần 3. Phương pháp nghiên cứu 35
3.1. Địa điểm nghiên cứu 35
3.2. Thời gian nghiên cứu 35
3.3. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu 35
3.3.1. Đối tượng nghiên cứu 35
3.3.2. Vật liệu nghiên cứu 35

3.3. Nội dung nghiên cứu 38
3.4. Phương pháp nghiên cứu 38
3.4.1 Phương pháp điều tra 40
3.4.2 Phương pháp thu, bảo quản và định danh loài động vật thủy sinh 40
3.4.3 Phương pháp phân tích mẫu động vật thủy sinh bằng sinh học phân tử 41
3.4.4 Phương pháp tách chiết ADN 41
3.4.5. Phương pháp tách chiết ARN 43
3.4.6. Tổng hợp cDNA 44
3.4.7. Khuyếch đại ADN 45
3.4.8. Chu trình nhiệt của PCR 45
3.4.9. Tinh sạch ADN 45
3.4.10. Định lượng nồng độ WSSV bằng kỹ thuật Real time PCR 46
3.5. Gây nhiễm xác định khả năng mang WSSV của động vật thủy sinh 46
3.5.1. Gây nhiễm WSSV lên động vật thủy sinh bằng hình thức tiêm 47
3.5.2. Gây nhiễm WSSV lên động vật thủy sinh bằng hình thức ngâm 48
3.6. Gây nhiễm xác định khả năng lan truyền wssv từ động vật thủy sinh sang tct trong cùng môi trường nuôi 48
3.7. Phân tích và xử lý số liệu 50
Phần 4. Kết quả và thảo luận 52
4.1. Điều tra hiện trạng vùng nuôi, đánh giá mối nguy liên quan đến tôm nuôi bị bệnh đốm trắng tại Quảng Ninh, Nam Định và Nghệ An 52
4.1.1. Thông tin chung về hiện trạng quản lý và bệnh đốm trắng ở tôm nuôi tại vùng nghiên cứu 53
4.1.2. Xác định yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh đốm trắng ở tôm chân trắng nuôi tại vùng nghiên cứu 66
4.2. Nghiên cứu xác định động vật thủy sinh chủ yếu mang WSSV tại Nghệ An, Nam Định và Quảng Ninh 76
4.2.1. Động vật thuỷ sinh nhiễm WSSV thu được trong điều kiện tự nhiên 76
4.2.2. Động vật thủy sinh chủ yếu mang WSSV trong điều kiện thí nghiệm 82
4.3 Khả năng lan truyền WSSV từ động vật thủy sinh sang tôm thẻ chân trắng trong cùng môi trường nuôi 93
4.3.1 Khả năng lây truyền WSSV từ cáy đỏ sang tôm chân trắng 93

4.3.2 Khả năng lan truyền WSSV từ tôm càng sang tôm chân trắng..... 97
4.3.3 Khả năng lan truyền WSSV từ tôm gai sang tôm chân trắng 103
Phần 5. Kết luận và kiến nghị 108
5.1. Kết luận.....108
5.2. Đề xuất.....109
Những công trình của tác giả công bố có liên quan đến luận án 110
Tài liệu tham khảo.....111
PHỤ LỤC 128

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Từ viết đầy đủ
AHPND	Acute hepatopancreatic necrosis disease
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GXCC	Giáp xác chân chèo
HHMBV	Hypodermal and haematopoietic necrosis baculovirus
IHHVN	Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus
ISH	In situ hybridization
NNE	Nòng nọc ếch
PCR	Polymerase Chain Reaction
PmNOB II	Penaeus monodon non-occluded baculovirus II
SEMBV	Systemic ectodermal and mesodermal baculoviral
TEM	Transmission electron microscopy
TCT	Tôm chân trắng
WPD	White patch disease
WSBV	White spot baculovirus
WSD	White spot disease
WSSV	White spot syndrome virus
WSVI	White spot viral infection
XK	Xuất khẩu
YHV	Yellow head virus

DANH MỤC BẢNG

Số bảng	Tên bảng	Trang
2.1.	Kim ngạch xuất khẩu mặt hàng thủy sản qua các năm 2014-2016	7
2.2.	Dịch bệnh đốm trắng trên tôm nuôi nước lợ qua các năm 2014-2016	8
2.3.	Tên gọi bệnh đốm trắng ở tôm do virus gây ra theo thời gian	13
2.4.	Danh sách các loài tôm mang virus đốm trắng	22
2.5.	Danh sách các loài cua mang virus đốm trắng	25
2.6.	Danh sách các loài thực vật nhiễm virus đốm trắng	28
2.7.	Danh sách các loài động vật phù du mang virus đốm trắng	29
2.8.	Danh sách các loài côn trùng mang WSSV trong tự nhiên	31
3.1.	Các loài sinh vật thu được ở vùng nghiên cứu	36
3.2.	Cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu	37
3.3.	Thành phần phản ứng để khuyếch đại ADN	37
3.4.	Danh mục bộ kít sử dụng trong nghiên cứu	38
3.5.	Thành phần của phản ứng tổng hợp cDNA	44
3.6.	Thành phần của phản ứng tổng hợp cDNA	44
3.7.	Chu trình nhiệt của phản ứng tổng hợp cDNA	44
3.8.	Chu trình nhiệt các giai đoạn trong quá trình PCR	45
3.9.	Thành phần phản ứng Real time PCR	46
3.10.	Yếu tố phân tích mô tả và xác định nguy cơ tiềm năng	51
4.1.	Diện tích nuôi tôm của hộ nuôi ở Nghệ An, Nam Định và Quảng Ninh	54
4.2.	Mực nước duy trì trong ao nuôi tôm	57
4.3.	Số lần cấp nước vào ao nuôi trong quá trình nuôi	58
4.4.	Thời điểm thả giống tôm trong năm	58
4.5.	Nguồn tôm giống thả nuôi ở các hộ tại vùng nghiên cứu	63
4.6.	Mật độ thả tôm giống ở các hộ nuôi	64
4.7.	Cỡ tôm giống khi thả	65
4.8.	Hoạt động giảm sốc cho tôm giống khi thả	66
4.9.	Mối quan hệ giữa hoạt động lấy nước vào ao nuôi tôm với bệnh đốm trắng xuất hiện trong ao nuôi	67

4.10. Quan hệ giữa diện tích nuôi tôm và mực nước ao nuôi với bệnh đốm trắng ở tôm xuất hiện trong ao nuôi..... 69
4.11. Quan hệ giữa vùng nuôi xuất hiện bệnh WSSV và hoạt động kiểm tra môi trường thường xuyên với bệnh đốm trắng ở tôm..... 70
4.12. Mối quan hệ giữa cỡ tôm giống, hoạt động thả tôm và xuất hiện sinh vật khác trong ao nuôi tôm với tôm bị bệnh đốm trắng..... 71
4.13. Thành phần các loài sinh vật xuất hiện trong vùng nuôi tôm. 73
4.14. Kết quả phân tích virus ở động vật thủy sinh 76
4.15. Tên loài động vật thuộc nhóm giáp xác thu tại Nam Định 78
4.16. Nồng độ WSSV sử dụng trong thí nghiệm gây nhiễm..... 84
4.17. Kết quả phân tích virus sau khi gây nhiễm nhân tạo WSSV lên cáy đỏ 87
4.18. Kết quả xác định thời gian virus nhân lên trong tế bào động vật thủy sinh trong thí nghiệm gây nhiễm..... 90
4.19. Kết quả phân tích WSSV ở cáy đỏ và tôm thẻ trong thí nghiệm xác định khả năng lan truyền WSSV..... 94
4.20. Kết quả phân tích WSSV ở tôm càng và tôm thẻ trong thí nghiệm xác định khả năng lan truyền WSSV..... 98
4.21. Kết quả phân tích WSSV ở tôm gai và tôm thẻ trong thí nghiệm xác định khả năng lan truyền WSSV..... 103

DANH MỤC HÌNH

Số hình	Tên hình	Trang
2.1.	Cấu trúc của WSSV dưới kính hiển vi điện tử	14
2.2.	Dấu hiệu bệnh lý của tôm nhiễm bệnh do WSSV gây ra	17
2.3.	Nguyên nhân gây bệnh đốm trắng ở tôm nuôi	20
3.1.	Sơ đồ các bước triển khai của nghiên cứu	39
3.2.	Sơ đồ phân tích mẫu động vật thủy sinh sử dụng kỹ thuật PCR	42
3.3.	Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định khả năng WSSV nhân lên trong tế bào động vật thủy sinh bằng phương pháp tiêm	47
3.4.	Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định khả năng WSSV nhân lên trong tế bào động vật thủy sinh bằng phương pháp ngâm	49
3.5.	Sơ đồ thí nghiệm xác định khả năng lan truyền WSSV từ cáy đỏ sang tôm chân trắng	49
3.6.	Sơ đồ thí nghiệm xác định khả năng lan truyền WSSV từ tôm càng, tôm gai sang tôm chân trắng	50
4.1.	Tỷ lệ (%) hộ nuôi lấy nước vào ao nuôi tôm qua ao lắng, qua lưới lọc	55
4.2.	Hóa chất được sử dụng xử lý nước nuôi tôm	56
4.3.	Tỷ lệ (%) hộ nuôi có tôm nhiễm virus đốm trắng trong quá trình nuôi	60
4.4.	Các yếu tố xác định là nguyên nhân gây tôm nuôi nhiễm WSD	61
4.5.	Giải pháp áp dụng khi tôm nuôi nhiễm bệnh do WSSV	62
4.6.	Tôm càng nhiễm WSSV thu trong điều kiện tự nhiên	78
4.7.	Hình thái tôm càng nhiễm WSSV thu được ở ao nuôi tôm thẻ tại Nam Định	79
4.8.	Kết quả định danh WSSV bằng sinh học phân tử	80
4.9.	Đường chuẩn định lượng nồng độ WSSV (copy/mL)	84
4.10.	WSSV đã được xác định ở các mẫu sau khi gây nhiễm theo thời gian	88
4.11.	Động vật thủy sinh chủ yếu được gây nhiễm bằng phương pháp ngâm	92
4.12.	WSSV đã được xác định ở các mẫu sau khi tôm được nuôi chung trong cùng môi trường nước với cáy đỏ mang WSSV theo thời gian	94
4.13.	Bố trí thí nghiệm xác định khả năng lan truyền WSSV từ cáy đỏ sang tôm thẻ trong cùng môi trường.	95

4.14. Kết quả định danh cáy đỏ bằng sinh học phân tử 96
4.15. Bố trí thí nghiệm xác định khả năng lan truyền WSSV từ tôm càng sang tôm chân trắng trong cùng môi trường.....99
4.16. Biểu hiện bệnh lý của tôm thẻ nhiễm bệnh đốm trắng từ tôm càng 99
4.17. Kết quả định danh tôm càng bằng sinh học phân tử 102
4.18. WSSV đã được xác định ở các mẫu sau khi tôm được nuôi chung trong cùng môi trường nước với tôm gai mang WSSV theo thời gian 104
4.19. Kết quả định danh tôm gai bằng sinh học phân tử.....107

TRÍCH YẾU LUẬN ÁN

Tên tác giả:

Tên luận án: Nghiên cứu xác định động vật thủy sinh chủ yếu mang virus gây bệnh đốm trắng ở tôm nuôi nước lợ tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam

Chuyên ngành: Dịch tễ học thú y **Mã số**: 9 64 01 08

Cơ sở đào tạo: Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Mục tiêu của nghiên cứu

Xác định được một số loài động vật thủy sinh chủ yếu có khả năng mang và lan truyền virus đốm trắng gây bệnh cho tôm nuôi nước lợ tại miền Bắc

Phương pháp nghiên cứu

Sử dụng phương pháp điều tra lấy thông tin qua bộ câu hỏi. Song song công việc điều tra là thu mẫu động vật thủy sinh xuất hiện ở vùng nuôi tôm. Mẫu thu được phân tích bằng phương pháp PCR xác định mẫu nhiễm virus đốm trắng.

Bố trí thí nghiệm gây nhiễm nhân tạo virus đốm trắng lên động vật thủy sinh chủ yếu theo (Wu *et al*., 2005; Kim *et al*., 2014; Chen *et al*., 2004). Xác định khả năng nhân lên của virus đốm trắng trong tế bào vật chủ gây nhiễm bằng RT-PCR. Bố trí thí nghiệm xác định khả năng lan truyền virus đốm trắng từ động vật thủy sinh sang tôm chân trắng trong cùng điều kiện môi trường nuôi.

Kết quả chính và kết luận

Trong ao nuôi thường xuất hiện các động vật thủy sinh trong đó bắt gặp chủ yếu là 16 loài thuộc 4 nhóm (giáp xác, cá, động vật phù du, nhuyễn thể). Bệnh đốm trắng ở tôm xuất hiện nhiều nhất vào tháng 3 và tháng 9 hàng năm với tỷ lệ lần lượt là 21,9 và 25,4%. Nghiên cứu của luận án đã xác định một số yếu tố như quản lý nguồn nước, con giống, kỹ thuật thả giống, ao nuôi tôm nằm trong vùng có bệnh hay sự xuất hiện giáp xác trong ao nuôi có nguy cơ cao cho tôm nhiễm bệnh đốm trắng.

Luận án đã xác định được 3 loài giáp xác có khả năng mang virus đốm trắng, đó là tôm càng (*Macrobrachium nipponense*) mang virus ở điều kiện tự nhiên và 2 loài bao gồm cáy đỏ (*Uca arcuata)* và tôm gai (*Exopalaemon carinicauda*) mang virus đốm trắng trong điều kiện thí nghiệm. Trong tự nhiên tôm càng nhiễm WSSV với tỷ lệ nhiễm 7,14% . Trong điều kiện thí nghiệm, cáy đỏ và tôm gai nhiễm virus tương ứng sau 4,5 và 5 ngày sau khi gây nhiễm nhân tạo.

Tôm càng, cáy đỏ và tôm gai là những vector lây truyền và gây bệnh đốm trắng cho tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*).

Kết quả nghiên cứu của luận án bổ sung 3 loài mới (cáy đỏ, tôm càng và tôm gai) vào danh sách sinh vật mang và lan truyền mầm bệnh đốm trắng cho tôm nuôi ở Việt Nam. Trong đó, bổ sung 1 loài mới là cáy đỏ vào danh sách loài sinh vật mang mầm bệnh đốm trắng cho tôm nuôi trên thế giới.

Kết quả này là những bằng chứng khoa học quan trọng để thiết lập một mô hình can thiệp nhằm giảm nguy cơ bùng phát bệnh đốm trắng, nâng cao hiệu quả của ngành tôm ở 3 vùng nghiên cứu nói riêng và ở Việt Nam nói chung.

THESIS ABSTRACT

PhD candidate:

Thesis title: Identification of aquatic animals carring white spot syndrome virus in brackish water shrimp culture in Nothern provinces of Vietnam

Major: Veterinary Epidemiology **Code:** 9 64 01 08

Educational organization: Vietnam National University of Agriculture (VNUA)

Research objective

To investigate and determinate of aquatic animals potentially carring and transmitting white spot syndrome virus to brackish water shrimp cultured in the Northern provinces.

Materials and Methods

The data were collected by using interview method through the questionaire set. Totheger with data collection, sampling aquatic animals in shrimp farming areas (supply water cannal, settle pond and intensive shrimp pond) was carried out. Samples were analysed to identify whether sample are positive with WSSV by PCR.

Experimental infection with WSSV in white leg shrimp was designed in accordance to (Wu *et al*., 2005; Kim *et al*., 2014; Chen *et al*., 2004). The multification of the virus in experimental host was identified RT-PCR. Determination of WSSV transmittion from experimental infected host to cultured shrimp was implemeted by cohabitation method.

Main findings and conclusions

Aquatic animals have been found pupolar in shrimp pond which are mainly 16 species belonged to 4 groups (crustaceans, fish, zooplankton and mollusk). Outbreak of WSSV mainly occured in March and September with 21.9 and 25.4% respectively. Water source management, postlarvae quality, stocking postlarvae technique, the pond in endemic area and crustacean availability are identified as risk factors associated with white spot disease.

This study has identified 3 crustacean species carrying WSSV 1 species (*M. nipponense*) in natural and 2 species (*U. arcuata* and *E. carinicauda*) in experimental conditions. In natural condition, *M. nipponense* was infected with WSSV by 7,14%. In experimental condition, WSSV started multifying in *Uca arcuata* and *Exopalaemon carinicauda* at 4,5 and 5 days post challenges.

This study also identifed that WSSV infected animals of *U. arcuata, E. carinicauda* and *M. nipponense* are able to transmitt the virus to farmed shrimp in the cohabitation.

This study has given additional new carriers and vectors of white spot syndrome virus not only in Vietnam but also in the global. Among, 3 animals are new record in Vietnam and 1 animal (*Uca arcuata*) is a new record in the world.

These findings are significant scientific evidences to set up an intervention model to reduce risks of white spot disease outbreak, improve efficiency of the shrimp industry in 3 study regions and Vietnam as well.

Key words: WSSV, *Uca arcuata, Macrobrachium nipponense* and *Exopalaemon carinicauda*

PHẦN 1. MỞ ĐẦU

1.1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Trong nhiều năm gần đây nuôi tôm đã trở thành một ngành kinh tế quan trọng, có giá trị kim ngạch xuất khẩu cao nhất trong đối tượng thủy sản của Việt Nam. Diện tích nuôi tôm nước lợ trên cả nước tăng từ 680 nghìn hecta năm 2015 lên đến 683 nghìn hecta tính đến tháng 10 năm 2016, trong đó diện tích nuôi tôm sú đạt 594 nghìn hecta, diện tích nuôi tôm chân trắng (TCT) đạt 83 nghìn hecta. Sản lượng đạt được tương ứng với diện tích nuôi tôm nước lợ năm 2016 đạt khoảng 657 nghìn tấn (trong đó sản lượng nuôi TCT chiếm khoảng 60%) mang lại kim ngạch xuất khẩu khoảng 3,1 tỷ USD (VASEP, 2016).

Mặc dù đã đạt được được những thành tựu lớn về sản lượng nuôi và kim ngạch xuất khẩu, song nghề nuôi tôm ở Việt Nam đã và đang gặp những thách thức lớn trong đó phải kể đến vấn đề dịch bệnh, đặc biệt bệnh đốm trắng do tác nhân virus đốm trắng (white spot syndrome virus - WSSV) gây ra ở tôm. Năm 2016, chỉ tính riêng bệnh do WSSV gây ra đã ảnh hưởng đến diện tích 1.861,43 hecta nuôi tôm sú và 1.782,48 hecta nuôi TCT. Diện tích nuôi thâm canh và bán thâm canh bị bệnh là 2.636,2 hecta; diện tích nuôi quảng canh, quảng canh cải tiến bị bệnh là 856,82 hecta; còn lại là các hình thức nuôi tôm khác bị bệnh là 150,89 hecta (Cục Thú y, 2016). Tôm thường mắc bệnh ở giai đoạn nuôi từ 10-120 ngày sau thả, bệnh có khả năng lan nhanh, do đó khó lường hết được các thiệt hại mỗi khi có dịch bệnh xảy ra.

Ngay từ những năm đầu xuất hiện dịch bệnh do WSSV ở tôm, các nghiên cứu đã chỉ ra WSSV có khả năng lây truyền cho tôm nuôi theo chiều dọc từ tôm bố mẹ sang tôm ấu trùng và theo chiều ngang như qua môi trường nước bị nhiễm virus, qua vật mang mầm bệnh và qua việc tôm khỏe ăn tôm bệnh có nhiễm WSSV. Hiện nay, việc kiểm soát WSSV lây truyền theo chiều dọc đã được thực hiện tốt ở các trang trại sản xuất tôm giống trên thế giới cũng như ở Việt Nam thông qua kiểm dịch tôm bố mẹ trước khi cho sinh sản. Tôm bị bệnh do WSSV xuất hiện ở hộ nuôi chủ yếu do nhiễm bệnh theo chiều ngang, trong đó sinh vật

mang WSSV đã được đánh giá có vai trò ảnh hưởng quan trọng. Trên thế giới, nghiên cứu chỉ ra các sinh vật mang WSSV đã được quan tâm và đến nay xác định được hơn 150 loài sinh vật mang WSSV, trong khi đó ở Việt Nam vấn đề này chưa được quan tâm và nghiên cứu còn mang tính gián đoạn. Nghiên cứu được công bố đầu tiên vào năm 1999 với 3 loài tôm (tôm he - *Penaeus indicus*, tôm rảo - *Etapenaeus ensis*, tôm bạc - *Metapenaeus lysianassa*) ở rừng ngập mặn tỉnh Cà Mau nhiễm WSSV (Hao *et al.,* 1999). Vấn đề này được đề cập đến vào năm 2010 khi xác định thêm một loài *Macrobrachium rosenbergii* (tôm càng xanh nước ngọt) nhiễm WSSV (Võ Văn Tuấn và cs., 2010). Sau 7 năm kể từ năm 2010, một công bố cho biết đã xác định giun cát (*Perinereis* sp), là thức ăn tươi sống cho tôm bố mẹ ở trang trại sản xuất tôm giống tại Nha Trang, Khánh Hòa nhiễm WSSV (32,07%) (Phan Thị Vân và cs., 2017). Như vậy, việc nghiên cứu tìm ra thêm các loài sinh vật mang WSSV là rất quan trọng và đặc biệt cần thiết ở Việt Nam. Với những hiểu biết và ý thức được tầm quan trọng của các sinh vật mang WSSV, chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài: Nghiên cứu xác định động vật thủy sinh chủ yếu mang virus gây bệnh đốm trắng ở tôm nuôi nước lợ tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam.

1.2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI

1.2.1 Mục tiêu chung

Xác định được một số loài động vật thủy sinh chủ yếu có khả năng mang và lan truyền virus đốm trắng gây bệnh cho tôm nuôi nước lợ tại một số tỉnh miền Bắc.

1.2.2 Mục tiêu cụ thể

Xác định yếu tố nguy cơ gây bệnh đốm trắng do virus cho tôm nuôi nước lợ tại vùng nghiên cứu.

Xác định loài động vật thủy sinh chủ yếu mang virus đốm trắng và có khả năng lan truyền bệnh cho tôm theo phương thức lây truyền ngang.

1.3. PHẠM VI NGHIÊN CỨU

Động vật thủy sinh chủ yếu ở ao nuôi tôm chân trắng thâm canh, ao lắng và quanh khu vực nguồn cấp nước ở Hải Hòa - Quảng Ninh, Giao Thủy - Nam Định và Quỳnh Liên - Nghệ An. Thời gian thực hiện từ tháng 6 năm 2015 đến tháng 10 năm 2017.

1.4. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA ĐỀ TÀI

Luận án đã góp phần cung cấp các thông tin quan trọng về vùng nuôi tôm nước lợ tại Nghệ An, Quảng Ninh và Nam Định, đặc biệt đã chỉ ra 8 yếu tố nguy cơ có liên quan đến nguyên nhân tôm nhiễm bệnh đốm trắng ở vùng nuôi.

Kết quả nghiên cứu của luận án đã thống kê, xác định được 23 loài động vật thủy sinh trong đó có 16 loài xuất hiện nhiều với số lượng lớn hơn được xác định là loài động vật thủy sinh chủ yếu, chúng bao gồm tôm rảo, tôm càng, tôm gai, cáy đỏ, nòng nọc ếch, ốc đinh, cá bống và 9 loài động vật phù du.

Kết quả nghiên cứu của luận án đã ghi nhận được 3 loài động vật thủy sinh mang virus và có khả năng truyền bệnh đốm trắng cho tôm nuôi. Trong đó một loài tôm càng (*Macrobranchium nipponense*) mang virus đốm trắng thu được ở tự nhiên và hai loài còn lại là cáy đỏ (*Uca arcuata)* và tôm gai (*Exopalaemon carinicauda*) mang virus đốm trắng trong điều kiện thí nghiệm.

Luận án đã bổ sung vào thành phần sinh vật mang mầm bệnh đốm trắng tại Việt Nam và cả trên thế giới, trong đó 3 loài giáp xác lần đầu tiên được công bố ở Việt Nam và bổ sung thêm được 1 loài mới là cáy đỏ vào danh sách các sinh vật mang WSSV cho thế giới. Kết quả là cơ sở khoa học góp phần đề xuất giải pháp hạn chế rủi ro bệnh dịch, nâng cao hiệu quả cho nghề nuôi tôm nước lợ ở 3 vùng nghiên cứu nói riêng và ở Việt Nam nói chung.

1.5. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

Luận án đã phân tích, đánh giá thực trạng vùng nuôi, từ đó chỉ rõ một số yếu tố nguy cơ, nguyên nhân gây ra tôm nhiễm bệnh đốm trắng. Xác định một số loài động vật thủy sinh chủ yếu có khả năng mang và lan truyền WSSV gây bệnh

cho tôm nuôi tại Nghệ An, Quảng Ninh và Nam Định, đây được xác định là nguồn mang mầm bệnh do WSSV tiềm ẩn, mối nguy sinh học ở vùng nuôi.

Kết quả đạt được của luận án giúp cho hộ nuôi thuộc vùng nghiên cứu biết rõ yếu tố nguy cơ gây bệnh đốm trắng ở tôm nuôi, từ đó nghiêm túc thực hiện các kỹ thuật trong quá trình triển khai vụ nuôi nhằm giảm thiểu các yếu tố nguy cơ. Đồng thời kết quả giúp người nuôi nhận diện một số động vật đã có khả năng mang và lan truyền WSSV cho tôm nuôi, từ đó có biện pháp ngăn chặn sự xuất hiện của chúng ở khu vực nuôi tôm, đặc biệt trong ao nuôi.

Kết quả nghiên cứu của luận án là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm đưa ra các đề xuất giải pháp sinh học mang tính chất thân thiện với môi trường và có hiệu quả ngăn ngừa/loại bỏ sự có mặt của các sinh vật mang mầm bệnh do WSSV trong quá trình nuôi tôm nước lợ, loại bỏ mắt xích lan truyền bệnh đốm trắng. Từ đó góp phần khống chế hiệu quả bệnh đốm trắng cho nghề nuôi tôm công nghiệp, nâng cao đời sống người nuôi, nâng cao kim ngạch xuất khẩu thủy sản nói chung và sản phẩm tôm nuôi nói riêng.

PHẦN 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. NGHỀ NUÔI TÔM NƯỚC LỢ Ở VIỆT NAM

2.1.1. Một số đặc điểm chung của nghề nuôi tôm trên cả nước

Ngay từ những năm 1990, nghề nuôi tôm nước lợ đã xuất hiện và sớm trở thành ngành mũi nhọn cung cấp mặt hàng xuất khẩu chủ lực hàng đầu quan trọng của ngành thủy sản Việt Nam, trong đó tôm Sú và TCT là hai đối tượng nuôi xuất khẩu chính. Năm 1997 phần lớn diện tích nuôi tôm trên cả nước đã chuyển đổi sang nuôi tôm Sú thay thế loài tôm nuôi tôm bản địa (*Penaeus merguiensis* - tôm bạc thẻ và *P. indicus* - tôm he Ấn Độ) (Hai *et al.,* 2015). Đến năm 2000, TCT được đưa vào Việt Nam, song chúng bị hạn chế nuôi bởi nhiều quan điểm cho rằng phát triển nuôi TCT có nhiều nguy cơ tiềm ẩn dịch bệnh Taura cho tôm Sú . Tuy nhiên, với lợi thế thời gian nuôi ngắn, mật độ thả nuôi cao, ít bệnh, năng suất nuôi cao, đứng trước tình hình này Bộ Nông Nghiệp & Phát triển nông thôn có Chỉ thị số 228/CT-BNN-NTTS ngày 25/01/2008 về việc cho phép phát triển nuôi TCT nhằm đa dạng đối tượng nuôi trồng và xuất khẩu thủy sản (Như Văn Cẩn, 2016). Vì vậy, cơ cấu nuôi tôm ở Việt Nam có sự thay đổi rất lớn, tôm Sú có xu hướng giảm xuống và thay thế vào đó là đối tượng TCT có xu hướng tăng lên cả diện tích, sản lượng và giá trị kim ngạch xuất khẩu. Sự chuyển đổi cũng được nhận thấy trong quy mô sản xuất con giống theo thời gian, năm 2012, số lượng các cơ sở sản xuất giống giảm xuống còn 1.715, nhưng sản lượng tăng lên đến 67 tỷ tôm giống/hậu ấu trùng, trong đó TCT là 30 tỷ. Năm 2013, sản lượng TCT tăng lên 47 tỷ con, hơn gấp đôi tôm sú là 21 tỷ (Hai *et al.,* 2015). Điều đó cho thấy trong những năm gần đây nhu cầu con giống thả nuôi TCT cao hơn rất nhiều so với tôm Sú, có thể nói giai đoạn 2010 - 2014 là giai đoạn cách mạng của TCT.

Loại hình nuôi tôm nước lợ ở Việt Nam hiện nay có thể được phân chia thành một số loại chính bao gồm nuôi quảng canh: với diện tích nuôi lớn từ 3 - 10ha, mật độ thả nuôi thấp chỉ từ 2-5 con/m^2, ít đầu tư về thức ăn, kỹ thuật. Nuôi quảng canh cải tiến: tôm được thả với mật độ cao hơn với 6-8 con/m^2 trong diện

tích tương tự 3-10ha, song có đầu tư về thức ăn công nghiệp, kỹ thuật và chất lượng nước được quản lý một cách cẩn thận hơn so với mô hình nuôi quảng canh). Mô hình nuôi bán thâm canh, thâm canh là mô hình nuôi ở ao sử dụng diện tích khá nhỏ (0,2-0,5 ha) và đáy ao có thể được lót bạt đối với nuôi TCT. Mật độ thả giống của TCT (30-60con/m^2 đối với bán thâm canh và 60-150 con/m^2 đối với thâm canh) cao hơn tôm sú (8-14 con/m^2-bán thâm canh và 20-35 con/m^2-thâm canh). Ở mô hình nuôi thâm canh có hạn chế thay nước và thường sử dụng chế phẩm sinh học/men vi sinh trong quản lý nước và quản lý sức khỏe (Hai *et al.,* 2015; Nguyễn Quang Trí, 2013). Ngoài 4 mô hình chính nêu trên còn có 1 số mô hình nuôi khác như nuôi tôm kết hợp rừng ngập mặn, đây là mô hình đã được Naturland chứng nhận là tôm hữu cơ, với các kỹ thuật đơn giản, đầu tư vốn thấp, thân thiện với môi trường, thu hoạch thường xuyên, ít bệnh và ít rủi ro kinh tế, mô hình nuôi kết hợp lúa - tôm, cá - tôm, mô hình nuôi xen vụ (1 vụ cá, 1 vụ tôm), đây là những mô hình nuôi phổ biến được áp dụng ở khu vực miền Nam hơn so với miền Bắc. Mỗi loài tôm có ưu thế riêng tương ứng với mỗi loại mô hình nuôi, hiện nay mô hình nuôi quảng canh, quảng canh cải tiến hay nuôi kết hợp rừng ngập mặn, lúa-cá thường được ứng dụng để nuôi tôm Sú trong khi đó mô hình nuôi bán thâm canh và thâm canh chủ yếu ứng dụng nuôi TCT. Gần đây, ở Việt Nam có thêm mô hình siêu thâm canh trong nhà, mật độ thả nuôi cao từ 300-450 con/m^2 (0,5-2,0g/con), nuôi trong 3-5 tháng cho sản lượng 28.000-68.000 kg/ha/vụ với mức tăng trưởng 1,5g/tuần, hệ số sống sót của tôm 51-91%. Đây là mô hình đầu tư rất cao mang lại hiệu quả về an toàn sinh học, hệ sinh thái thân thiện, sản xuất tôm có chất lượng cao, hạn chế mầm bệnh. Tuy nhiên hiện nay mô hình nuôi này ở Việt Nam còn rất ít, chỉ một số ít doanh nghiệp đầu tư xây dựng (Hai *et al.,* 2015).

Nhìn chung, tổng diện tích nuôi tôm nước lợ tăng lên hàng năm không lớn. Tính riêng năm 2016, diện tích nuôi tôm Sú đạt 600.399 ha và nuôi TCT khoảng 94.246 ha chiếm lần lượt khoảng 86,4% và 15,6% tổng diện tích nuôi tôm nước lợ. Theo báo cáo tổng hợp của Tổng cục Thuỷ sản, 100% TCT (94.246 ha) được nuôi theo hình thức thâm canh, bán thâm canh còn tôm sú chủ yếu được

nuôi theo hình thức quảng canh cải tiến và nuôi sinh thái. Trong tổng số 600.399 ha nuôi tôm sú năm 2016, diện tích nuôi thâm canh, bán thâm canh là 35.000 ha (chiếm 5,8% tổng diện tích nuôi), còn lại là các mô hình nuôi quảng canh/quảng canh cải tiến (342.933 ha), tôm - lúa (174.311 ha) và tôm - rừng sinh thái (47.917 ha). Sản lượng đạt được tương ứng với diện tích nuôi tôm nước lợ năm 2016 đạt khoảng 657 nghìn tấn (trong đó sản lượng nuôi TCT chiếm khoảng 60%) mang lại kim ngạch xuất khẩu khoảng 3,1 tỷ USD (VASEP, 2016). Đối với kim ngạch xuất khẩu thủy sản nói chung thì có xu hướng giảm từ năm 2014 đến 2016 từ 7,9 triệu USD (2014) xuống còn 7 triệu USD (2016) với các mặt hàng chủ lực bao gồm tôm, cá tra, cá ngừ, mực và bạch tuộc, trong đó tôm vẫn là mặt hàng đứng đầu về kim ngạch xuất khẩu của nhóm hàng thủy sản (Bảng 2.1). Trong số bốn mặt hàng xuất khẩu thì tôm luôn là mặt hàng có sản lượng xuất khẩu lớn nhất, XK tôm Việt Nam trong tháng 9/2016 đạt 318,3triệu USD; tăng 4,4% so với tháng 9/2015. Lũy kế 9 tháng đầu năm nay, XK tôm đạt 2,2 tỷ USD; tăng 5,6% so với cùng kỳ năm ngoái. XK sang tốp 5 thị trường chính vẫn tăng trưởng khả quan trừ Nhật Bản giảm 4,2%. XK sang Trung Quốc tăng tốt nhất 30,3%; XK sang Mỹ, EU, Hàn Quốc tăng lần lượt 15,2%; 6,9% và 12,3% (Tổng cục Thống kê, 2016).

Bảng 2.1. Kim ngạch xuất khẩu mặt hàng thủy sản qua các năm 2014-2016

Sản phẩm	Kim ngạch xuất khẩu theo thời gian (tỷ USD)		
	2014	**2015**	**2016**
Tôm	4,0	2,59	3,1
Cá Tra	1,8	1,34	1,6
Cá Ngừ	0,5	0,48	0,5
Mực, bạch tuôc	0,5	0,39	0,42
Tổng	**7,84**	**6,7**	**7,0**

Nguồn: Tổng cục Thống kê (2016)

Mặc dù diện tích và sản lượng nuôi tôm nước lợ nói chung, đặc biệt TCT nói riêng, có xu hướng tăng hàng năm, song cũng như các quốc gia sản xuất tôm trong khu vực và thế giới, ngành nuôi tôm công nghiệp nước ta đang phải đối mặt với các vấn đề về dịch bệnh truyền nhiễm. Bệnh truyền nhiễm gây ra trên tôm nuôi nước lợ ở nước ta được xác định do hai tác nhân chính là virus và vi khuẩn. Theo báo cáo của Cục Thú y, năm 2016 tổng diện tích nuôi tôm nước lợ bị thiệt hại là 66.140,79 ha, trong đó tổng diện tích thiệt hại do bệnh là 10.662,26 ha. Nhận định, một số loại mầm bệnh (như bệnh hoại tử gan tụy cấp, đốm trắng, hội chứng còi) tiếp tục lưu hành ở mức độ cao. Trong đó chỉ tính riêng WSD ở tôm, năm 2016 bệnh đã xảy ra trên diện rộng, trải dài theo chiều dài đất nước từ Quảng Ninh đến Cà Mau với 25 tỉnh thành phố trong cả nước, tại 274 xã, 82 huyện (Bảng 2.2). Số tỉnh và số xã có dịch bệnh công bố năm 2016 đã tăng hơn so với 2 năm trước (2014-2015) trong khi đó số huyện vẫn duy trì ở mức cao với 82 huyện (Bảng 2.2). Trong khi các biện pháp kiểm soát còn nhiều hạn chế, hệ thống thú y thủy sản ở các địa phương còn rất nhiều tồn tại, bất cập, do đó bệnh sẽ có nguy cơ cao tăng mạnh trong năm tới (Cục Thú y, 2016).

Bảng 2.2. Dịch bệnh đốm trắng trên tôm nuôi nước lợ qua các năm 2014-2016

Các thông số theo dõi	Năm theo dõi		
	2014	**2015**	**2016**
Số tỉnh có dịch	23	23	25
Số huyện có dịch	76	82	82
Số xã có dịch	260	252	274
Tổng diện tích bị bệnh (nghìn ha)	**23.87**	**5.34**	**3.64**

Nguồn: Cục Thú y (2016)

Như vậy, qua nhiều thập kỷ phát triển, nghề nuôi tôm nước lợ đã trở thành hoạt động ngày càng quan trọng và đóng vai trò chính trong nền kinh tế xã hội của khu vực ven biển Việt Nam. Bên cạnh duy trì diện tích nuôi lớn cho mô hình các hệ thống nuôi quảng canh, quảng canh cải tiến, hệ thống nuôi trồng kết hợp

rừng ngập mặn và các hệ thống luân canh tôm/lúa thì nghề nuôi vẫn tiếp tục mở rộng diện tích mô hình nuôi thâm canh. Quy mô, hình thức nuôi đã mở rộng, con giống ngày càng chất lượng, tuy nhiên vấn đề cản trở sự phát triển ảnh hưởng năng suất sau thu hoạch là dịch bệnh, trong đó có WSD. Sau hơn 20 năm kể từ 1993 công bố sự lưu hành của WSD ở tôm nước lợ tại Việt Nam thì đến nay bệnh vẫn xuất hiện và gây thiệt hại hàng năm, ảnh hưởng đáng kể đến sản lượng, kim ngạch xuất khẩu mặt hàng tôm nước lợ, hơn nữa ảnh hưởng trực tiếp đến thu nhập đời sống của người nuôi. Do đó rất cần có các nghiên cứu xác định mối nguy sinh học tiềm ẩn thông qua việc xác định loài sinh vật mang WSSV và có khả năng lan truyền bệnh sang tôm sú, TCT. Từ đó có biện pháp phòng chống, ngăn ngừa loại bỏ hữu hiệu mắt xích lan truyền WSD bằng phương pháp mang tính thân thiện với môi trường.

2.1.2. Hiện trạng nuôi tôm tại Quảng Ninh, Nam Định và Nghệ An

Quảng Ninh, Nam Định và Nghệ An là 3 trong số 5 tỉnh có sản lượng tôm lớn nhất miền Bắc, trong đó tập trung chủ yếu tại Hải Hòa (Quảng Ninh), Giao Thủy (Nam Định) và Quỳnh Lưu (Nghệ An) (Thảo Linh, 2014).

Đối với Quảng Ninh, là tỉnh có bờ biển dài 250 km với nhiều vũng, vịnh kín gió, nguồn lợi thủy sản phong phú, đa dạng, Quảng Ninh có ngành thủy sản phát triển; các nghề nuôi cá lồng bè, nhuyễn thể, trai ngọc… và nhất là nghề nuôi tôm phát triển khá mạnh, với hai đối tượng chính tôm sú và TCT. Năm 2013, diện tích nuôi tôm nước lợ tại đây đạt 9.327 ha, lớn nhất miền Bắc; trong đó tôm sú 6.227 ha, TCT 3.100 ha. Tổng sản lượng tôm nước lợ 7.900 tấn, cũng lớn nhất miền Bắc; trong đó tôm sú 1.300 tấn, TCT 6.600 tấn (Thảo Linh, 2014). Đến nay, Quảng Ninh là một trong những tỉnh đi đầu trong cả nước về nuôi TCT công nghiệp, diện tích nuôi tôm nước lợ toàn tỉnh đến nay đã đạt 9.840 ha, trong đó nuôi tôm Sú đạt 6.563 ha (chiếm 67%) chủ yếu tại các địa phương Quảng Yên, Tiên Yên; TCT đạt 3.277 ha (chiếm 33%) chủ yếu tại Móng Cái, Đầm Hà. Sản lượng tôm nước lợ nuôi ước đạt 10.223 tấn trong đó sản lượng tôm Sú 1.500 tấn (chiếm 15%), sản lượng TCT 8.723 tấn (chiếm 85%). Năng suất tôm

nước lợ với tôm Sú nuôi trung bình là 0,3 tấn/ha, TCT trung bình 2,7 tấn/ha. Trước đây tôm nước lợ tại Quảng Ninh được nuôi theo hình thức ao đầm. Từ năm 2015, đã có một số cơ sở phát triển mô hình nuôi tôm thâm canh trong nhà kính làm tăng đáng kể năng suất, hiệu quả nuôi. Về phương thức nuôi với tôm Sú chủ yếu nuôi theo phương thức quảng canh, quảng canh cải tiến, với TCT phương thức nuôi chủ yếu là bán thâm canh, thâm canh. Theo phê duyệt Quy hoạch phát triển Thủy sản Quảng Ninh đến năm 2020, tầm nhìn đến năm 2030 trong đó phát triển vùng nuôi tôm tập trung ở các địa phương với diện tích nuôi tôm duy trì khoảng 9.400 ha, sản lượng nuôi tôm đến năm 2020 đạt 16.450 tấn và đến năm 2030 đạt 27.590 tấn (Chu Văn Trí, 2017).

Đối với Nam Định, năm 2013 với diện tích 3.672 ha, Nam Định đứng thứ ba về diện tích nuôi tôm nước lợ ở miền Bắc, sản lượng 3.900 tấn. Diện tích nuôi tôm sú 3.045 ha, giảm so năm 2012, diện tích nuôi TCT tăng đột biến, toàn tỉnh hơn 582 ha, tăng 197% so năm 2012. Nhiều hộ nuôi thâm canh 2-3 vụ, năng suất 15 - 20 tấn/ha/năm (Thảo Linh, 2014). Năm 2016 toàn tỉnh đã có đến 728 ha nuôi thâm canh và bán thâm canh tôm chân trắng, trong đó huyện Giao Thủy có diện nuôi tôm chân trắng là 397 ha, tăng 96 ha so với năm 2015, trong khi huyện có chủ trương ổn định diện tích nuôi là 200 ha. Diện tích nuôi tôm chân trắng mới tăng thêm đều do các hộ dân chuyển đổi từ diện tích làm muối sang. Hiện nay theo thống kê của các cơ quan chức năng, TCT nuôi thâm canh, bán thâm canh chiếm 99% tổng diện tích nuôi và chỉ có 1% nuôi TCT quảng canh. Trong khi đó, nuôi tôm sú thâm canh, bán thâm canh chỉ chiếm khoảng 2%, còn lại 98% là nuôi quảng canh cải tiến (Thanh Hoa, 2016).

Đối với Nghệ An, so với Quảng Ninh và Nam Định thì Nghệ An có diện tích nuôi ít hơn (2.190 ha), trong đó tích nuôi tôm sú 100 ha chiếm 5%, TCT 2.090 ha chiếm 95%. Về sản lượng, tổng sản lượng ước đạt 6.500 tấn (tôm sú 50 tấn, TCT 6.450 tấn), bằng 93% kế hoạch và bằng 133% so cùng kỳ năm 2013 và là tỉnh có sản lượng lớn thứ 5 trong miền Bắc (Thảo Linh, 2014) . Năm 2016, toàn tỉnh có 22.500 ha nuôi trồng thủy sản, trong đó 20.000 ha nuôi cá nước ngọt,

2.500 ha nuôi mặn lợ (trong đó có 1.750 ha nuôi tôm thâm canh và bán thâm canh). Tổng sản lượng thủy sản năm 2015 đạt 145.000 tấn, tăng gấp 2 lần so với năm 2006. Tốc độ tăng giá trị sản xuất của ngành thủy sản giai đoạn 2011 – 2015 đạt bình quân 10 – 11%/năm (Trần Hữu Tiến, 2016).

2.2. BỆNH ĐỐM TRẮNG Ở TÔM NUÔI NƯỚC LỢ

WSD là bệnh truyền nhiễm ở tôm nuôi nước lợ, tác nhân gây bệnh là WSSV. Bệnh được phát hiện lần đầu tiên tại Đông Nam Á. Tổn thất về kinh tế do WSD gây ra là không nhỏ, tổng cộng ít nhất 8 tỷ đô la Mỹ kể từ năm 1992 (The World Bank, 2014)

WSD ở tôm nuôi nước lợ được báo cáo đầu tiên ở Bắc Đài Loan năm 1992 (Chou Hsin-Yiu *et al.,* 1995), tiếp đến WSSV mở rộng phạm vi ảnh hưởng đến Nhật Bản, Hàn Quốc năm 1993 (Nakano *et al.,* 1998, Park *et al.,* 1998), Malaysia và Ấn Độ năm 1994 (Karunasaga *et al.,* 1997; Lo *et al.,* 1996a), Indonesia năm 1995 (Huang *et al.,* 1995) và tại Philippin năm 1999 - một đất nước nằm cách xa các nước về mặt địa lý đã xảy ra dịch bệnh vùng Đông và Đông Nam Á (Magbanua *et al.,* 2000). Không chỉ xuất hiện ở châu Á, bệnh còn được phát hiện tại Taxes, Bắc Mỹ vào tháng 11 năm 1995 (Lightner, 1996), phía Nam Carolina năm 1996 (Lightner and Redman, 1998). Tháng 1 năm 1999, WSSV lần đầu tiên xuất hiện ở Panama thuộc Bắc Mỹ và sau đó chỉ trong 2 tháng bệnh đã lan rộng sang Honduras và Guatemala thuộc Nam Mỹ. Giữa cuối năm 1999, WSSV là nguyên nhân chính gây thiệt hại ảnh hưởng đến cơ sở nuôi hàng đầu thế giới tại Ecuador. Xuất khẩu tôm ở Ecuador trong 2 năm tiếp theo (2000-2001) đã giảm xuống gần 70% nguyên nhân do WSSV (Lightner, 2003). Năm 2000-2001, WSSV đã được công bố xuất hiện ở Tây Ban Nha và Úc (Stentiford and Lightner, 2011). Gần đây nhất, dịch bệnh do WSSV gây ra ở tôm xuất hiện tại một số trang trại nuôi tôm thuộc Quelimane, Mozambique vào tháng 09 năm 2011. Tám tháng sau, tháng 05 năm 2012 bùng phát dịch WSD ở Madagascar tại các trang trại phía Bắc của Morondava (The World Bank, 2014).

Ở Việt Nam, WSSV lần đầu tiên gây ra tình trạng tôm nuôi chết hàng loạt ở Bà Rịa, Vũng Tàu (1993), Phú Yên, Khánh Hòa (1994), và các tỉnh ở Đồng Bằng Sông Cửu Long (1993-1994) (Nguyễn Văn Hảo, 2004; Đỗ Thị Hòa, 2002; Nguyễn Việt Thắng và cs., 1996). Nhiều đợt dịch bệnh đã gây thiệt hại nặng nề cho người nuôi, điển hình nhất là vào năm 2011, tôm Sú bị bệnh đốm trắng chết hàng loạt trên diện tích hơn 20.854 ha ở đồng bằng sông Cửu Long. Một số địa phương trong đó có Cà Mau, có tới hơn 80% diện tích bị nhiễm WSSV với hơn 20.854 ha bị thiệt hại (Nguyễn Văn Hảo, 2004). Chỉ tính 10 tháng đầu năm 2014, dịch bệnh đốm trắng đã xảy ra tại 260 xã, 76 huyện thuộc 23 tỉnh/thành phố trực thuộc Trung ương với tổng diện tích thiệt hại là 21.117 ha (chiếm 3,13% tổng diện tích thả nuôi của cả nước). Đáng lưu ý là TCT bị thiệt hại lớn hơn tôm sú với diện tích thiệt hại là 12.083 ha (chiếm 57,22% tổng diện tích bị WSD) (Cục Thú y, 2014). Đến năm 2015 WSD đã xảy ra trên diện rộng, trải dài theo chiều dài đất nước từ Quảng Ninh đến Cà Mau với 23 tỉnh thành phố trong cả nước, tại 252 xã, 82 huyện thuộc với tổng diện tích nuôi tôm bị WSD là 5.237 ha (Cục Thú y, 2015), WSSV tiếp tục nhân rộng ra phạm vi ảnh hưởng với 25 tỉnh thành tại 275 xã thuộc 82 huyện vào năm 2016 (Cục Thú y, 2016).

Bệnh do WSSV gây ra ở tôm nuôi có tên gọi khác nhau theo thời gian, mặc dù có thay đổi về cách gọi tên của bệnh nhưng dấu hiệu bệnh lý tương tự nhau, đến nay phổ biến sử dụng tên gọi White spot syndrome virus (WSSV) - hội chứng virus đốm trắng, chi tiết tên gọi theo thời gian được chỉ ra ở Bảng 2.3.

2.2.1. Tác nhân gây bệnh

Năm 1995, dựa vào hình thái học, kích thước phân tử và thành phần nucleic acid, WSSV được đề xuất xếp vào phân họ *Nudibaculovirinae,* họ *Baculoviridae,* với tên chính thức là PmNOBII, giống Baculovirus (Wongteerasupaya *et al.*, 1996). Đến năm 2001, khi hệ gen của WSSV gồm khoảng 300 kb được giải mã và kết quả phân tích chỉ ra rằng bộ gen của WSSV bao gồm khoảng 181 vùng mã đọc mở (Open Reading Frames, ORFs), trong đó chỉ một vài ORFs có trình tự giống với trình tự các gen virus đã biết trước đây

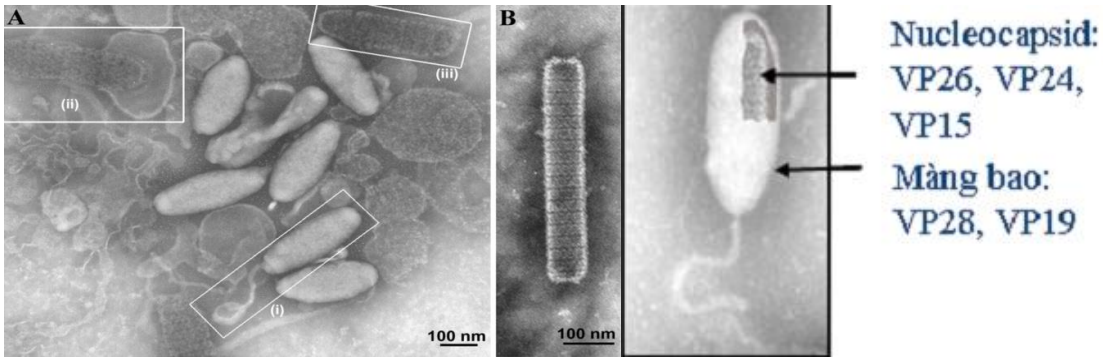
(Van Hulten *et al.,* 2001). Phần lớn các ORFs mã hóa cho các protein không giống với các protein đã biết, vì vậy WSSV hiện nay được xếp vào họ mới có tên *Nirmaviridae,* giống *Whispovirus* (Yi *et al.,* 2004).

Bảng 2.3. Tên gọi bệnh đốm trắng ở tôm do virus gây ra theo thời gian

TT	Tên gọi		Địa dư	Nguồn
	Tên tiếng Anh	Tên tiếng Việt		
1	Hypodermal and haematopoietic necrosis baculovirus (HHMBV)	Virus Baculo gây hoại tử cơ quan tạo máu và cơ quan dưới da	Trung Quốc	(Cai *et al.,* 1995)
2	White patch disease (WPD)	Bệnh đốm trắng (đốm lớn)	Thái Lan	(Chanratchakool *et al.,* 1995)
3	Systemic ectodermal and mesodermal baculoviral (SEMBV)	Bệnh virus Baculo nhiễm cơ quan ngoại và trung bì	Thái Lan	(Wongteerasupaya *et al.,* 1995)
4	Rod-shaped virus of *Penaeus japonicus* (RV-PJ)	Virus dạng hình que của *Penaeus japonicus*	Nhật Bản	(Inouye *et al.,* 1996)
5	Penaeus monodon non-occluded baculovirus II (PmNOB II)	Virus Baculo II trên Tôm sú	Thái Lan	(Wongteerasupaya *et al.,* 1996)
6	White spot baculovirus (WSBV)	Virus đốm trắng baculo	Đài Loan	(Stephanie Durand *et al.,* 1996)
7	White spot syndrome baculovirus (WSSB)	Hội chứng đốm trắng virus Baculo	Thái Lan	(Lo *et al.,* 1996a)
8	Yellow head disease-like virus	Virus giống virus đầu vàng	Đài Loan	(Lu *et al.,* 1997)
9	White spot viral infection (WSVI)	Lây nhiễm virus đốm trắng	Thái Lan	(Flegel, 1997)
10	White spot syndrome associated baculovirus (WSBV)	Hội chứng đốm trắng liên quan đến virus baculo	Đài Loan	(Chou *et al.,* 1998)
11	Penaeus monodon non-occluded baculovirus III (PmNOB III)	Virus Baculo III trên Tôm sú	Trung Quốc	(Hongtao *et al.,* 1999)
12	Penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV)	Virus DNA dạng hình roi	Nhật Bản	(Venegas1 *et al.,* 1999)
13	White spot syndrome virus (WSSV)	Hội chứng virus đốm trắng	Đài Loan	(Rajendran *et al.,* 1999a)

2.2.1.1. Cấu trúc của WSSV

WSSV được tạo thành bởi ít nhất 58 protein cấu trúc, một vài trong số này đã được nghiên cứu cụ thể và là cơ sở để xây dựng hình ảnh toàn diện về cấu trúc chi tiết của WSSV (Huang, 2002; Z. Li *et al.,* 2007). Thể WSSV có vỏ bao bọc, nhìn ngoài giống hình trụ/elip. Một thể virus hoàn chỉnh có kích thước 275-335nm x 116-138nm, trong khi một capsid có kích thước 246-296nm x 75-93nm, lớp vỏ dày khoảng 7-9nm. WSSV có phần phụ ở cuối với hình dạng như cái đuôi (Zhu *et al*, 2007). Nucleocapsid trần có dạng hình que, kích thước khoảng 330-350nm x 58-67nm. Nucleocapsid được cấu thành từ các phân mảnh (thường khoảng 14-19 phân mảnh), chúng được xếp vuông góc với nhau theo trục thẳng đứng và tạo thành 2 hàng song song với nhau.



Hình 2.1. Cấu trúc của WSSV dưới kính hiển vi điện tử

Nguồn: Leu *et al* (2005)

A: Cấu trúc của một thể WSSV đầy đủ với phần phụ giống đuôi (mũi tên), B: Cấu trúc của một nucleocapsid hình trụ, C: Mô hình cấu trúc các lớp của một thể WSSV bao gồm: lớp vỏ ngoài, lớp vỏ capsid, lõi nucleocapsid và những protein cấu tạo chính

Cấu trúc vỏ của WSSV bao gồm ít nhất 35 loại protein khác nhau, trong số đó đã xác định được 4 protein cấu trúc chính bao gồm VP28 (28 kDa), VP26 (26 kDa), VP24 (24 kDa) và VP19 (19 kDa) (Van Hulten *et al.,* 2000; Tang *et al.,* 2007). Hai protein VP26 và VP24 liên kết với lớp nucleocapsid, còn lại protein VP28 và VP19 liên kết với lớp vỏ và là hai protein cấu trúc chủ yếu, chiếm 60% các protein vỏ, đồng thời VP28 và VP26 được biết đến có đóng vai trò quan trọng trong việc giúp virus xâm nhập vào tế bào (Chazal and Gerlier, 2003). VP28 được mã hóa bởi gene wsv421, là một protein vỏ đóng vai trò quan

trọng trong những bước đầu tiên của quá trình nhiễm WSSV vào tôm, các nghiên cứu đã giả định rằng VP28 có thể góp phần quan trọng trong nhận biết các thụ thể bề mặt tế bào vật chủ do một vị trí glycosyl có tiềm năng. Tuy nhiên điều này chưa được chứng minh, các nghiên cứu về vai trò của VP28 trong quá trình xâm nhập của virus vào tế bào vật chủ sử dụng kháng thể kháng VP28 cho thấy protein này liên quan đến sự xâm nhập mang tính hệ thống của WSSV (Van Hulten *et al.,* 2001). Sự tương tác của VP28 với protein màng của tế bào máu ở tôm đã được chứng minh, có ít nhất 3 protein màng có thể tương tác với protein VP28 tái tổ hợp và một trong số đó là protein Rab7 của tôm (Sritunyalucksana *et al.,* 2006). VP26 được mã hóa bởi gene wsv311, có liên kết với nucleocapsid và có dạng khung đọc mở (ORF), VP26 có khả năng gắn với actin hoặc các protein liên kết với actin. Các nghiên cứu gần đây cho thấy cả VP28 và VP26 đều tạo thành các cấu trúc trimer gắn trong vỏ của virus và có thể có chức năng quan trọng trong việc tương tác khi xâm nhập giữa màng vỏ virus và các thụ thể tế bào vật chủ.

2.2.1.2. Hệ gen của WSSV

Genome của WSSV là sợi ADN kép, dạng vòng có kích thước khoảng 300kb. Mẫu WSSV phân lập ở Trung Quốc, Thái Lan và Đài Loan có kích thước khác nhau lần lượt tương ứng 305 kb, 297 kb và 307 kb (Lu *et al.,* 1994). Tổng hàm lượng C+G trong genome của WSSV chiếm khoảng 41%, hai loại nucleotide này phân bố rải rác trong genome của virus (Van Hulten *et al.,* 2001; Yang *et al.,* 2001). Hầu hết trình tự genome của WSSV là tương đồng và có khoảng 3% genome chứa các trình tự lặp lại, những trình tự lặp lại này được xếp vào 9 vùng tương đồng, phân bố trong khắp genome và chủ yếu tập trung ở vùng đa gen. Mặc dù cấu trúc của các vùng tương đồng của WSSV là tương tự như vùng tương đồng của các baculovirus nhưng chức năng của các vùng này ở WSSV vẫn chưa được xác nhận. Tuy nhiên trong thí nghiệm *in vitro* có ít nhất một loại protein của WSSV là sản phẩm của gen sớm có khả năng bám vào các vùng tương đồng này (Zhu *et al.,* 2007)

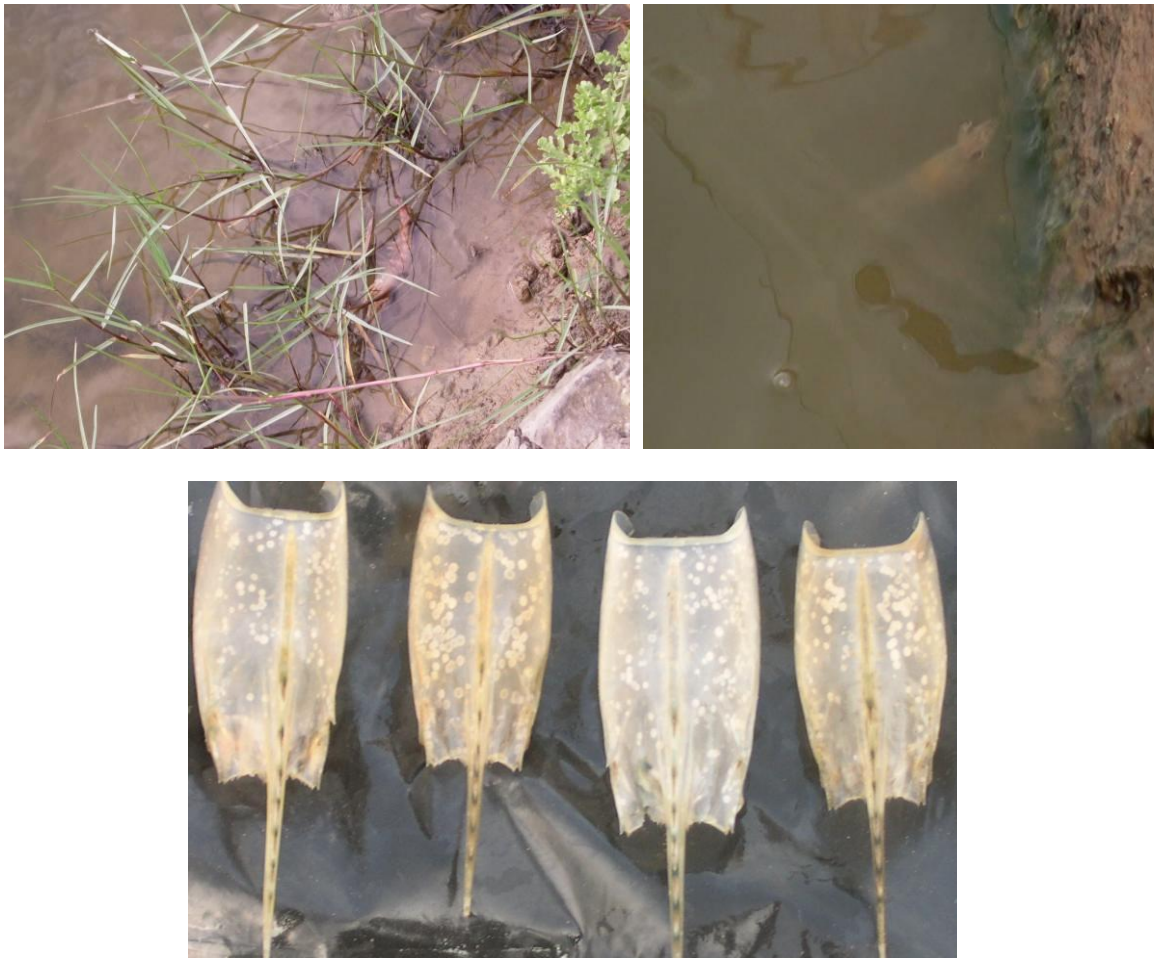
Phân tích trình tự WSSV cho thấy gen của nó có khoảng 1/3 trong số đó (181 ORF) là không chồng lên nhau, khoảng 80% trong số 181 ORF này có chứa các vị trí poly A (ATAAA) ở cuối ORF. Kích thước của các protein được mã hóa bởi bộ khung đọc mở này ước tính khoảng 60 đến 6077 acid amin. Chỉ có khoảng 45% ORF không chồng gối mã hóa cho protein hoặc motif đã biết (>20% acid amin được xác định) (Yang *et al.*, 2001). Ngược lại một số ORF của WSSV mã hóa cho các protein có độ tương đồng cao (40% hoặc hơn) do đó những ORF này có thể xếp được chung vào một họ gen. Tổng số 27 ORF có thể được phân loại vào 10 họ gen WSSV và có thể coi những họ gen này xuất phát từ sự sao chép ADN trong hệ gen WSSV (Van Hulten and Vlak, 2001).

2.2.2. Dấu hiệu bệnh lý

Tôm nhiễm bệnh do WSSV gây ra thường có dấu hiệu giảm ăn rõ rệt, cá biệt có một số trường hợp tăng cường khả năng bắt mồi nhiều hơn mức bình thường, sau đó vài ngày mới có hiện tượng bỏ ăn. Biểu hiện khá đặc trưng của bệnh là xuất hiện các đốm trắng tròn dưới lớp vỏ kitin, đặc biệt tập trung ở giáp đầu ngực và đốt bụng cuối cùng, khi tôm gần chết, chúng chuyển sang màu hồng đỏ (Crockford, 2008; Đỗ Thị Hòa, 2002). Trong một số trường hợp đốm trắng xuất hiện ở cơ thể tôm là do vi khuẩn Bacillus và muối calcium (Peter *et al.*, 2014). Vì vậy dấu hiệu bệnh lý chưa đủ cơ sở để khẳng định vật chủ nhiễm WSSV mà cần có phương pháp chẩn đoán đủ tin cậy trước khi kết luận. Một số phương pháp chẩn đoán được ứng dụng phổ biến hiện nay bao gồm sinh học phân tử và mô bệnh học. Tôm nhiễm bệnh do WSSV gây ra có tỷ lệ chết trong quần đàn đạt đến 100% trong vòng từ 3-10 ngày kể từ khi xuất hiện một trong số các dấu hiệu bệnh lý được nêu trên (Momoyama and Muroga, 2005; Sangamaheswaran and Jeyaseelan, 2001).

Có trường hợp tôm nuôi tấp bờ và chết với tỷ lệ cao trong thời gian ngắn, tuy nhiên không có dấu hiệu của đốm trắng trên thân, kết quả xác định tôm nhiễm WSSV bằng kỹ thuật PCR (Polymerase chain reaction). Đây là trường hợp tôm nhiễm bệnh do WSSV gây ra ở mức cấp tính, độc lực của virus cao, gây chết

tôm bệnh khi chưa có các dấu hiệu bệnh lý điển hình của bệnh thể hiện ra ngoài trên bề mặt cơ thể (Đỗ Thị Hòa, 2002).



Hình 2.2. Dấu hiệu bệnh lý của tôm nhiễm bệnh do WSSV gây ra

Nguồn: Bùi Quang Tề và cs (2006)

A: Tôm chuyển sang màu hồng đỏ, B: Tôm bơi lờ đờ ở mặt nước gần bờ,
C: Đốm trắng ở vỏ giáp đầu ngực

Tôm nhiễm bệnh do WSSV gây ra có biểu hiện đổi mô học khá điển hình ở một số cơ quan như mang, dạ dày, biểu mô dưới vỏ kitin, cơ quan tạo máu. Những tế bào bị nhiễm WSSV thể hiện sự phình to của nhân tế bào, trong đó có chứa duy nhất một thể vùi, hình cầu hoặc hình trứng bắt màu tím hồng của Hematoxylin, khi ở gian đoạn bệnh nặng, các thể vùi thường chiếm hết thể tích của nhân tế bào phình to (Tang *et al.*, 2013).

2.2.3. Phương thức lan truyền bệnh đốm trắng

Ngay từ những năm đầu xuất hiện dịch bệnh do WSSV gây ra trên tôm vào những năm 1990, các nhà nghiên cứu đã xác định có minh chứng chỉ ra WSSV có khả năng truyền lây phức tạp theo cả hai chiều ngang và dọc. Lan truyền theo chiều ngang của WSSV xảy ra thông qua việc các cá thể khỏe/chưa nhiễm bệnh tiêu hoá các mô hoặc sinh vật bị nhiễm WSSV hoặc bằng cách tiếp xúc trực tiếp với một cá thể nhiễm WSD hoặc sống trong môi trường nước có chứa WSSV (Durand and Lightner, 2002; Lo and Kou, 1998). Một minh chứng đã nêu rõ, WSSV có thể tồn tại, sống ngoài vật chủ trong các khoảng thời gian khác nhau tùy thuộc vào điều kiện môi trường, cụ thể WSSV có thể sống ngoài vật chủ trong môi trường nước biển ở 30^0C ít nhất 30 ngày và trong nước ao nuôi ít nhất 3-4 ngày (Momoyama *et al.*, 1998; Nakano *et al.*, 1998), điều đó cho thấy lan truyền bệnh do WSSV theo chiều ngang là hoàn toàn thuyết phục. Hơn nữa trên thực tế, con giống trước khi thả nuôi đã được kiểm tra cho kết quả âm tính với WSSV, tuy nhiên sau quá trình thả nuôi tôm vẫn nhiễm bệnh và chết ở bất kỳ giai đoạn nào sau khi thả. Trong phương thức lan truyền theo chiều ngang của WSSV thì khả năng lây nhiễm khi tôm khỏe ăn tôm đã bị nhiễm WSSV tăng gấp 10 lần so với khả năng lây nhiễm khi nuôi chung tôm khỏe trong môi trường có tôm nhiễm bệnh (Lotz, 2009). Ngoài ra, WSSV còn có khả năng lây truyền theo chiều dọc từ tôm mẹ sang tôm ấu trùng (Lo *et al.*, 1997), đồng thời tuyến sinh dục của tôm mẹ đã xác định sự hiện diện của WSSV.

Cơ chế lan truyền WSSV khi đã vào trong cơ thể vật chủ đến các cơ quan khác cũng đã được các nhà khoa học nghiên cứu chỉ ra. Ban đầu WSSV nhiễm vào máu của tôm, theo máu tác nhân gây bệnh đi khắp cơ thể sau đó về cơ quan đích. Cơ quan đích được xác định bao gồm mang, biểu bì, cơ, tuyến sinh dục, tế bào máu, hệ thần kinh, dạ dày… (Wongteerasupaya *et al.*, 1995), trong giai đoạn cuối của quá trình nhiễm bệnh, các biểu mô dạ dày, mang và vỏ/da của vật chủ sẽ bị phá hủy nghiêm trọng, dẫn đến rối loại chức năng đa cơ quan và vật chủ sẽ chết (Wang *et al.*, 1999).

2.2.4. Yếu tố nguy cơ dẫn đến tôm nhiễm bệnh do virus đốm trắng

Theo nghiên cứu của Umesh *et al.,* (2008) cho thấy WSSV nhiễm lên tôm nuôi rõ ràng không phải gây ra bởi một yếu tố bất kỳ nào mà là một số yếu tố tương tác và ảnh hưởng đến sự xuất hiện WSD ở trang trại/hộ nuôi. Những yếu tố nguy cơ này luôn thường trực và dễ xảy ra trong suốt cả vụ nuôi, kết quả từ nghiên cứu yếu tố nguy cơ bệnh tôm cho thấy rõ một số yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến bùng phát dịch bệnh tôm, ảnh hưởng đến sản lượng trong đó quan trọng phải kể đến cấp độ quản lý ở trang trại/ao nuôi (Umesh *et al.,* 2008). Do đó, một phương pháp tiếp cận mở rộng và quản lý tích hợp là cần thiết để đối phó với các yếu tố chính góp phần gây xuất hiện bệnh.

Các yếu tố nguy cơ trong quá trình nuôi dẫn đến tôm nuôi nhiễm bệnh do WSSV và mối nguy bùng phát bệnh đốm trắng khi tôm nhiễm bệnh do WSSV được minh họa ở Hình 2.3.

WSSV có thể xâm nhập vào tôm và ao nuôi qua nhiều con đường khác nhau kể cả tôm giống, nước, vật mang mầm bệnh hay thao tác hoạt động chăm sóc tôm sử dụng chung vật dụng (vợt, gáo…), việc chuyển tôm nhiễm bệnh và trang thiết bị từ trang trại này sang trang trại khác, đều là các yếu tố cấu thành dịch bệnh, tuy nhiên bùng phát dịch bệnh cần có thêm yếu tố gây sốc/stress cho tôm như yếu tố môi trường bất lợi kết hợp...

Có thể áp dụng biện pháp quản lý để kiểm soát các yếu tố môi trường và giảm thiểu nguy cơ của tôm nhiễm bệnh do WSSV xảy ra trong ao. Để thành công trong việc kiểm soát bệnh do WSSV gây ra ở tôm, người nuôi phải quản lý mọi nguy cơ tiềm ẩn ở các giai đoạn khác nhau trong suốt cả quá trình của vụ nuôi.

Những phát hiện này cung cấp một cơ sở vững chắc giúp cho người nuôi tôm giảm bớt thiệt hại do bệnh, nâng cao năng lực và kỹ năng trang trại trong quản lý sức khỏe tôm, giảm thiểu những rủi ro lây lan bệnh tôm đến các khu vực khác, nâng cao năng suất và lợi nhuận nuôi tôm.

Hình 2.3. Nguyên nhân gây bệnh đốm trắng ở tôm nuôi

Nguồn: Umesh *et al* (2008)

2.3. SINH VẬT MANG VIRUS ĐỐM TRẮNG GÂY BỆNH CHO TÔM NUÔI

Chủ động kiểm soát được tôm bố mẹ sạch bệnh mới chỉ hạn chế sự xuất hiện bệnh do WSSV gây ra thông qua con đường lan truyền chiều dọc. Để hạn chế lan truyền bệnh theo phương thức truyền ngang cần có thông tin về phạm vi sinh vật mang WSSV. Chính vì vậy, các thông tin đánh giá tổng quát về các sinh vật mang WSSV là rất quan trọng và cần thiết, nó là cơ sở để đưa ra các biện pháp phòng bệnh sinh học mang tính chất thân thiện môi trường. Ngăn ngừa và loại bỏ sự có mặt của các sinh vật mang mầm tác nhân gây WSD trong quá trình

nuôi, chính là cắt bỏ con đường lan truyền bệnh đốm trắng, góp phần khống chế hiệu quả bệnh đốm trắng ở tôm nuôi cho nghề nuôi thủy sản nói chung và nghề nuôi tôm nói riêng.

2.3.1. Nghiên cứu sinh vật mang WSSV gây bệnh đốm trắng cho tôm trên thế giới

Hiện nay trên thế giới vấn đề nghiên cứu xác định sinh vật mang WSSV đã, đang và vẫn sẽ được quan tâm nghiên cứu, luôn cập nhập các loài mới phát hiện vào danh sách các loài sinh vật mang WSSV. Năm 1997 số loài sinh vật mang WSSV được công bố là 31 (Sangamaheswaran and Jeyaseelan, 2001), tăng lên 46 loài năm 2006 (Flegel, 2006), sau đó 94 loài năm 2008 (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008; Sánchez-Paz, 2010), tiếp đến 119 loài năm 2014 và đến nay đã lên tới 153 loài (Mục 2.3). Các thông tin về sinh vật mang WSSV này giúp người nuôi nhận biết loài sinh vật mang WSSV, từ đó kiểm soát môi trường chặt chẽ, có giải pháp ngăn ngừa kiểm soát góp phần giảm thiểu nguy cơ tôm nuôi nhiễm bệnh do WSSV gây ra, đồng thời hạn chế tối đa sự xuất hiện các sinh vật mang WSSV trong ao nuôi cũng như khu vực lân cận.

2.3.1.1. Giáp xác mang virus gây bệnh đốm trắng cho tôm

Động vật giáp xác (*Crustacea*) là một nhóm lớn các động vật chân khớp (hơn 44.000 loài) sống ở nước, hô hấp bằng mang. Động vật giáp xác được chia thành hai nhóm chính dựa trên kích thước của chúng. Nhóm có kích thước lớn: bao gồm đại diện của các lớp Branchiopoda (chân mang), Copepoda (chân chèo), Cirripedia (chân tơ). Nhóm có kích thước nhỏ: bao gồm các loài có kích thước hiển vi, hầu hết các loài này sống ở biển và là thành phần quan trọng của sinh vật phù du, đóng vai trò lớn trong chuỗi thức ăn.

Giáp xác là loài động vật đầu tiên được phát hiện mang WSSV khi chúng được xác định là nguyên nhân gây ra hiện tượng tôm nuôi chết với tỷ lệ cao (100%) trong thời gian ngắn (3-7 ngày), tất cả các giai đoạn sống từ trứng, ấu trùng đến giai đoạn trưởng thành đều có thể nhiễm WSSV (Venegas *et al.*, 1999). Ở nội dung trình bày này, nhóm giáp xác sẽ được thống kê chia thành 2 phần bao gồm phần thứ nhất là các loài tôm và phần thứ 2 là các loài cua.

Bảng 2.4. Danh sách các loài tôm mang virus đốm trắng

TT	Tên gọi tiếng việt	Tên loài	Hình thức nhiễm		Phương pháp chẩn đoán	Địa dư	Nguồn
			Tự nhiên	Thí nghiệm			
1	Tôm he	*Farfantepenaeus aztecus*		x	Mô học	Mỹ	(Lightner *et al.*, 1998)
2		*F. duorarum*		x			
3	Tôm nương	*Fenneropenaeus chinensis*	x	x	Mô học, PCR	Trung Quốc,	(Lu *et al.*, 1997)
4	Tôm he Ấn Độ	*F. indicus*	x	x	PCR, TEM	Ấn Độ	(Rajendran *et al.*, 1999a)
5	Tôm bạc	*F. merguiensis*	x	x	Mô học, PCR	Thái Lan	(Flegel, 1997)
6	Tôm he lông dài	*F.penicillatus*	x		PCR	Đài Loan	(Chou Hsin-Yiu *et al.*, 1995)
7	Tôm he	*Litopenaeus setiferus*		x	Mô học	Mỹ	(Lightner *et al.*, 1998)
8	Tôm thẻ	*L. stylirostris*	x	x			
9	Tôm chân trắng	*L. vannamei*	x	x	Mô học,	Mỹ	(Lu *et al.*, 1997)
10	Tôm he Nhật Bản	*Marsupenaeus japonicas*	x	x	Mô học, TEM	Nhật Bản	(Takahashi *et al.*, 1994)
11	Tôm he	*Metapenaeus dobsonii*	x	x	PCR	Ấn Độ	(Hossain *et al.*, 2001)
12		*M. elegans*	x		PCR	Ấn Độ	(Chakraborty *et al.*, 2002)
13	Tôm đỏ	*Aristeus sp.*	x				
14	Tôm hồng	*Heterocarpus sp.*	x				
15	Tôm đuôi xanh	*Metapenaeus affinis*	x		PCR	Ấn Độ	(Mohan, 2008)
16	Tép bạc	*M. brevicornis*		x	ELISA	Băng la đét	(Hossain *et al.*, 2001)
17	Tôm rảo	*M. ensis*	x	x	PCR	Đài Loan	(Chang *et al.*, 1998)
18	Tôm nâu	*M. monoceros*		x	PCR	Ấn Độ	(Rajendran *et al.*, 1999a)
19	Tôm sú	*Penaeus monodon*	x	x	Mô học, PCR	Đài Loan	(Chou *et al.*, 1995)
20	Tôm he	*P. canaliculatus*	x		PCR	Ấn Độ	(Mohan, 2008)
21		*P. penicillatus*	x		ISH, PCR	Đài Loan	(Lo *et al.*, 1996b)
22	Tôm vằn	*P. semisulcatus*	x	x	ISH, PCR	Đài Loan	(Rajendran *et al.*, 1999a)
23	Tôm nương	*P. chinensis*	x	x	Dot-blot	Trung Quốc	(Cai *et al.*, 1995)
24	Tôm hồng	*P. duorarum*	x	x	ISH, PCR	Mỹ	(Lightner, 1996)
25	Tôm he	*P. indicus*	x	x	ISH, dop-blot	Ấn Độ	(Rajan *et al.*, 2000)
26		*P. japonicas*	x	x	Mô học, PCR	Nhật Bản	(Nakano *et al.*, 1994)
27	Tôm bạc	*P. merguiensis*	x		PCR	Trung Quốc	(Wang *et al.*, 1999)
27	Tôm trăng	*P. schmitti*		x	ISH	Pháp	(Unzueta-Bustamante *et al.*, 2004)
29	Tôm rì	*P. setiferus*	x	x	ISH, PCR	Mỹ	(Lightner, 1996)
30	Tôm xanh	*P. stylirostris*	x	x	ISH, PCR	Mỹ	(Lightner, 1996)
31	Tôm vàng	*P. aztecus*	x	x	PCR, ISH	Thái Lan	(Flegel, 1997)
32	Tôm kiddi	*Parapenaeopsis stylifera*	x		PCR	Ấn Độ	(Hossain *et al.*, 2001)
33	Tôm san hô	*Solenocera indica*	x				

TT	Tên gọi tiếng việt	Tên loài	Hình thức nhiễm		Phương pháp chẩn đoán	Địa dư	Nguồn
			Tự nhiên	Thí nghiệm			
34	Tôm cứng	*Trachypenaeus curvirostris*	x	x	ISH, PCR	Đài Loan	(Wang *et al.*, 1998)
35	Tôm càng cảnh	*Alpheus sp.*		x	PCR	Thái Lan	(Lo *et al.*, 1996a)
36		*Alpheus lobidens*	x		PCR	Nhật,	(Takahashi *et al.*, 2003)
37		*Alpheus brevicristatus*	x				
37	Tôm bùn	*Callianassa sp.*		x	PCR	Thái Lan	(Lo *et al.*, 1996a)
39	Tôm mỡ	*Exopalaemon orientalis*		x	ISH, PCR	Đài Loan	(Wang *et al.*, 1998)
40		*E. carinicauda*		x	PCR	Trung Quốc	(Wang *et al.*, 2013)
41	Tôm thủy tinh	*Palaemon sp.*	x		ISH, PCR	Đài Loan	(Lo *et al.*, 1996a)
42	Tôm càng	*P. adspersus*		x	TEM, ISH, PCR	Pháp	(Corbel *et al.*, 2001)
43		*Macrobrachium idella*		x	Mô học, WB	Ấn Độ	(Rajendran *et al.*, 1999a)
44		*M. lamerrae*		x	Mô học, WB	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2000)
45	Tôm càng xanh	*M. rosenbergii*	x	x	Mô học, PCR	Ấn Độ,	(Hossain *et al.*, 2001)
46	Tôm càng	*M. nipponense*		x	PCR	Trung Quốc	(Zhao *et al.*, 2017)
47	Tôm hùm đá	*Panulirus homarus*		x	Mô học	Ấn Độ	(Rajendran *et al.*, 1999a)
48	Tôm rồng	*P. longipes*	x	x	ISH, PCR	Đài Loan	(Wang *et al.*, 1998)
49	Tôm hùm bông	*P. ornatus*	x	x	Mô học, PCR	Ấn Độ	(Rajendran *et al.*, 1999a)
50	Tôm hùm ma	*P. penicillatus*		x	ISH, PCR	Đài Loan	(Chang *et al.*, 1998)
51	Tôm hùm bùn	*P. polyphagus*	x	x	Mô học	Ấn Độ	(Rajendran *et al.*, 1999a)
52	Tôm hùm sen	*P. versicolor*	x	x	ISH, PCR	Đài Loan	(Chang *et al.*, 1998)
53	Tôm hùm lùn	*Scyllarus arctus*		x	TEM, ISH, PCR,	Pháp	(Corbel *et al.*, 2001)
54	Tôm hùm đất châu Âu	*Astacus astacus*		x	PCR	Thụy Điển	(Jiravanichpaisal *et al.*, 2004)
55	Tôm càng	*A.leptodactylus*		x	TEM, ISH, PCR	Pháp	(Corbel *et al.*, 2001)
56	Tôm càng xanh Úc	*Cherax destructor*		x	Mô học	Úc	(Edgerton, 2004)
57		*C.quadricarinatus*		x	Mô học, TEM	Trung Quốc	(Shi *et al.*, 2000)
58	Tôm hùm đất	*Pacifastacus leniusculus*		x	Mô học, ISH	Thụy Điển	(Jiravanichpaisal *et al.*, 2004)
59	Tôm hùm càng	*Procambarus clarkia*		x	ISH, PCR	Đài Loan	(Chang *et al.*, 1998)
60	Tôm càng xanh	*Orconectes limosus*		x	TEM, ISH, PCR,	Pháp	(Corbel *et al.*, 2001)
61		*Orconectes punctimanus*	x		PCR	Mỹ	(Wang *et al.*, 1998)
62	Tép chùm	*Acetes sp.*	x	x	Mô học, PCR	Thái Lan	(Supamattaya *et al.*, 1998)
63	Tôm cỏ	*Palaemon styliferus*	x		PCR, ISH	Thái Lan	(Flegel, 1997)
64	Tôm cảnh	*Solenocera crassicornis*	x		PCR	Ấn Độ	(Hossain *et al.*, 2001)
65	Tôm lưng	*Seranopsis longipes*	x		PCR	Ấn Độ	(Chakraborty *et al.*, 2002)
66	Tôm chân trắng	*Solenocera choprai*	x				

Đối với tôm, đã xác định có 66 loài mang WSSV trong đó 43 loài nhiễm WSSV trong điều kiện tự nhiên, số còn lại (23 loài) nhiễm WSSV trong điều kiện gây nhiễm ở phòng thí nghiệm, danh sách tên các loài tôm mang WSSV được chi tiết ở Bảng 2.4, đồng thời hình ảnh tương ứng của các loài tôm được mô tả ở phụ lục 1.2. Trong số 66 loài tôm nhiễm WSSV được báo cáo trên thì không phải tất cả đều chịu ảnh hưởng bởi WSSV, một số loài trong đó có khả năng đáp ứng miễn dịch tự nhiên đối với WSSV, đặc biệt *M. rosenbergii* - tôm càng xanh (một loài tôm nuôi phổ biến ở nước ngọt). Trong điều kiện tự nhiên xác định *M. rosenbergii* có kết quả dương tính với WSSV tuy nhiên tôm nuôi không chết đồng thời không có bất kỳ biểu hiện bất thường nào (Hossain *et al.*, 2001). Trong điều kiện thí nghiệm gây nhiễm nhân tạo *M. rosenbergii* có biểu hiện yếu, giảm ăn ở ngày thứ 3 sau khi gây nhiễm, tuy nhiên chúng có khả năng hồi phục tốt và nhanh ở những ngày tiếp theo của thí nghiệm, kết thúc thí nghiệm tỷ lệ sống là 100% (Sarathi *et al.*, 2008).

Đối với cua đã công bố có 57 loài mang WSSV trong số đó có 9 loài cua xác định nhiễm WSSV đồng thời dưới cả hai hình thức (tự nhiên và gây nhiễm trong điều kiện thí nghiệm), 24 loài nhiễm ở điều kiện tự nhiên và nhiều nhất là 42 loài nhiễm trong điều kiện thí nghiệm (Bảng 2.5). Đến nay, trong tự nhiên chưa có công bố nào nêu ra WSSV gây ra hiện tượng dịch bệnh chết hàng loạt ở cua, WSSV cư trú ở trong một số cơ quan như mang, mắt, tim và cơ (Sahul Hameed *et al.*, 2003).

Trước đây, một số mô hình nuôi ghép cua-tôm hay nuôi luân canh một vụ cua, một vụ tôm đã triển khai áp dụng khá phổ biến ở các nông hộ. Tuy nhiên sau khi các nghiên cứu công bố về kết quả cua đã mang/nhiễm WSSV thì mô hình nuôi ghép tôm-cua và nuôi luân canh giữa vụ tôm và cua đã dừng triển khai tại các nông hộ.

Bảng 2.5. Danh sách các loài cua mang virus đốm trắng

TT	Tên gọi tiếng việt	Loài	Hình thức nhiễm		Phương pháp chẩn đoán	Địa dư	Nguồn
			Tự nhiên	Thí nghiệm			
1	Cua đỏ	*Atergatis integerrimus*		x	PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2003)
2	Cúm núm	*Calappa philarigus*	x	x	Mô học, ISH, PCR	Đài Loan	(Kou *et al.*, 1998)
3	Cua xanh Đại Tây Dương	*Callinectes lophos*		x	ISH, PCR	Đài Loan	(Wang *et al.*, 1998)
4		*Callinectes sapidus*	x		PCR	Mỹ	(Chang *et al.*, 2001)
5		*Callinectes arcuatus*	x		PCR	Mexico	(Galavíz-Silva *et al.*, 2004)
6	Cua nâu	*Cancer pagurus*		x	TEM, ISH, PCR	Pháp	(Corbel *et al.*, 2001)
7	Cua xanh Châu Âu	*Carcinus maenas*		x			
8	Ghẹ	*Charybdis annulata*	x	x	Mô học, PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2003)
9		*Charybdis feriatus*	x		PCR	Đài Loan	(Lo *et al.*, 1996a)
10		*Charybdis granulate*		x	ISH	Trung Quốc	(Chang *et al.*, 1998)
11		*Ch. japonica*	x		PCR	Nhật Bản	(Maeda *et al.*, 1998)
12		*Ch. lucifera*	x	x	PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2001)
13		*Ch. natator*		x	PCR	Ấn Độ	(Shahadat Hossain *et al.*, 2001)
14		*Ch. cruciata*	x				
15		*Ch. hoplites*	x		PCR	Ấn Độ	(Chakraborty *et al.*, 2002)
16		*Ch. riversandersoni*	x		PCR	Ấn Độ	(Mohan, 2008)
17		*Ch. cruciate*		x			
18		*Ch. feriatus*	x	x	Mô học, PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2001)
19		*Ch. granulate*		x	ISH	Đài Loan	(Wang *et al.*, 1998)
20		*Ch. lucifera*	x	x	Mô học, PCR	Ấn Độ	(Cha kraborty *et al.*, 2002)
21		*Ch. natatus*	x	x	Mô học, PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2001)
22		*Demania splendida*		x	Mô học, PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2003)
23	Cua nhện	*Doclea hybrid*		x			
24		*Lio. puber*		x	ISH, dop-blot	Pháp	(Corbel *et al.*, 2001)
25	Còng gió	*Gelasimus marionis nitidus*	x		PCR	Ấn Độ	(Shahadat Hossain *et al.*, 2001)
26	Cua đá	*Grapsus albolineatus*		x	Mô học, PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2003)
27	Cua lông	*Halimede ochtodes*		x			
28	Cua bùn đất	*Helice tridens*	x		PCR	Đài Loan	(Kou *et al.*, 1998)

TT	Tên gọi tiếng việt	Loài	Hình thức nhiễm		Phương pháp chẩn đoán	Địa dư	Nguồn
			Tự nhiên	Thí nghiệm			
29	Cua cảng	*Liagore rubronaculata*		x	Mô học, PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2003)
30	Cua nhung bơi	*Liocarcinus depurator*		x	TEM, ISH, PCR, dot-blot	Pháp, Ấn Độ	(Kanchanaphum *et al.*, 1998; Rajendran *et al.*, 1999a)
31		*L. puber*		x			
32	Cua biển sâu	*Lithodes maja*		x	Mô học, PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2003)
33	Cua ma	*Macrophthalmus sulcatus*	x		PCR	Ấn Độ	(Shahadat Hossain *et al.*, 2001)
34	Cua trăng	*Matuta miersi*		x	Mô học, PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2003)
35		*Mantura sp.*	x		PCR, ISH	Thái Lan	(Flegel, 1997)
36		*M. planipes*	x		PCR	Ấn Độ	Lo *et al.*, 1999,
37	Cua đá	*Menippe rumphii*		x	Mô học, PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2003)
38	Cua hòn núi	*Metapograpsus sp*		x	Mô bệnh học	Ấn Độ	(Rajendran *et al.*, 1999a)
39		*Metapograpsus messor*	x		PCR	Ấn Độ	(Shahadat Hossain *et al.*, 2001)
40	Cua sông	*Paradorippe granulate*		x	Mô học, PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2003)
41		*Paratelphusa hydrodomous*		x	Mô học, PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2001)
42		*P. pulvinata*		x			
43	Cua elbow	*Parthenope prensor*		x	Mô học, PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2003)
44	Cua hộp	*Phylira syndactyla*		x			
45	Ghẹ	*Podophthalmus vigil*		x			
46		*Portunus pelagicus*	x	x	Mô học, ISH, TEM	Thái Lan	(Supamattaya *et al.*, 1998)
47	Ghẹ 3 mắt	*P. sanguinolentus*	x	x	Mô học, ISH, TEM	Đài Loan	(Kou *et al.*, 1998)
48	Cua khảm	*Pseudograpsus intermedius*	x		PCR	Ấn Độ	(Shahadat Hossain *et al.*, 2001)
49	Rạm	*Sesarma sp.*		x	Mô học, TEM	Thái Lan	Kanchanaphumet *et al.*, 1998
50		*S. oceanic*	x		PCR	Ấn Độ	(Shahadat Hossain *et al.*, 2001)
51	Cua bùn xanh	*Scylla serrata*	x	x	Mô học, ISH, PCR	Thái Lan	(Supamattaya *et al.*, 1998)
52		*S. olivacea*		x	PCR, ISH	Thái Lan	(Flegel, 1997)
53		*S. paramamosain*		x	Mô học, PCR	Thái Lan	Somboonna *et al.*, 2010
54	Cua gạo đen	*Somanniathelpusa sp.*		x			
55		*S. tranquebaricca*		x	Mô học	Ấn Độ	(Rajendran *et al.*, 1999a)
56	Cua	*Thalamite danae*		x	Mô học, PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2003)
57	Cáy	*Uca pugilator*		x	Mô học, ISH	Thái Lan	(Lo *et al.*, 1996a)

2.3.1.2. Các loài sinh vật phù du mang virus gây bệnh đốm trắng cho tôm

Nhóm sinh vật phù du là một trong mắt xích thức ăn quan trọng của chuỗi thức ăn cho tôm khi tôm ở gian đoạn post, ấu trùng. Chính vì vậy các nhà nghiên cứu đã tiến hành thí nghiệm nghiên cứu về khả năng lây nhiễm WSSV đến tôm theo chuỗi thức ăn khép kín từ thực vật phù du →rotifer (luân trùng) →artermia (giáp xác chân mang)→ tôm, nhằm xác định ở mắt xích nào trong chuỗi thức ăn có khả năng mang WSSV và gây bệnh cho tôm nuôi, hơn thế nữa loài thực vật/động vật phù du nào có khả năng mang WSSV được các thí nghiệm lựa chọn đưa vào thử nghiệm.

Một thí nghiệm được triển khai đã nêu ra: hai loại tảo có tên *Alexandrium tamarense* và *Alexandrim minutum*, luân trùng (*Branchionus urceu*) và giáp xác chân mang (*Artemia franciscana*) và tôm (*Fenneropenaeus chinensis)* là các loài được lựa chọn đưa vào thử nghiệm, tảo được ủ trong môi trường chứa WSSV, sau đó được rửa sạch trong nước biển khử trùng nhiều lần để loại bỏ WSSV bám dính cơ học phía ngoài. Tiếp đến, một phần làm thức ăn cho luân trùng theo chuỗi thức ăn, một phần phân tích sự có mặt WSSV bằng PCR. Kết quả cho thấy có sự lây nhiễm WSSV trong chuỗi thức ăn khép kín (Jiang, 2012). Chính vì vậy, đến nay ở điều kiện tự nhiên chưa thu được mẫu thực vật phù du nhiễm WSSV, trong khi đó một số ít loài động vật phù du nhiễm WSSV trong điều kiện tự nhiên, nhưng phần lớn vẫn đang trong điều kiện thí nghiệm gây nhiễm.

a. Thực vật phù du mang virus gây bệnh đốm trắng cho tôm

Thực vật phù du là những sinh vật phù du sống tự dưỡng, dị dưỡng và hỗn hợp, chúng sống thành một tập hợp. Hầu hết thực vật phù du quá nhỏ để có thể nhìn thấy từng cá thể bằng mắt thường. Tuy nhiên, khi số cá thể đủ nhiều, chúng thể hiện rất rõ khi tạo màu xanh cho nước do chất diệp lục có trong chúng.

Có 10 loài thực vật phù du mang WSSV đã được công bố, tất cả đều mang WSSV dưới hình thức gây nhiễm và thực hiện bởi các nhà khoa học ở Trung Quốc, tên cụ thể các loài và phương pháp phân tích được nêu ở Bảng 2.6

Bảng 2.6. Danh sách các loài thực vật nhiễm virus đốm trắng

Tên gọi tiếng việt	Tên loài	Hình thức nhiễm	Phương pháp chẩn đoán	Địa dư	Nguồn
Tảo giáp	*Alexandrium tamarense*	Thí nghiệm	Dot-plot	Trung Quốc	(Jiang, 2012)
	Alexandrium minutum				
Tảo vàng ánh	*Isochrysis zhanjiangensis*				
Tảo lục	*Platymonas subcordiformis*				
Tảo nâu	*Heterosigma akashiwo*	Thí nghiệm	PCR	Trung Quốc	(Liu *et al.*, 2007a)
Tảo giáp	*Scrippsiella trochoidea*				
Tảo vàng ánh	*Isochrysis galbana*				
Tảo silic	*Skeletonema costatum*				
Tảo lục	*Chlorella sp*				
	Dunaliella salina				

b. Động vật phù du mang virus gây bệnh đốm trắng cho tôm

Động vật phù du là những sinh vật phù du dị dưỡng, sống trôi nổi trong biển, đại dương, các vùng nước ngọt, có khả năng bơi kém và có kích thước hiển vi, đơn bào hoặc dạng đa bào. Động vật phù du có thể được phân loại thành ba nhóm kích thước: microzooplankton thường có kích thước bé hơn 200 microns, mesozooplankton có kích thước từ 200 micron và 2 mm, và macrozooplankton có kích thước lớn hơn 2 mm.

Có 09 loài động vật phù du mang WSSV đã được công bố thuộc 5 quốc gia bao gồm Mexico, Thái Lan, Ấn Độ, Đài Loan và Trung Quốc (Bảng 1.7). Trong đó, tất cả 9 loài xác định mang WSSV trong tự nhiên và 2 trong số 9 loài đã được gây nhiễm để kiểm chứng. Hơn nữa, kết quả phân tích *Brachionus urceus* trưởng thành và trứng của *B. urceus* thu trong ao nuôi tôm đã minh chứng sự lan truyền WSSV theo chiều dọc. Trứng *B. urceus* được khử trùng bằng chlorine nhằm loại trừ khả năng WSSV bám trên bề mặt vỏ trứng, kết quả cho thấy cả trứng *B. urceus* và *B. urceus* trưởng thành có kết quả dương tính với WSSV bằng phương pháp phân tích PCR- dot blot, điều đó chứng tỏ kết quả

dương tính WSSV không phải do sự bám dính bên ngoài mà WSSV có trong trứng và cơ thể rotifer (Sánchez-Paz, 2010). Danh mục tên loài các động vật phù du mang WSSV được chỉ ra ở Bảng 2.7.

Bảng 2.7. Danh sách các loài động vật phù du mang virus đốm trắng

Tên gọi tiếng việt	Loài	Hình thức nhiễm	Phương pháp chẩn đoán	Địa dư	Nguồn
Luân trùng	*Branchiopoda cladocera*	Tự nhiên	PCR	Mexico	(Ramirez-Douriet *et al.*, 2005)
Động vật đối xứng 2 bên	*Chaetognata*	Tự nhiên			
Lớp chân mang	*Branchiopoda*	Tự nhiên	PCR	Ấn Độ	(Sahul Hameed *et al.*, 2003)
Giáp xác chân mang	*Artemia franciscana*	Tự nhiên Thí nghiệm	PCR	Ấn Độ Trung Quốc	(Li *et al.*, 2003)
Giáp xác chân chèo	*Acartia clause*	Tự nhiên	PCR	Mexico Thái Lan	(Lo *et al.*, 1999; Lo *et al.*, 1996a)
Giáp xác chân chèo	*Schmackeria dubia*	Tự nhiên	PCR	Đài Loan	(Lo *et al.*, 1996a)
	Nitocra sp	Tự nhiên	PCR	Mexico Thái Lan	Lo *et al.*, 1996a; Ramírez-Douriet *et al.*, 2005
Luân trùng	*Brachionus urceu*	Tự nhiên Thí nghiệm	PCR dot-plot	Trung Quốc	(Yan *et al.*, 2004)
	Brachionus plicatilis	Tự nhiên			

2.3.1.3. Các loài sinh vật khác mang virus gây bệnh đốm trắng

a. Nhuyễn thể

Nhuyễn thể là loài động vật thân mềm, không xương, có vỏ đá vôi che chở và nâng đỡ. Tùy lối sống mà vỏ và cấu tạo cơ thể có thể thay đổi, ví dụ một số loại nhuyễn thể như ốc, trai, hàu, vẹm…

Sử dụng nước nuôi có tôm nhiễm WSSV để nuôi hàu (*Crassostrea gigas*), sau 72 giờ nuôi hàu xác định đã nhiễm WSSV ở mang và tuyến tiêu hóa với tỷ lệ nhiễm lần lượt tương ứng 39% và 44% hàu (Vazquez-Boucard *et al.,* 2012). Hàu còn được xem như là sinh vật chỉ thị nhạy cảm khi sự hiện diện của WSSV ở mức thấp (Vazquez-Boucard *et al.,* 2010), bởi lẽ hàu có đặc tính ăn lọc, một khối lượng lớn nước sẽ được hàu lọc và nhờ đó WSSV có thể xuất hiện trong mang và hệ tiêu hóa của hàu. WSSV chỉ tích tụ trong mang và tuyến tiêu hóa của hàu mà không gây bệnh cho hàu (Vazquez-Boucard, *et al.*, 2012).

b. Giun nhiều tơ

Giun nhiều tơ còn được gọi là giun lông hoặc polychaetes, cơ thể phân khúc, mỗi phân khúc cơ thể là phần cơ thịt nhô ra được gọi là chi bên, mang nhiều lông. Polychaetes là một loài sống phổ biến ở bề mặt đáy mềm. Hệ sinh dục có cấu tạo đơn giản, gồm tuyến sinh dục bám từng đôi trên thành cơ thể ở tất cả các đốt hay chỉ có ở một số đốt. Cơ thể không có ống dẫn sinh dục nên tế bào sinh dục chỉ được giải phóng sau khi cơ thể bị vỡ ra.

Đến nay có 2 loài giun được công bố thuộc sinh vật mang WSSV bao gồm *Marphysa gravelyi* và *Dendronereis* spp, đây là 2 loài giun phổ biến trong hệ tự nhiên và là thức ăn cho tôm bố mẹ ở Ấn Độ và Indonesia (Haryadi *et al.*, 2015).

Marphysa gravelyi được chỉ ra là vec-tơ thụ động mang WSSV khi lan truyền bệnh đốm trắng cho tôm sú bố mẹ. *M. gravelyi* được thu tự nhiên tại 8 điểm khác nhau ở phía Bắc của Tamilnadu (Ấn Độ), kết quả phân tích bằng PCR cho thấy tỷ lệ WSSV nhiễm trên *M. gravelyi* dao động từ 16,7% đến 75% (Vijayan *et al.,* 2005). Một thí nghiệm gây nhiễm đã được triển khai nhằm xác nhận các kết quả từ tự nhiên và > 60% *M. gravelyi* nhiễm WSSV sau 7 ngày gây nhiễm (Vijayan *et al.*, 2005), bên cạnh đó thí nghiệm cũng đã làm rõ khả năng lây nhiễm WSSV từ *M. gravelyi* đến tôm *P. monodon* bố mẹ.

Dendronereis spp. và tôm *P. monodon* được phát hiện nhiễm WSSV từ ao nuôi tôm truyền thống tại Indonesia, WSSV nhiễm trên giun *Dendronereis* spp.

và tôm *P. monodon* lần lượt tương ứng 90% và 80% bằng phương pháp phân tích PCR (Haryadi *et al*., 2015). WSSV đã được phát hiện phần đầu, mang, máu và phần giữa của cơ thể giun *Dendronesis* spp., hơn nữa, nghiên cứu cũng đã làm rõ quan điểm *Dendronereis* spp. truyền WSSV lên tôm bố mẹ *L. vannamei* qua con đường cho ăn (Haryadi *et al.,* 2015).

c. Côn trùng

Côn trùng là những động vật không xương sống có tên khoa học Insecta (lớp Côn trùng). Cơ thể côn trùng được chia thành 3 phần: đầu, ngực và bụng. Chân được gắn vào các đốt ngực, phần bụng được phân chia thành nhiều đốt (≤11 đốt). Phần lớn côn trùng trưởng thành đều có cánh Côn trùng là nhóm đa dạng nhất trên Trái Đất.

Có năm loài côn trùng có kết quả dương tính với WSSV, trong số đó có 3 loài được công bố thuộc Ấn Độ và 2 loài thuộc Đài Loan (Bảng 2.8), tất cả 5 loài xác định hình thức nhiễm ở dạng tự nhiên.

Bảng 2.8. Danh sách các loài côn trùng mang WSSV trong tự nhiên

Tên gọi tiếng việt	Loài	Hình thức nhiễm	Phương pháp chẩn đoán	Địa dư	Nguồn
Bọ cánh cứng	*Coleoptera*	Tự nhiên	PCR	Đài Loan	Lo *et al.,* 1996a
Ruồi	*Ephydridae*				
Bọ gạo	*Notonecta*	Tự nhiên	PCR	Ấn Độ	Mohan, 2008
Bọ xít đo nước	*Ranatra*				
Ấu trùng chuồn chuồn	*Dragon nymph*				

d. Chim và gà nuôi

Nghiên cứu về khả năng chim và gà nuôi có thể là sinh vật mang WSSV đã được tiến hành bởi (Vanpatten *et al.,* 2004). Một loài chim được đưa vào thử nghiệm là chim mòng biển/hải âu (*Larus atricilla*) và gà nuôi (*Gallus*

domesticus), chúng được cho ăn thức ăn là những mẫu tôm nhiễm bệnh do WSSV gây ra, sau đó phân gà và chim được thu lại. Bằng phương pháp PCR/RT-PCR xác định WSSV đã có trong phân chim và gà lần lượt sau 72 h và 57 h (Vanpatten *et al.*, 2004), WSSV hiện diện trong phân gà và chim vì vậy không loại trừ chúng là một trong mối nguy có thể mang mầm bệnh do WSSV lây truyền từ chim sang tôm nuôi (Sánchez-Paz, 2010).

2.3.2. Nghiên cứu sinh vật mang WSSV gây bệnh đốm trắng cho tôm ở Việt Nam

Nghiên cứu về các loài sinh vật mang WSSV có thể lây truyền cho tôm nuôi ở Việt Nam còn nhiều hạn chế và mang tính gián đoạn. Ngoài hai loài tôm nuôi chính hiện nay là tôm Sú và TCT chịu ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ chết khi tôm nhiễm WSSV, thì cũng có trường hợp tôm đóng vai trò là sinh vật mang WSSV. Điều này được giải thích khi 2 loài tôm này nhiễm WSSV nhưng môi trường nuôi được kiểm soát tốt, tôm không bị sốc, dịch bệnh không bùng phát, tôm vẫn sống khi trong cơ thể mang mầm bệnh do WSSV, vì vậy, tôm Sú và TCT cũng có thể được xem như là vật mang WSSV. Nghiên cứu được công bố đầu tiên năm 1993 khi tôm Sú nuôi nhiễm WSSV tại Bà Rịa,Vũng Tàu (Nguyễn Việt Thắng và cs., 1996). Tiếp đến năm 1999 một kết quả nghiên cứu chỉ ra 03 loài tôm (*Penaeus indicus*, *Etapenaeus ensis*, *Metapenaeus lysianassa*) ở rừng ngập mặn tỉnh Cà Mau nhiễm WSSV (Hao *et al.*, 1999). Năm 2010, *M. rosenbergii* (tôm càng xanh) nuôi phổ biến ở nước ngọt công bố nhiễm WSSV (Võ Văn Tuấn và cs., 2010). Năm 2013, báo cáo tác nhân gây hiện tượng tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) bị hội chứng chết đỏ với các dấu hiệu điển hình như tôm yếu giảm ăn, tấp bờ, cơ thể tôm bệnh chuyển sang màu đỏ, đốm trắng với đường kính 0,5-2,0 mm có thể có hoặc không có mặt dưới cửa vỏ kitin, đặc biệt ở dưới giáp đầu ngực. Tác nhân chính gây hội chứng chết đỏ ở TCT (*L. vannamei*) nuôi thương phẩm được xác định là WSSV (Đỗ Thị Hòa và cs., 2013). Như vậy, rõ ràng TCT có hiện tượng chết với biểu hiện đỏ thân, đốm trắng sau khi du nhập vào Việt Nam được vài năm, nguyên nhân cũng được xác định ngay sau đó thông qua các báo cáo của các ban ngành có liên quan, tuy nhiên đến tận 2013 mới có

công bố ở dạng bài báo/tạp chí với số liệu khoa học về vấn đề TCT nhiễm WSSV. Gần đây nhất, một công bố cho biết đã xác định giun cát (*Perinereis* sp.), loại thức ăn tươi sống phổ biến cho tôm bố mẹ ở trang trại sản xuất tôm giống tại Nha Trang, Khánh Hòa nhiễm WSSV (32,07%) (Phan Thị Vân và cs., 2017).

Như vậy, đến nay ở Việt Nam đã công bố và xác nhận có 7 loài sinh vật mang WSSV, trong đó bao gồm 06 loài tôm thuộc nhóm giáp xác và 01 loài thuộc giun nhiều tơ. Ngoài ra có thêm 3 loài (mực, tôm tít và ốc mượn hồn) xác định có nhiễm WSSV nhưng kết quả được công bố dưới dạng báo cáo kỹ thuật. Việt Nam là nước có nghề nuôi tôm công nghiệp phát triển với kim ngạch xuất khẩu tôm lớn nhất trong số nhóm hàng xuất khẩu hàng năm ở Việt Nam (Bảng 1.1). Nếu công tác giám sát cảnh báo mối nguy lan truyền bệnh theo chiều ngang được thực hiện tốt và đầy đủ thì chắc chắn sản lượng xuất khẩu sẽ tăng do thiệt hại dịch bệnh do WSSV giảm. Song nghiên cứu về sinh vật mang WSSV còn nhiều hạn chế và chưa thực sự được quan tâm. Trên thế giới đến nay đã xác định được 153 loài sinh vật mang WSSV, như vậy so với thế giới kết quả nghiên cứu xác định số loài sinh vật mang WSSV còn rất khiêm tốn.

Các nước khác nhau trên thế giới có những đặc điểm khác nhau về địa lý, khí hậu…, vì vậy thành phần loài sinh vật cấu thành hệ sinh thái có khác nhau giữa các nước, do đó mặc dù nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra đa dạng và nhiều sinh vật mang WSSV, tuy nhiên khó để áp đặt vào Việt Nam. Kết quả nghiên cứu trên thế giới được áp dụng vào Việt Nam ở dạng là các tham chiếu, hay tham khảo để chúng ta tập trung hơn về nhóm loài đã công bố trên thế giới, ví dụ *Marphysa gravely* là loại giun nhiều tơ nhiễm WSSV như vậy khi nghiên cứu vật mang WSSV ở Việt Nam, chúng ta có cần quan tâm đến các loài thuộc giun nhiều tơ như rươi, giun cát, giun huyết…, tương tự như vậy cho các nhóm loài khác.

Tóm lại WSSV gây bệnh ở tôm nuôi nước lợ đã lưu hành ở Việt Nam từ năm 1993, đến nay WSD vẫn còn xảy ra ở hộ nuôi, vùng nuôi trên hầu hết các tỉnh thành có thực hành nuôi tôm ở Việt Nam. Một số vấn đề nghiên cứu liên

quan đến WSD đã thực hiện được bao gồm thông tin đầy đủ về WSSV gây bệnh ở tôm nuôi, phương pháp chẩn đoán bệnh (mô học, sinh học phân tử…), kiểm soát tốt bệnh lan truyền theo chiều dọc ở trong các trại sản xuất tôm giống thông qua kiểm dịch tôm bố mẹ trước khi sinh sản. Tuy nhiên, vẫn còn một số vấn đề còn tồn tại như biện pháp kiểm soát tôm nhiễm WSSV theo chiều ngang. Nguyên nhân được xác định do hộ nuôi chưa nghiêm túc thực hành tốt kỹ thuật trong quá trình nuôi, do thiếu thông tin về các loài sinh vật mang và có khả năng lan truyền WSSV cho tôm nuôi. Chính vì vậy, nghiên cứu xác định loài sinh vật mang và lan truyền WSSV cho tôm nuôi hết sức quan trọng và cần thiết.

PHẦN 3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Điều tra hộ nuôi và thu mẫu sinh vật tại ao nuôi tôm thâm canh, nguồn cấp nước vào ao lắng tại Hải Hòa-Quảng Ninh, Giao Thủy-Nam Định và Quỳnh Liên-Nghệ An.

Phân tích mẫu động vật thủy sinh mang WSSV tại Trung tâm Quan trắc Môi trường và Bệnh thủy sản miền Bắc (CEDMA), Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I (RIA1). Mẫu giải trình tự gen xác định tên loài động vật mang và lây truyền WSSV sang tôm thẻ nuôi được gửi tới Lab first base - Malaysia.

Thí nghiệm gây nhiễm xác định khả năng mang WSSV ở một số động vật bắt gặp chủ yếu ở vùng nuôi và khả năng lây truyền theo chiều ngang WSSV từ động vật mang WSSV đến tôm trong cùng 1 môi trường nuôi tại CEDMA, RIA1.

3.2. THỜI GIAN NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 6/2015 đến tháng 10/2017

3.3. ĐỐI TƯỢNG VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

3.3.1. Đối tượng nghiên cứu

Động vật thủy sinh gồm 632 mẫu (Nghệ An), 359 mẫu (Nam Định) và 441 mẫu (Quảng Ninh) thu ở ao nuôi TCT thâm canh và quanh khu vực nguồn cấp nước và phân tích chỉ tiêu WSSV, chi tiết được nêu ở Bảng 3.1. Chủ hộ nuôi tôm ở vùng nghiên cứu để thu thập thông tin các yếu tố nguy cơ.

3.3.2. Vật liệu nghiên cứu

Bộ câu hỏi thiết kế sẵn để thu thập thông tin phục vụ kết quả nghiên cứu nội dung xác định yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh do WSSV gây ra ở tôm.

Mẫu WSSV: TCT nhiễm WSSV được thu từ đầm nuôi TCT tại Quảng Ninh (1kg) và Hải Phòng (1kg), các mẫu được bảo quản ở tủ lạnh sâu (-80^{0}C). Mẫu thu và lưu giữ -80^{0}C là mẫu có biểu hiện điển hình của bệnh do WSSV gây ra, đồng thời kết quả dương tính với WSSV bằng kỹ thuật PCR, đây là nguồn nguyên liệu WSSV phục vụ thí nghiệm gây nhiễm. Cách chuẩn bị và xác định nồng độ copy WSSV/ml sử dụng trong gây nhiễm được chi tiết ở Mục 3.4.10

Bảng 3.1. Các loài sinh vật thu được ở vùng nghiên cứu

TT	Tên loài thu			Số mẫu thu ở mỗi tỉnh(*)		
	Nhóm loài	Tên gọi địa phương	Tên khoa học	Nghệ An	Nam Định	Quảng Ninh
1	Giáp xác	Tôm rảo	*Metapenaeus ensis*	15	22	17
		Tôm càng	*Macrobrachium nipponense*	17	19	19
		Tôm gai	*Exopalaemon carinicauda*	30	22	20
		Cáy đỏ	*Uca arcuata*	22	21	23
		Còng lông	*Macrophthalmus convexus*	15	0	14
2	Lưỡng cư	Nòng nọc ếch	*Tylototriton sp*	20	0	21
3	Nhuyễn thể	Ốc đinh	*Cerithium cingulata*	38	40	34
		Vẹm	*Mytilus sp*	8	10	25
		Dắt	*Corbula erythrodon*	9	0	0
4	Cá	Cá bống	*Gobius sp*	150	0	3
5	Giun nhiều tơ		*Nephthys polybranchia*	3	0	1
6	Luân trùng		*Branchionus caudatus*	28	0	0
			Branchionus angularis	32	39	39
			Branchionus budapestinensis	35	33	0
			Branchionus calyciflorus	29	0	31
			Branchionus plicatilis	31	0	29
			Branchionus ucreus	35	32	31
			Polyarthra vulgaris	24	26	0
7	Giáp xác chân chèo		*Microsetella norvegica*	21	15	19
			Neocalanus gracilis	26	28	21
			Oithona nana	19	31	29
			Schomackeria gordioides	0	0	33
			Euterpia acutifrons	25	21	32
Tổng số mẫu				**632**	**359**	**441**

Ghi chú: (*): Mẫu thu được bao gồm trong ao nuôi, kênh cấp và ao lắng

Động vật thủy sinh sử dụng gây nhiễm xác định khả năng mang và lan truyền WSSV cho TCT nuôi trong cùng điều kiện môi trường nuôi nhốt. Cáy đỏ, tôm càng, tôm gai và ốc đinh thu được gom tại ao lắng của nông hộ tại Nam Định, trong khi đó nòng nọc ếch và cá bống được thu gom tại ao lắng và ao nuôi tôm của nông hộ tại Nghệ An. Số lượng thu gom được trong 1 tuần sẽ chuyển về

phòng thí nghiệm ướt tại CEDMA, RIA1 để tiến hành bố trí thí nghiệm. Bằng cảm quan, các động vật thủy sinh lựa chọn đưa vào thí nghiệm khỏe, phản xạ nhanh khi có tiếng động (cáy, tôm, cá bống và nòng nọc), đồng thời cáy không bị gãy chân và càng. Sau thời gian nuôi nhốt mỗi loài cùng nhau trong môi trường, lấy ngẫu nhiên 05 mẫu/loài để kiểm tra phân tích đầu vào của thí nghiệm, kết quả âm tính với chỉ tiêu WSSV.

Hệ thống bể thí nghiệm bao gồm 2 loại kích thước khác nhau, loại 1 là bể composit có thể tích 300 lít (20 cái), loại 2 có thể tích 20 lít (20 cái). Hệ thống sục khí, nước vào và nước ra được thiết kế đúng quy định của phòng thí nghiệm ướt cho đối tượng nuôi thủy sản, bên cạnh đó các nguyên liệu khác đã được chuẩn bị như chlorine-70, vợt, gáo, rổ nhựa, ống xi phông bể, xi ranh tiêm (1ml), muối biển để pha nước nuôi tôm đạt tiêu chuẩn dùng trong thủy sản.

Bảng 3.2. Cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Tên cặp mồi	Trình tự primer
WSSV366	366-F: 5′–GAG ACG TCG CTC ATC AAA GAT GGG GAA G-3′
	366R: 5′–GAA ACC TGG ACC ATA TTG AAT ACG GCC AG-3
COI	LCOI490 GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
	HCO2198 TAAACTTCAGGGTGACCAAA AAATCA

Nghiên cứu đã sử dụng 2 cặp mồi bao gồm cặp mồi WSSV366 sử dụng phát hiện WSSV trong mẫu cần phân tích và cặp mồi COI sử dụng giám định loài thuộc giáp xác, trình tự primer của 2 cặp mồi được nêu ở Bảng 3.2. Thành phần phản ứng PCR và danh mục bộ kít được sử dụng trong nghiên cứu được trình bày tại Bảng 3.3 và Bảng 3.4.

Bảng 3.3. Thành phần phản ứng để khuyếch đại ADN

TT	Tên hóa chất	Hãng sản xuất	Lượng hóa chất
1	Marter mix	Thermo	12,5 µl
2	Mồi xuôi		0,75 µl
3	Mồi ngược		0,75 µl
4	H_2O		10 – 10,5 µl
5	ADN tách chiết		0,5 - 1 µl
Tổng			**24,5-25,5 µl**

Bảng 3.4. Danh mục bộ kít sử dụng trong nghiên cứu

TT	Danh mục	Hãng sản xuất	Mục đích
1	Kít QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	Tinh sạch ADN
2	Kít tách chiết AND	Qiagen	Tách chiết ADN
3	Kít tách chiết ARN, IQ2000	GeneRearch Biotechnology	Tách chiết ARN
4	RevertAid First Strand cDNA Synthesis	Thermo	Tổng hợp cDNA

3.3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Để đạt được mục tiêu nghiên cứu đã nêu, đề tài tiến hành thực hiện nội dung như sau:

- Điều tra hiện trạng vùng nuôi, đánh giá mối nguy liên quan đến tôm nuôi bị bệnh đốm trắng tại Quảng Ninh, Nghệ An và Nam Định thông qua bộ câu hỏi.

- Tình hình bệnh đốm trắng ở tôm nuôi xuất hiện tại vùng nghiên cứu.
- Xác định yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh đốm trắng ở tôm.

- Nghiên cứu xác định động vật thủy sinh chủ yếu mang WSSV tại vùng nuôi tôm nước lợ ở Nghệ An, Nam Định và Quảng Ninh.

- Xác định động vật thủy sinh nhiễm WSSV thu được trong điều kiện tự nhiên.
- Xác định động vật thủy sinh chủ yếu mang WSSV trong điều kiện thí nghiệm gây nhiễm.

- Nghiên cứu xác định khả năng lan truyền WSSV từ động vật thủy sinh sang tôm chân trắng trong cùng môi trường nuôi.

- Xác định khả năng WSSV từ động vật thủy sinh lây truyền sang tôm theo phương thức lây truyền ngang trong điều kiện thí nghiệm.
- Giám định loài động vật thủy sinh chủ yếu mang và lây truyền WSSV sang tôm chân trắng bằng sinh học phân tử.

3.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Để thực hiện các nội dung đề tài và đạt được mục tiêu đã đề ra, nghiên cứu được thực hiện theo ba bước thể hiện tổng quát ở Hình 3.1. Cụ thể:

Hình 3.1. Sơ đồ các bước triển khai của nghiên cứu

1) Điều tra thu thập các thông tin, số liệu liên quan đến quản lý ao nuôi thông qua bộ câu hỏi được chuẩn bị trước (phụ lục 1.1). Từ kết quả thu được phân tích xác định mối nguy dẫn đến tôm nuôi nhiễm bệnh do WSSV, đồng thời xác định loài sinh vật thường bắt gặp ở ao nuôi, ao lắng và kênh cấp nước.

2) Các mẫu động vật thủy sinh xuất hiện ở vùng nuôi cũng được tiến hành thu, cố định và chuyển về phòng thí nghiệm phân tích chỉ tiêu WSSV, kết quả xảy ra cả 2 trường hợp (có loài động vật dương tính với WSSV và có loài âm tính với WSSV).

3) Lựa chọn mẫu động vật chủ yếu xuất hiện phần nhiều về số lượng đưa vào bố trí thí nghiệm gây nhiễm WSSV. Loài động vật đưa vào gây nhiễm đảm bảo 3 tiêu chí: có kết quả âm tính với WSSV ở bước nghiên cứu thứ 2, không phải là động vật phù du và loài chưa được công bố mang WSSV tại Việt Nam. Số loài có kết quả dương tính với WSSV trong điều kiện tự nhiên và số loài mang/nhiễm WSSV trong điều kiện thí nghiệm tiếp tục tiến hành thử nghiệm xác

định khả năng lây truyền WSSV từ động vật mang virus sang TCT khi nuôi trong cùng một môi trường.

3.4.1 Phương pháp điều tra

Xây dựng bộ câu hỏi (phụ lục1.1), dựa vào đó để thu thập các số liệu liên quan đến tình hình nuôi tôm, xác định được mối nguy có khả năng ảnh hưởng đến bệnh đốm trắng ở tôm nuôi của các nông hộ. Bộ câu hỏi được xây dựng và điều tra thử tại 10 hộ nuôi tôm ở Nghệ An, sau đó chỉnh sửa, bổ sung trước khi tiến hành điều tra chính thức ở các vùng nghiên cứu. Phương pháp điều tra được thiết kế và sử dụng các kỹ thuật cơ bản của nghiên cứu cắt ngang ở nhiều thời điểm.

. Cách chọn hộ điều tra là ngẫu nhiên đơn, cụ thể: bước 1, lập danh sách và đánh số thứ tự một cách ngẫu nhiên từ 1 đến n hộ tương ứng mỗi tỉnh. Bước 2, sử dụng 1 hộp có chứa mẫu giấy nhỏ ghi số thứ tự, bốc thăm ngẫu nhiên 50 mẫu giấy, ký hiệu trên mẫu giấy tương ứng với tên hộ lựa chọn điều tra. Số liệu được nhập để xử lý, trong số đó 1 số phiếu điều tra có nhiều thông tin hộ nuôi không nhớ rõ được cho là không hợp lệ, loại bỏ, vì vậy cuối cùng số phiếu điều tra tại vùng nghiên cứu lần lượt là 50/72 (chiếm 69,4%) ở Quỳnh Liên-Nghệ An, 45/69 (chiếm 65,2%) ở Giao Thủy-Nam Định và 49/69 (chiếm 71%) ở Hải Hòa-Quảng Ninh.

3.4.2 Phương pháp thu, bảo quản và định danh loài động vật thủy sinh

Đối với động vật phù du: dùng vợt chuyên dụng thu mẫu động vật phù du cho xuống ao và quay theo hình số 8 hoặc zic zắc trong thời gian 2-5 phút (tùy thuộc vào ao nhiều hay ít động vật phù du). Tại 1 điểm thu ba lọ (100mL/lọ) (trong đó một lọ cố định bằng formalin 5-7% và 2 lọ cố định trong cồn 70^0).

Đối với tôm rảo, tôm càng, tôm gai và cá bống: mẫu được thu bằng cách cho thức ăn thường ngày của tôm vào sàng cho tôm ăn, các loài động vật này sẽ vào sàng ăn thức ăn của tôm nuôi, sau 15-30 phút nhấc sàng lên và thu mẫu.

Đối với giun nhiều tơ, nghêu/dắt, vẹm và ốc đinh: dùng gầu đáy (dài 12cm x rộng 10,5cm) thu 3 gầu ở 3 vị trí khác nhau trong kênh cấp nước để thu mẫu. Sau đó cho vào sàng động vật đáy để sàng cho sạch đất và rác. Dùng kẹp nhặt động vật cho vào lọ cố định mẫu.

Đối với cáy đỏ và còng lông: thu bằng bẫy chai nhựa (sử dụng chai nhựa cắt bỏ đáy sao cho chiều dài chai còn lại khoảng 20cm, sử dụng đầu chai thành đáy bẫy, xung quanh thành chai có các lỗ nhỏ thoát khí. Cho bột cám rang vàng và 1 ít cá để ươn vào đáy bẫy) đặt nghiêng vào các vệ bờ/vùng thu mẫu hoặc chôn bẫy xuống đất sao cho mép miệng bẫy cách mặt đất 1-2cm, khi con cáy/còng đi kiếm mồi bò rơi vào bẫy. Sau 2-3 tiếng kiểm tra bẫy 1 lần và thu mẫu cáy/còng đã vào bẫy. Chọn thời điểm sáng sớm hoặc chiều mát loài động vật này sẽ ra tìm mồi ăn để đặt bẫy.

Đối với nòng nọc ếch: thu bằng vợt. Các mẫu động vật thủy sinh thu được nêu trên cố định trong cồn 70^0, tỷ lệ mẫu: cồn = 1:10.

Định danh loài động vật thủy sinh theo đặc điểm hình thái học dựa vào tài liệu của Abbot and Dance, 2000; Nguyễn Văn Khôi, 2001; Đặng Ngọc Thanh và cs., 1980; Đặng Ngọc Thanh và Hồ Thanh Hải., 2001a, 2001b).

3.4.3 Phương pháp phân tích mẫu động vật thủy sinh bằng sinh học phân tử

Trong nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật PCR để phân tích mẫu 1) phân tích WSSV trong mẫu động vật thủy sinh thu trong tự nhiên tại vùng nghiên cứu, 2) xác định WSSV nhân lên trong tế bào vật chủ ở điều kiện thí nghiệm gây nhiễm và 3) tinh sạch mẫu ADN trước khi giải trình tự gen WSSV thu ở mẫu nhiễm trong điều kiện tự nhiên và giám định loài động vật mang và lan truyền WSSV cho tôm chân trắng, chi tiết các bước phương pháp liên quan đến PCR được nêu ở Hình 3.2.

3.4.4 Phương pháp tách chiết ADN

Nội dung nghiên cứu liên quan đến tách chiết ADN để phát hiện WSSV trong mẫu động vật thủy sinh thu tại vùng nghiên cứu. Tách chiết ADN để giám định đối với loài động vật thủy sinh có kết quả đã mang và lan truyền WSSV sang cho TCT khi nuôi cùng trong điều kiện môi trường.

3.4.4.1. Chuẩn bị mẫu

Đối với mẫu động vật phù du (luân trùng và giáp xác chân chèo): một lọ mẫu cố định trong cồn được ly tâm ở 10.000-12.000 vòng/phút trong 15 phút, sau đó loại bỏ dịch nổi trên và thu lấy cặn dưới cho vào ống eppendorf.

Đối với mẫu động vật thủy sinh còn lại: một phần mẫu (khoảng 25mg) được cắt bằng kéo và cho vào ống eppendorf vô trùng.

Đối với mẫu cặn bể (trong bể thí nghiệm cảm nhiễm): lấy một phần nhỏ mẫu, khoảng 10g hòa tan vào trong 100ml dung dịch nước nuối 2‰, ly tâm 2.000 vòng/phút trong 15 phút. Loại bỏ cặn, lấy phần dịch nổi, sau đó tiếp tục ly tâm phần dịch nổi 12.000 vòng/phút trong 15 phút và loại bỏ phần dịch nổi, thu lấy phần cặn, cho dung dịch vào tách chiết.

Đối với mẫu nước ở bể thí nghiệm gây nhiễm: 100ml được lọc qua filter 0,2µm. Lấy toàn bộ phần nước phía dưới filter và ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút và loại bỏ phần dịch nổi, thu lấy phần cặn.

Đối với mẫu giám định loài: sử dụng 10mg thịt tôm/cua nghiền nhỏ, nhuyễn và mịn trong ống eppendorf 1,5ml bằng chày nhựa.

Hình 3.2. Sơ đồ phân tích mẫu động vật thủy sinh sử dụng kỹ thuật PCR

3.4.4.2. Tách chiết ADN

Proteinase K (20µL) và 180µL dung dịch đệm ATL được cho vào ống eppendorf chứa mẫu đã chuẩn bị trên, đảo trộn đều bằng vortex; ủ mẫu ở 56^0C trong khoảng 2h, đảo trộn đều trong quá trình ủ; thêm 20 µl Rnase A, đảo trộn đều, ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút; tiếp đến thêm 200 µl lysis solution, đảo

trộn đều bằng vortex cho đến khi hỗn hợp đồng nhất; bổ sung 400 µl ethanol 50%, đảo trộn đều bằng pipet.

Chuyển dịch đã được chuẩn bị lên cột tinh sạch (tối đa 800 µl), ly tâm cột 6000g, 1 phút, loại phần dịch dưới cột; tiếp đến rửa lại bằng 500 µl wash buffer I, ly tâm 8000g, 1 phút, loại dịch dưới cột; rửa lần 2 bằng 500 µl wash buffer II, ly tâm 8000g (1 phút); các bước thực hiện tiếp theo thực hiện theo quy trình của Qiagen-DNA. ADN tách chiết được sử dụng thực hiện các bước tiếp theo của PCR, số lượng ADN còn lại được bảo quản ở - 20^{o}C.

3.4.5. Phương pháp tách chiết ARN

Nhằm loại bỏ khả năng mẫu phân tích có kết quả dương tính với WSSV do có sự bám dính bên ngoài hay do ADN "chết" vẫn lưu trong cơ thể động vật cảm nhiễm, đề tài tiến hành phân tích tổng hợp cDNA đối với mẫu gây nhiễm. Khi gây nhiễm WSSV vào động vật thí nghiệm, virus sống sẽ được nhân lên trong tế bào vật chủ. Chỉ thị cho quá trình này là sự hiện diện của các ARN thông tin (mRNA). Đặc biệt, WSSV là ADN virus, do đó, việc phát hiện mRNA của virus từ mẫu tách chiết (đã xử lý Dnase) là bằng chứng cho thấy sự nhân lên của virus, các bước thực hiện được mô tả theo sơ đồ Hình 3.2

Tách chiết ARN

Mẫu cần phân tích (khoảng 10g) được nghiền nhỏ, nhuyễn và mịn bằng chày nhựa trong ống eppendorf có chứa khoảng 100-200µL dung dịch tách chiết, sau đó nhỏ thêm vào khoảng 400-500µL dung dịch tách chiết và tiếp tục nghiền bằng chày đến khi mẫu nhuyễn, để hỗn dịch nghiền nhỏ ở nhiệt độ phòng trong thời gian khoảng 5 phút.

Cho vào 100µl chloroform ($CHCl_3$), lắc trên máy khuấy trộn khoảng 20 giây, để ở nhiệt độ phòng trong khoảng 3 phút rồi ly tâm 12.000 vòng/phút trong thời gian 15 phút. Chuyển 200µL phần dịch nổi sang 1 ống eppendorf mới có chứa 200µL isopropanol, lắc nhẹ nhàng. Ly tâm 12000 vòng/phút trong thời gian 10 phút, sau đó loại bỏ isopropanol, rửa với 500µL cồn 75%, ly tâm 9000 vòng/phút trong thời gian 5 phút. Tiếp đến, loại bỏ cồn và làm

khô, hòa tan ARN bằng nước tinh khiết với lượng khoảng từ 50-100µL tùy thuộc vào lượng ARN tách chiết được.

3.4.6. Tổng hợp cDNA

Sau khi có được dung dịch có chứa ARN ở mục 3.4.6, tiến hành tổng hợp cDNA bằng cặp mồi WSSV366 (Bảng 3.2) có kích thước sản phẩm là 161 bp và các hóa chất như sau để đạt được tổng thể tích là 10µL, cụ thể nêu ở Bảng 3.5

Bảng 3.5. Thành phần của phản ứng tổng hợp cDNA

STT	Thành phần phản ứng	Thể tích (µL)
1	ARN tổng số	5
2	Mồi xuôi	0,5
3	Mồi ngược	0,5
4	H_2O	4
	Thể tích tổng số	**10**

Thêm các chất theo thứ tự sau vào ống eppendorf thứ 2 như nêu ở Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Thành phần của phản ứng tổng hợp cDNA

STT	Thành phần phản ứng	Nồng độ	Thể tích (µL)
1	Đệm 5x	5X	4
2	dNTPs	10mM	2
3	Enzyme RT	10.000U	2
	Thể tích tổng số		**8**

Trộn đều hai hỗn hợp (Bảng 3.5 và Bảng 3.6) với nhau thành một hỗn hợp và tiến hành ly tâm nhanh với mục đích để toàn bộ hóa chất vật liệu không bám phía trên thành ống eppendorf, thể tích tổng số của hỗn hợp là 18 µL sau đó ủ mẫu ở chu trình nhiệt độ như Bảng 3.7:

Bảng 3.7. Chu trình nhiệt của phản ứng tổng hợp cDNA

Bước	Giai đoạn	Nhiệt độ (^oC)	Thời gian
1	Ủ	25	5 phút
2	Tiến hành phản ứng	37	60 phút
3	Kết thúc phản ứng	70	5 phút
4	Bảo quản	4	∞

Sau khi có được cDNA, bước tiếp theo được thực hiện lần lượt các bước trong Mục 3.4.7 được nêu sau.

3.4.7. Khuyếch đại ADN

Sau khi đã tách chiết và có được ADN của mẫu, dung dịch có chứa ADN được cho vào hỗn hợp chứa các thành phần hóa chất nêu ở Bảng 3.3.thuộc mục 3.3.2 nhằm khuyếch đại ADN. Hóa chất và mẫu ADN được trộn vào với nhau bằng máy khuấy trộn (vortex) sau đó cho vào máy luân nhiệt để khuyếch đại ADN với chu trình nhiệt nêu ở Bảng 3.8 thuộc mục 3.4.8 tương ứng với từng cặp mồi sử dụng.

Sau đó sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên thạch agarose, ở điều kiện 130V trong khoảng thời gian 30 phút, sau đó mẫu được nhuộm bằng dung dịch Ethidium bromide (2µg/mL) trong bóng tối 15-20 phút, trước khi đọc kết quả dưới đèn UV bản gel được rửa qua nước cất.

3.4.8. Chu trình nhiệt của PCR

Trong nội dung nghiên cứu, đề tài đã sử dụng 2 cặp mồi bao gồm WSSV366 (phát hiện WSSV) và cặp mồi COI (giám định loài). Chu trình nhiệt tương ứng trong phản ứng PCR tương ứng với mỗi cặp mồi được chi tiết ở Bảng 3.8.

Bảng 3.8. Chu trình nhiệt các giai đoạn trong quá trình PCR

TT	Gian đoạn	Căp mồi WSSV366	Cặp mồi COI	Chu trình
1	Khởi đầu	94^{o}C trong 7 phút	95^{0}C trong 3 phút	1
2	Biến tính	94^{o}C trong 30 giây	95^{0}C trong 30 giây	35
3	Gắn mồi	55^{0}C trong 30 giây	56^{0}C trong 30 giây	
4	Kéo dài	72^{0}C trong 60 giây	72^{0}C trong 40 giây	
5	Kết thúc kéo dài	72^{o}C trong 10 phút	72^{0}C trong 5 phút	1
6	Bảo quản	4^{o}C (∞)	4^{0}C (∞)	1

3.4.9. Tinh sạch ADN

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kít QIAquick PCR Purification Kit, với các bước sau: Thêm dung dịch đệm PB vào sản phẩm PCR theo tỷ lệ 5:1 (5 dung dịch đệm: 1 sản phẩm PCR), trộn đều bằng pipet.

Chuyển toàn bộ sang cột lọc và ly tâm 13.000 vòng trong 1 phút, rồi loại bỏ dịch ở dưới, giữ lại cột lọc. Rửa bằng cách thêm 0,75mL dung dịch PE lên màng của cột lọc, tiếp đến ly tâm 13.000 vòng trong 1 phút rồi loại bỏ dịch dưới, giữ lại cột. Chuyển cột sang ống eppendorf mới 1,5mL rồi thêm 50µL buffer EB/nước cất (RNAse-, DNAse free) lên màng cột và ly tâm 13.000 vòng trong 1 phút. Lúc này bỏ cột và giữ lại dung dịch phía dưới ống eppendorf.

Sản phẩm đã tinh sạch được gửi giải trình tự gen tại Lab first base - Malaysia và kết quả giải trình tự được tham chiếu trên ngân hàng gen tại địa chỉ.

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

3.4.10. Định lượng nồng độ WSSV bằng kỹ thuật Real time PCR

Kỹ thuật Real time PCR với chất huỳnh quang là SYBR Green I được sử dụng để đánh giá nồng độ của virus. Thành phần của phản ứng Real time PCR được nêu chi tiết ở Bảng 3.9

Bảng 3.9. Thành phần phản ứng Real time PCR

TT	Thành phần	Thể tích (µl)
1	Đệm 10X ($+Mg^{2+}$)	2
2	2,5mM dNTPs	1,6
3	Enzyme *hotstart Taq*	0,2
4	10µM Mồi (F +R)	0,4
5	SYBR Green	0,2
6	ADN	10
7	H_2O	5,6
	Tổng thể tích	20

Với chu trình nhiệt tối ưu được thực hiện với khởi đầu ở 95^0C trong 15 phút, tiếp đến với 35 chu kỳ gồm 3 bước: 1) biến tính ADN ở 95^0C trong 15 giây, 2) gắn mồi ở 60^0C trong 1 phút và 3) kéo dài ở 65^0C trong 1 phút.

3.5. GÂY NHIỄM XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG MANG WSSV CỦA ĐỘNG VẬT THỦY SINH

Bố trí thí nghiệm gây nhiễm cho 5 loài , trong đó 01 loài (cáy đỏ) được sử dụng phương pháp gây nhiễm là tiêm, 4 loài còn lại có kích thước nhỏ được sử dụng phương pháp ngâm.

3.5.1. Gây nhiễm WSSV lên động vật thủy sinh bằng hình thức tiêm

Cáy đỏ (trọng lượng 30-35con/kg) và TCT được chuẩn bị ở mục 3.3 Thí nghiệm được bố trí ở điều kiện nhiệt độ từ 27-29^{o}C, độ mặn từ 10-12‰, thức ăn sử dụng cho cáy là bột cám rang vàng. Phương pháp cảm nhiễm được áp dụng theo (Wu *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2004), cụ thể được mô tả ở Hình 3.3. Sử dụng mẫu mang tôm có trọng lượng khoảng 0,1g được xác định dương tính với WSSV nghiền nhỏ trong 1 mL dung dịch đệm (20 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH 7,4). Hỗn dịch sau đó được ly tâm với tốc độ 2000 vòng trong 10 phút, thu dịch nổi trên pha loãng 1:100 (10^{-2}) với nước muối 0,9% và lọc qua màng lọc 0,45µm. Sử dụng 0,1mL dịch qua lọc (tương ứng 1,02x10^{6} copy/mL đã được xác định bằng kỹ thuật Real-time PCR) tiêm lên gốc chân thứ 2 tính từ càng của cáy đỏ. Phương pháp xác định số copy WSSV/ml dựa vào kỹ thuật Real time PCR (cụ thể nêu ở mục 3.4.10).

Hình 3.3. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định khả năng WSSV nhân lên trong tế bào động vật thủy sinh bằng phương pháp tiêm

3.5.2. Gây nhiễm WSSV lên động vật thủy sinh bằng hình thức ngâm

Áp dụng phương pháp gây nhiễm bằng hình thức ngâm của Chen *et al.*, (2004), cụ thể được mô tả ở Hình 3.4. Chuẩn bị dịch lọc chứa WSSV: Lấy 1,5g mẫu mang tôm được xác định dương tính với WSSV cho vào 30 mL nước có độ mặn 8-10‰, chúng được nghiền nhỏ và trộn đều bằng vortex, sau đó ly tâm ở 3000 vòng trong 10 phút ở 4^0C. Thu dịch nổi lọc qua màng lọc 0,45µm, bổ sung thêm nước muối 8-10‰ khử trùng vào phần dung dịch thu được dưới màng lọc để được thể tích cuối cùng đạt 1050 mL ở dung dịch này số lượng bản sao ADN của WSSV đạt 1,31 x10^7copy/mL (được xác định bằng kỹ thuật Real-time PCR).

Ngâm động vật thủy sinh trong 1050 mL trong 2 giờ, sau đó chuyển sang nuôi trong môi trường không chứa dịch WSSV và chăm sóc theo dõi như lô thí nghiệm đối chứng. Thí nghiệm bố trí trong điều kiện có độ mặn 8-10‰ và nhiệt độ 27-29^0C, có sục khí cung cấp oxi suốt trong thời gian thí nghiệm.

Đối với số động vật thủy sinh không nhiễm WSSV theo thí nghiệm mô tả trên, đề tài tiếp tục thực hiện thí nghiệm và có điều chỉnh không chuyển động vật thủy sinh ngâm trong 1050 mL chứa WSSV sang môi trường nuôi khác không chứa WSSV mà thay vào đó là bổ sung nước vào 1050 mL và tiếp tục nuôi, chăm sóc và theo dõi.

3.6. GÂY NHIỄM XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG LAN TRUYỀN WSSV TỪ ĐỘNG VẬT THỦY SINH SANG TCT TRONG CÙNG MÔI TRƯỜNG NUÔI

Kế thừa kết quả nghiên cứu mục 3.5, xác định loài động vật mang WSSV, đề tài tiếp tục nghiên cứu khả năng lan truyền WSSV từ động vật mang sang TCT nuôi trong cùng môi trường nuôi.

Thí nghiệm được bố trí theo Hình 3.5 đối với hình thức gây nhiễm tiêm và Hình 3.6 đối với hình thức gây nhiễm ngâm. Trong quá trình thí nghiệm theo dõi biểu hiện bệnh lý của cáy đỏ và tôm, đồng thời thu mẫu động vật thí nghiệm (TCT và cáy) khi có dấu hiệu bất thường (yếu, lờ đờ).

1.

Hình 3.4. Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định khả năng WSSV nhân lên trong tế bào động vật thủy sinh bằng phương pháp ngâm

Hình 3.5. Sơ đồ thí nghiệm xác định khả năng lan truyền WSSV từ cáy đỏ sang tôm chân trắng

Hình 3.6. Sơ đồ thí nghiệm xác định khả năng lan truyền WSSV từ tôm càng, tôm gai sang tôm chân trắng

3.7. PHÂN TÍCH VÀ XỬ LÝ SỐ LIỆU

- Số liệu được xử lý dựa vào phần mềm SPSS 17.0 và thống kê mô tả Excel 2007

Các biến số chính trong bộ câu hỏi điều tra được phân tích cùng biến ao nuôi xuất hiện bệnh đốm trắng theo mô tả ở Bảng 3.10.

- Tính OR (Odds ratio)-Tỷ số chênh

OR = Số chênh nhóm phơi nhiễm/Số chênh nhóm không phơi nhiễm

= (O_{E+}/O_{E-}) = (a/b)/(c/d) = (a*d)/(b*c)

Trong đó: a phơi nhiễm có bệnh, b: phơi nhiễm không bệnh, c: không phơi nhiễm bị bệnh và d: không phơi nhiễm không bệnh

OR = 1: Không có sự khác nhau giữa nhóm phơi nhiễm và không phơi nhiễm

OR > 1: Yếu tố phơi nhiễm làm tăng nguy cơ bệnh

OR < 1: Yếu tố phơi nhiễm làm giảm nguy cơ bệnh (= yếu tố bảo vệ)

- Xử lý số liệu định tính kết quả động vật chủ yếu mang virus đốm trắng

Tỷ lệ mẫu động vật nhiễm WSSV được tính theo công thức sau:

Tỷ lệ nhiễm (%): A%=(n/N)x 100%

Trong đó A: tỷ lệ nhiễm, n: số cá thể nhiễm WSSV và N: số cá thể nghiên cứu

Bảng 3.10. Yếu tố phân tích mô tả và xác định nguy cơ tiềm năng

TT	Yếu tố	Phân tích mô tả	Phân tích nguy cơ
Theo không gian			
1	Diện tích ao nuôi	x	x
2	Số ao nuôi/hộ	x	
3	Nước lấy vào ao qua ao lắng	x	x
4	Nước lấy vào ao trực tiếp từ kênh cấp	x	x
5	Mực nước duy trì trong ao nuôi	x	x
6	Loại hóa chất xử lý nước nuôi tôm	x	
7	Cấp/bổ sung nước trong quá trình nuôi	x	x
8	Quá trình lấy nước có sử dụng lưới lọc	x	x
Theo thời gian			
9	Thời gian thả tôm nuôi	x	
10	Số vụ nuôi tôm trong 1 năm	x	
11	Thời điểm tôm bệnh đốm trắng	x	
12	Thường xuyên kiểm tra môi trường ao nuôi		x
13	Nguyên nhân TCT nuôi bị bệnh đốm trắng	x	
14	Giải pháp áp dụng khi tôm bệnh đốm trắng	x	
15	Ao nuôi nằm trong vùng có tôm bệnh đốm trắng		x
Theo đối tượng			
16	Nguồn tôm giống	x	
17	Mật độ thả	x	x
18	Cỡ tôm giống	x	x
19	Hoạt động giảm sốc khi thả tôm	x	x
20	Sinh vật khác tôm nuôi xuất hiện trong vùng nuôi tôm	x	x

PHẦN 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. ĐIỀU TRA HIỆN TRẠNG VÙNG NUÔI, ĐÁNH GIÁ MỐI NGUY LIÊN QUAN ĐẾN TÔM NUÔI BỊ BỆNH ĐỐM TRẮNG TẠI QUẢNG NINH, NAM ĐỊNH VÀ NGHỆ AN

Điều tra thu thập các thông tin, số liệu liên quan đến quản lý chăm sóc ao nuôi TCT thâm canh tại nông hộ và sự xuất hiện của động vật thủy sinh ở vùng nuôi. Mục đích của nội dung điều tra nhằm nghiên cứu dịch tễ học của WSD ở TCT trong mô hình nuôi thâm canh tại Quảng Ninh, Nam Định và Nghệ An. Qua đó xác định yếu tố nguy cơ ảnh hưởng đến tôm nuôi nhiễm WSD, đặc biệt vai trò của loài động vật giáp xác đến hiện tượng tôm nhiễm WSD. Kết quả đạt được là cơ sở khoa học xây dựng giải pháp (như phòng ngừa và kiểm soát WSD) nhằm giảm thiểu tôm nhiễm WSD, nâng cao tỷ lệ sống, tăng năng suất thu hoạch, tăng thu nhập cho người nuôi.

Thông tin điều tra tập trung vào các yếu tố nêu ở Bảng 3.10, các yếu tố này được xác định có vai trò quan trọng ảnh hưởng đến WSD ở tôm nuôi nước lợ nói chung và TCT nói riêng (Nguyễn Văn Hảo và cs., 2007; Umesh *et al.*, 2008; Phan Quốc Việt và cs., 2011). Tuy nhiên mức độ ảnh hưởng của mỗi yếu tố đến tôm nhiễm bệnh do WSSV phụ thuộc vào cụ thể từng vùng nuôi và mô hình nuôi tôm.

Ao nuôi TCT thâm canh bị bệnh đốm trắng do virus gây ra vẫn xuất hiện và diễn ra hàng năm tại vùng nghiên cứu Hải Hòa - Quảng Ninh, Quỳnh Liên - Nghệ An và Giao Thủy - Nam Định. Diễn biến của bệnh phức tạp, không theo quy luật và không dự báo trước. Đến nay, cũng như các vùng nuôi tôm khác trên cả nước, các hộ nuôi tại đây chưa có biện pháp hữu hiệu trong công tác phòng trị bệnh đốm trắng ở tôm. Mặc dù còn gặp nhiều khó khăn trong quá trình sản xuất, đặc biệt tình hình dịch bệnh song Nghệ An, Nam Định và Quảng Ninh là 3 trong số 5 tỉnh nuôi tôm lớn nhất miền Bắc. Trong đó, Quỳnh Liên, Giao Thủy và Hải Hòa được biết đến là địa phương trọng điểm về nuôi tôm thâm canh và sản lượng

tôm nuôi đạt được chiếm ưu thế trong toàn tỉnh. Chính vì vậy, chúng tôi lựa chọn các vùng nuôi này để triển khai nghiên cứu, kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học cho nghiên cứu về giải pháp sinh học kiểm soát ngăn chặn nguy cơ tôm nhiễm bệnh đốm trắng.

4.1.1. Thông tin chung về hiện trạng quản lý và bệnh đốm trắng ở tôm nuôi tại vùng nghiên cứu

Hiện trạng vùng nuôi tôm sẽ được tổng hợp, phân tích theo nguyên tắc của dịch tễ học mô tả: theo không gian (diện tích ao nuôi, số ao nuôi, nguồn nước nuôi…), theo thời gian (thời gian thả nuôi tôm, mùa vụ thả, thời gian tôm nhiễm bệnh….) và theo đối tượng (nguồn gốc giống tôm thả, mật độ, cỡ thả nuôi…).

4.1.1.1. Thực trạng về nuôi tôm tại vùng nghiên cứu theo không gian

Tại các hộ nuôi TCT ở Nghệ An, Nam Định và Quảng Ninh, 100% hộ nuôi được điều tra cho biết trong 3 năm trở lại đây tôm Sú có xu hướng giảm xuống và thay thế vào đó là TCT có chiều hướng tăng lên cả số lượng và diện tích. Bên cạnh đó, mô hình nuôi thâm canh và bán thâm canh chiếm ưu thế hơn so với nuôi quảng canh tại vùng nghiên cứu. TCT được xác định phù hợp với mô hình nuôi thâm canh điều kiện khí hậu đặc thù ở khu vực miền Bắc Việt Nam. Ở nội dung này thực trạng vùng nuôi TCT thâm canh được mô tả về mặt không gian theo nguyên tắc của dịch tễ học.

Diện tích của ao nuôi tôm chân trắng thâm canh ở Nam Định nhỏ nhất (0,05ha/ao) trong khi đó ở Quảng Ninh là 0,2ha/ao và Nghệ An là 0,3ha/ao (Bảng 4.1), theo đó tổng diện tích nuôi tôm trung bình ở Nam Định thấp nhất (trung bình 0,9 ha±0.1), tiếp đến Nghệ An (trung bình 1,2 ha±0.2) và cao nhất ở Quảng Ninh (trung bình 1,4 ha±0.2) (Bảng 4.1). Mỗi hộ nuôi thuộc mỗi tỉnh sở hữu số ao nuôi khác nhau, dao động từ 1-8 ao/hộ (Nam Định), 1-9 ao/hộ (Quảng Ninh) và 1-11 ao/hộ (Nghệ An).

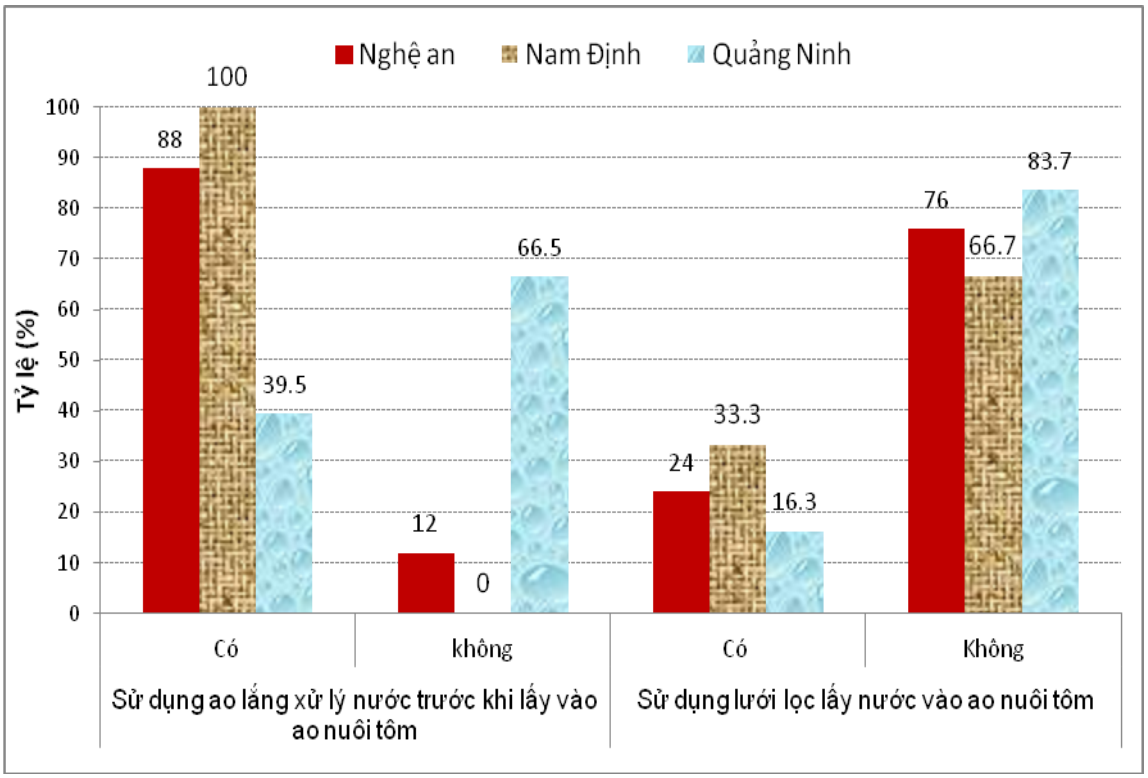
Bảng 4.1. Diện tích nuôi tôm của hộ nuôi ở Nghệ An, Nam Định và Quảng Ninh

Địa phương	Diện tích nuôi của nông hộ (ha)			Số ao nuôi của mỗi hộ (ao)		
	Thấp nhất	Cao nhất	Trung bình	Thấp nhất	Cao nhất	Trung bình
Nghệ An (n=50)	0,3	8	1,2±0.2	1	11	2,3±0,2
Nam Định (n=45)	0,1	6	0,9±0,1	2	8	3,4±0,1
Quảng Ninh (n=49)	0,2	6	1,4±0,2	1	9	2,5±0,2

Diện tích nuôi thâm canh ở vùng nghiên cứu hoàn toàn tương tự như diện tích nuôi tôm thâm canh tại Đài Loan và Thái Lan (0,16-1,0ha/ao), đây được xác định là diện tích nuôi tôm phù hợp ở nông hộ xét về mặt quản lý trong đó bao gồm kỹ thuật và chi phí đầu tư (ADB/NACA 1997; Kongkeo 1997), trong khi đó ở Philippin và Indonesia mô hình nuôi tôm thâm canh sử dụng diện tích lớn hơn tương ứng 5-9ha/ao. Tổ chức FAO cũng đã ra khuyến cáo diện tích nuôi tôm thâm canh nên sử dụng 0,25-1,0ha/ao (FAO 1986). Diện tích nuôi nhỏ phù hợp về mặt quản lý cũng được người dân tại Nam Định xác nhận khi thông tin thêm: cách đây 5 năm, các hộ nuôi tại đây đã nuôi tôm trong ao với diện tích lớn (1000-3000m^2/ao), tuy nhiên trong quá trình triển khai đã gặp một số khó khăn về đầu tư và chăm sóc quản lý ao nuôi, vì vậy diện tích nuôi được quy hoạch nhỏ hơn (500-900m^2/ao). Kết quả cho thấy ở quy mô diện tích nhỏ dễ kiểm soát, thực hiện và phù hợp với điều kiện hộ nuôi hơn, vì vậy "nhà theo nhà" truyền tai nhau học hỏi kinh nghiệm chuyển về nuôi tôm trong ao có diện tích nhỏ. Do sử dụng diện tích ao nuôi nhỏ, nên nhiều hộ nuôi đã sử dụng nguồn nước giếng khoan bổ sung vào ao nuôi trong suốt vụ nuôi, không sử dụng nguồn nước từ kênh cấp và hệ thống ao lắng. Nguồn nước từ giếng khoan có nhiều ưu điểm vượt trội so với nguồn nước từ hệ thống ao lắng như đảm bảo không mang mầm bệnh vi khuẩn, virus, không mang các sinh vật có kích thước nhỏ khác gây bệnh cho tôm vào ao nuôi, đồng

thời mang tính chủ động không mất thời gian chờ đợi sử dụng hóa chất để khử/diệt trùng. Kỹ thuật sử dụng nước giếng khoan bổ sung vào ao nuôi trong vụ nuôi được người dân học hỏi từ các hộ nuôi thuộc Nha Trang và Ninh Thuận.

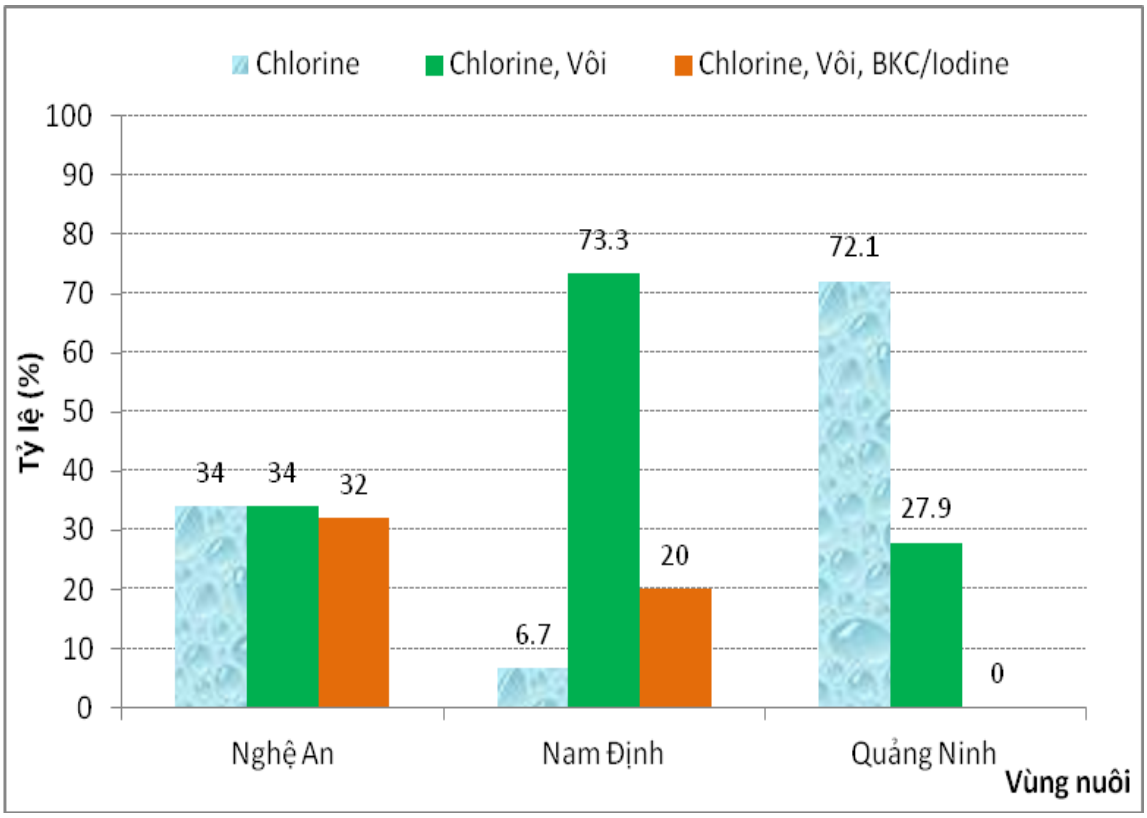
Trước khi thả tôm hay trong quá trình nuôi nước được cấp vào ao nuôi, có 2 hình thức lấy nước vào ao nuôi bao gồm: lấy qua hệ thống ao lắng hoặc lấy trực tiếp từ kênh cấp nước, đồng thời nước được lấy vào ao qua lưới lọc có mắt lưới nhỏ (150-200µm). Quảng Ninh có tỷ lệ số hộ thấp nhất sử dụng hệ thống ao lắng là 39,5% và 16,3% sử dụng lưới lọc, tiếp đến Nghệ An có 88% số hộ sử hệ thống ao lắng và 24% hộ sử dụng lưới lọc và cao nhất là Nam Định với 100% hộ lấy nước vào ao qua ao lắng và 33,3% sử dụng lưới lọc (Hình 4.1). Nhìn chung, có trên 60% số hộ ở các vùng nghiên cứu không sử dụng lưới lọc khi lấy nước vào ao nuôi tôm (Hình 4.1)



Hình 4.1. Tỷ lệ (%) hộ nuôi lấy nước vào ao nuôi tôm qua ao lắng, qua lưới lọc

Nước là môi trường sống của TCT vì vậy nguồn nước có ý nghĩa vô cùng quan trọng quyết định thành bại của vụ nuôi, do đó nước nuôi lấy vào ao cần qua lưới lọc đồng thời được xử lý bằng một số loại hóa chất khử trùng như chlorine,

vôi…trước khi thả tôm, hóa chất sử dụng với mục đích diệt mầm bệnh bao gồm virus, vi khuẩn gây bệnh, ký sinh trùng và nấm. Ở Nam Định và Nghệ An có 20-32% số hộ nuôi sử dụng kết hợp BKC với Vôi và Chlorine để khử trùng nước nuôi, trong khi đó tại Quảng Ninh không có hộ nào sử dụng kết hợp 3 loại hóa chất khử trùng, thay vào đó số hộ sử dụng 1 loại Chlorine chiếm tỷ lệ cao (72,1%) và 27,9% só hộ sử dụng kết hợp vôi và Chlorine (Hình 4.2). Các loại hóa chất nêu trên sẽ được sử dụng trong ao lắng, với các hộ nuôi lấy nước trực tiếp từ kênh cấp các hóa chất được sử dụng ngay trong ao nuôi tôm. Thời gian xử lý hóa chất đến khi thả tôm giống được các hộ nuôi bám sát đáp ứng đúng kỹ thuật nuôi.



Hình 4.2. Hóa chất được sử dụng xử lý nước nuôi tôm

Chlorine và vôi có tác dụng diệt mầm bệnh, đặc biệt vôi có tác dụng điều hòa pH trong nước ao. Hiện nay không chỉ ở Việt Nam sử dụng vôi và chlorine để khử trùng mà nhiều nước trên thế giới có nền công nghiệp nuôi tôm cũng đã và đang sử dụng phổ biến 2 loại hóa chất này, đặc biệt các nước trong khu vực

châu Á như Thái Lan, Đài Loan, Philippine, Trung Quốc và Indonesia (Group, 1996; Tonguthai, 1996; Kongkeo, 1997). Tuy nhiên để đạt hiệu quả cao khi xử lý nước bằng vôi và chlorine cần lưu ý đến một số yếu tố môi trường như pH, chất lơ lửng, chất hữu cơ, nhiệt độ nước vì vậy khuyến cáo đưa ra nên sử dụng vôi và chlorine vào buổi chiều muộn khi mặt trời lặn (Tonguthai, 1996). Bên cạnh đó, nồng độ sử dụng rất quan trọng, hiện nay trên thị trường có rất nhiều loại hóa chất khử trùng với tên thương mại như TCCA, BKC…và thành phần Chlorine chiếm trong sản phẩm 80%, vì vậy cần lưu ý liều sử dụng phù hợp để có hiệu quả cao trong khử trùng diệt mầm bệnh nhưng không ảnh hưởng đến tôm nuôi.

Khi nước cấp vào ao nuôi, mực nước trong ao nuôi tôm ở Nghệ An được duy trì ở mức cao nhất (1,3-1,6m), tiếp đến ở Quảng Ninh (1,1-1,5m) và thấp nhất ở Nam Định (1,0-1,4m) (Bảng 4.2). Mặc dù với mực nước duy trì ở mức thấp trong các ao ở Nam Định nhưng trong quá trình nuôi số lần bổ sung nước vào ao nuôi cũng ít nhất (4 lần là số lần nhiều nhất bổ sung nước vào ao nuôi, một số hộ không bổ sung nước trong suốt cả vụ nuôi), trong khi đó ở Nghệ An và Quảng Ninh có những hộ nuôi cấp nước vào ao nuôi lần lượt tương ứng 0-8 lần/vụ nuôi và 0-15 lần/vụ nuôi (Bảng 4.3). Đặc biệt, ở Nam Định nguồn nước bổ sung vào ao trong vụ nuôi phần lớn người nuôi lấy từ giếng máy khoan, số ít lấy từ hệ thống ao lắng.

Bảng 4.2. Mực nước duy trì trong ao nuôi tôm

Địa phương	Mực nước ao nuôi (m)		
	Thấp nhất	Cao nhất	Trung bình
Nghệ An (n=50)	1,3	1,6	1,5±0,01[a]
Nam Định (n=45)	1,0	1,4	1,3±0,02[b]
Quảng Ninh (n=49)	1,1	1,5	1,3±0,01[b]

Ghi chú: chữ cái không giống nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê p<0,0 5

Bảng 4.3. Số lần cấp nước vào ao nuôi trong quá trình nuôi

Địa phương	Số lần cấp nước bổ sung vào ao nuôi (lần)		
	Ít nhất	Nhiều nhất	Trung bình
Nghệ An (n=50)	0	8	$3,2\pm0,3^{a}$
Nam Định (n=45)	0	4	$1,5\pm0,2^{b}$
Quảng Ninh (n=49)	0	15	$6,8\pm0,7^{c}$

Ghi chú: chữ cái không giống nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê p<0,0 5

4.1.1.2. Thực trạng về nuôi tôm tại vùng nghiên cứu theo thời gian

Ở miền Bắc nói chung và Nghệ An, Nam Định, Quảng Ninh nói riêng có 2 vụ nuôi tôm trong 1 năm, trung bình mỗi vụ nuôi kéo dài 3 tháng. Ở Quảng Ninh và Nghệ An có phần lớn số hộ thả tôm nuôi vào tháng 3 (vụ 1) và tháng 7 (vụ 2) với tỷ lệ hơn 90%, không có hộ nào thả vào tháng 5 (vụ 1) và tháng 9 (vụ 2), trong khi đó ở Nam Định các hộ bắt đầu nuôi vào tháng 3 và 4 với tỷ lệ tương ứng 46,7 và 48,9%, một số ít (4,4%) thả vào tháng 5 (vụ 1) (Bảng 4.4). Tương tự ở vụ 2, tại Nam Định đều có các hộ thả tôm vào tháng 7, 8 và 9 với tỷ lệ tương ứng lần lượt là 31,1; 46,7 và 22,2% (Bảng 4.4).

Bảng 4.4. Thời điểm thả giống tôm trong năm

TT	Thời điểm thả giống		Nghệ An (n=50)	Nam Định (n=45)	Quảng Ninh (n=49)
1	Vụ nuôi 1	Tháng 3, n (%)	50 (100)	21 (46,7)	48 (97,9)
		Tháng 4, n (%)	0 (0)	22 (48,9)	11 (2,3)
		Tháng 5, n (%)	0 (0)	2 (4,4)	0 (0)
2	Vụ nuôi 2	Tháng 7, n (%)	50 (100)	14 (31,1)	44 (90,7)
		Tháng 8, n (%)	0 (0)	21 (46,7)	4 (8,3)
		Tháng 9, n (%)	0 (0)	10 (22,2)	0 (0)

Nhìn chung, tại Nam Định phần lớn các hộ nuôi (48,9%) thả tôm muộn hơn so với ở Quảng Ninh và Nghệ An khoảng 1tháng, thậm chí 1 số ít hộ (4,4%)

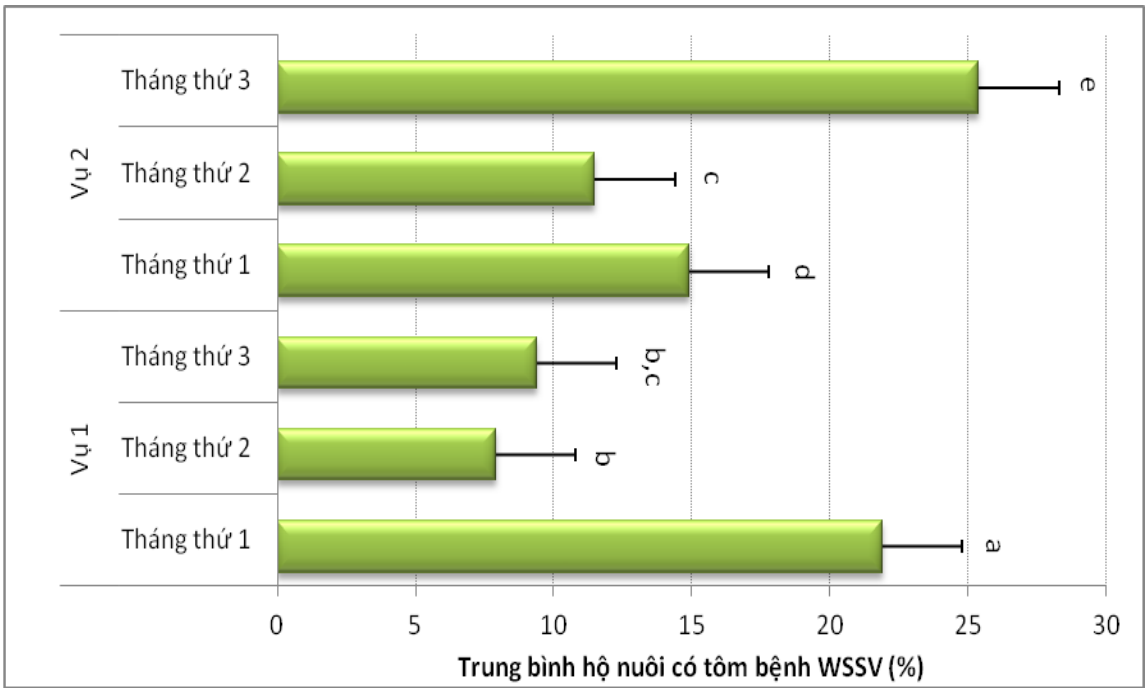
thả muộn hơn đến 2 tháng. Nguyên nhân được biết chủ hộ nuôi nhận thấy vào thời điểm tháng 2 (tức tháng 1 âm lịch), thời tiết chưa nắng vì vậy khâu cải tạo ao nuôi chưa đảm bảo do đó nhiều hộ nuôi chờ thời điểm nắng nóng lên đủ kéo dài để cải tạo phơi đáy ao. Do vụ 1 thả chậm do đó kéo theo vụ 2 thả chậm hơn so với các địa phương khác thuộc miền Bắc.

Mùa đông miền Bắc với nhiệt độ thấp (<20^0C) không có hoạt động nuôi tôm nước lợ, do hệ số chuyển đổi thức ăn cao, tốc độ tăng trưởng tôm chậm, sức đề kháng giảm, tôm nuôi dễ nhiễm bệnh, tiêu hao oxi của tôm lớn và không ổn định, đó là nguyên nhân làm tăng chí phí đầu tư giảm lợi nhuận. Hơn nữa, mùa đông nhiệt độ chênh lệch giữa ngày và đêm lớn gây sốc nhiệt cho tôm, ảnh hưởng tỷ lệ sống của tôm. Vì vậy các hộ nuôi tại Nghệ An, Nam Định và Quảng Ninh lựa chọn thời điểm thả nuôi ở vụ 1 bắt đầu từ tháng 3 và kết thúc nuôi vào cuối tháng 9 hàng năm (Bảng 4.4). Nhiệt độ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng và hệ số chuyển đổi thức ăn (FCR) của TCT nói riêng và tôm nuôi nước lợ nói chung. TCT có cỡ >10,8g/con có hệ số chuyển đổi thức ăn ở 27-30^0C thấp hơn ở nhiệt độ < 26^0C và sự khác biệt này có ý nghĩa (Wyban *et al.*, 1995). Ở giai đoạn nhỏ <3,9g/con hệ số chuyển đổi thức ăn không chịu sự tác động nhiều của nhiệt độ. Bên cạnh đó, nhiệt độ ảnh hưởng đến tiêu thụ oxi của tôm, nhiệt độ cao 25-30^0C sự tiêu thụ oxi luôn ở mức ổn định, nhiệt độ thấp <20^0C sự tiêu hoa oxi lớn và không ổn định (Bett and Vinatea, 2009).

Mỗi vụ nuôi tôm trung bình kéo dài 3 tháng và 2 vụ/năm, kết quả điều tra cho thấy ở tất cả các tháng của 2 vụ nuôi trong năm tôm đều nhiễm bệnh, tuy nhiên tỷ lệ tôm bệnh khác nhau ở các tháng trong vụ nuôi. Ở vụ nuôi thứ nhất, tỷ lệ % trung bình số hộ có tôm bệnh do WSSV cao nhất ở tháng nuôi thứ nhất (21,9%) và có sự sai khác ý nghĩa đối với tháng thứ 2 và 3 ($p<0,05$), trong khi đó tháng thứ 2 và 3 lần lượt có tỷ lệ 8 và 9,4% và không có sự khác biệt ý nghĩa ($p>0,05$) (Hình 4.3). Ở vụ nuôi thứ 2, tỷ lệ trung bình hộ nuôi có tôm nhiễm bệnh do WSSV gây ra xuất hiện ở tháng nuôi thứ ba là cao nhất (25,4%), tiếp đến tháng nuôi thứ nhất (14,9%) và cuối cùng là tháng nuôi thứ hai (11,5%), tỷ lệ

xuất hiện bệnh giữa các tháng trong vụ nuôi 2 có sự khác biệt ý nghĩa với p<0,05 (Hình 4.3), tuy nhiên tỷ lệ hộ nuôi có tôm bệnh ở tháng nuôi thứ 2 (vụ 2) so với tháng nuôi thứ 3 (vụ 1) không có sự khác biệt ý nghĩa (p<0,05).

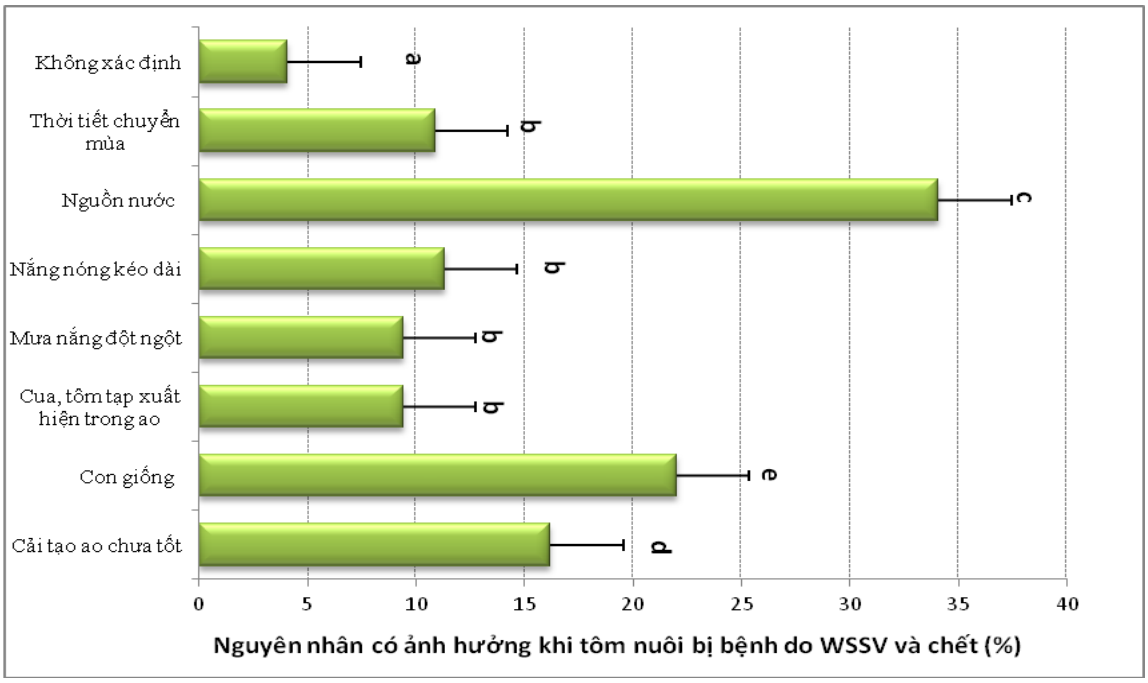
Như vậy, bệnh do WSSV thường xuất hiện vào tháng nuôi thứ nhất ở vụ nuôi thứ nhất và tháng nuôi thứ 3 ở vụ nuôi thứ 2. Kết quả này hoàn toàn trùng hợp với các nghiên cứu trước đây đã công bố về điều kiện nhiệt độ ảnh hưởng đến sự nhiễm và bùng phát bệnh do WSSV gây ra. Các nghiên cứu đã khẳng định rằng nhiệt độ nước cao (>30^{0}C) ngăn cản sự xuất hiện của bệnh đốm trắng ở tôm và làm giảm đáng kể tỷ lệ tử vong của tôm nhiễm WSSV, đồng thời các nghiên cứu đã chứng minh rằng nhiệt độ nước cao ức chế sự sao chép của WSSV, giảm nguy cơ nhiễm bệnh của tôm (Tendencia *et al.,* 2011) thay vào đó tăng hoạt động của phản ứng miễn dịch của vật chủ, điều kiện nhiệt độ thuận lợi virus phát triển dao động 25-27^{0}C (Gao *et al.,* 2011; You *et al.,* 2010). Khoảng nhiệt độ 25-27^{0}C là khoảng nhiệt phổ biến ở tháng thứ nhất vụ nuôi 1 (tháng 3) và tháng thứ ba của vụ nuôi 2 (tháng 9) tại miền Bắc Việt Nam, điều kiện thuận lợi cho virus đốm trắng sao chép nhân lên khi chúng hiện diện trong môi trường nước.



Hình 4.3. Tỷ lệ (%) hộ nuôi có tôm nhiễm virus đốm trắng trong quá trình nuôi

Các cột có chữ không giống nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê p<0,0 5

Đã xác định được 7 nguyên nhân có ảnh hưởng khi tôm nuôi bị bệnh do WSSV và chết bao gồm: cải tạo ao chưa tốt, con giống, cua và tôm tạp xuất hiện trong ao nuôi, mưa nắng đột ngột, nắng nóng kéo dài, nguồn nước, thời tiết chuyển mùa (Hình 4.4). Trong số 7 nguyên nhân này có yếu tố nguồn nước được cho là nguyên nhân ảnh hưởng chính với tỷ lệ 34%, tiếp đến con giống (22%) và cải tạo ao nuôi chưa tốt (16,2%), tỷ lệ này có ý nghĩa khác biệt ($p<0,05$). Nguyên nhân do thời tiết chuyển mùa (10,9%) và nắng nóng kéo dài (11,3%), nắng mưa đột ngột và cua tôm xuất hiện trong ao nuôi (9,4%) không có sự khác biệt ý nghĩa ($p>0,05$) (Hình 4.4). Yếu tố nguồn nước bao gồm yếu tố vô sinh (nhiệt độ, oxy hòa tan, độ mặn, pH và Nitơ), yếu tố hữu sinh (sinh vật mang mầm bệnh virus). Đối với yếu tố vô sinh, khi nhiệt độ và oxy hòa tan tăng, độ mặn giảm, tôm tử vong do nhiễm bệnh đốm trắng giảm đi, trong khi đó tử vong cao và nhanh xảy ra khi nhiệt độ nước tăng, oxy giảm (Ruiz-Velazco *et al*., 2010).



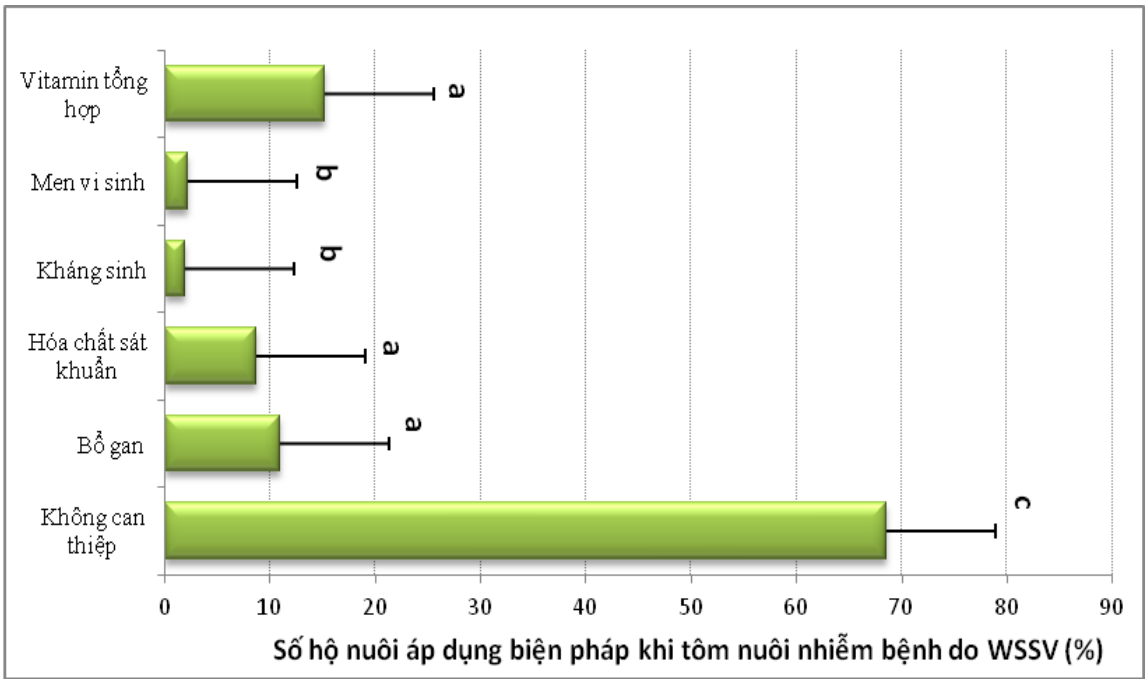
Hình 4.4. Các yếu tố xác định là nguyên nhân gây tôm nuôi nhiễm WSD

Các cột có chữ không giống nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê p<0,0 5

Các yếu tố được người dân/chủ hộ nuôi nhận định trùng hợp với các yếu tố được nhận định của Umesh *et al*, (2008) và MPEDA/NACA, (2003) đã đưa ra, bên cạnh đó yếu tố lựa chọn thời điểm bắt đầu vụ nuôi, kỹ thuật vận chuyển

giống cũng hết sức quan trọng và là nguyên nhân cần thiết để tôm dễ mắc bệnh (Umesh *et al.*, 2008). Rõ ràng, kết quả nghiên cứu chỉ rõ các chủ hộ đều nhận thức được nguồn nước có vai trò quan trọng, là nguyên nhân lây nhiễm mầm bệnh do WSSV, tuy nhiên việc thực hiện sử dụng ao lắng và lưới lọc khi lấy nước vào ao lại chưa nghiêm túc thực hiện thông qua tỷ lệ hộ nuôi sử dụng lưới lọc thấp (16,3-33,3%), đặc biệt ở Quảng Ninh (Hình 4.1).

Khi tôm đã nhiễm bệnh với dấu hiệu điển hình như đốm trắng ở vỏ giáp đầu ngực và kết quả phân tích trong phòng thí nghiệm xác nhận dương tính với WSSV của cán bộ trạm kiểm dịch/chi cục của vùng nuôi thì gần 70% số hộ không sử dụng biện pháp can thiệp, 10-15% số hộ sử dụng chất bổ trợ tăng cường sức đề kháng cho tôm (vitamin, bổ gan) và sử dụng hóa chất sát khuẩn, các giải pháp này không có sự khác biệt ý nghĩa ($p>0,05$), giải pháp sử dụng kháng sinh và men vi sinh của các hộ áp dụng cũng không có sự khác biệt ý nghĩa ($p>0,05$) (Hình 4.5). Tất cả đều không có kết quả mong đợi, thậm chí có 1 số ít hộ nuôi sử dụng thuốc kháng sinh, điều này chứng tỏ thông tin tác nhân gây bệnh đốm trắng đến với một số hộ này còn nhiều hạn chế (Hình 4.5).



Hình 4.5. Giải pháp áp dụng khi tôm nuôi nhiễm bệnh do WSSV

Hóa chất sát khuẩn: Iodine, Virkon A, kháng sinh: hộ nuôi không nhớ tên thuốc sử dụng, các cột có chữ không giống nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p<0,05$

Hiện nay, không chỉ riêng nghề nuôi tôm ở Việt Nam mà cả trên thế giới chưa đưa ra biện pháp hữu hiệu để khống chế bệnh, dịch bệnh do WSSV gây ra, do đó các nhà khoa học, các cán bộ kỹ thuật luôn khuyến cáo người nuôi kiểm soát tốt môi trường ao nuôi và chọn thời điểm thả nuôi phù hợp để hạn chế mầm bệnh xuất hiện trong ao nuôi.

4.1.1.3. Thực trạng về nuôi tôm tại vùng nghiên cứu theo đối tượng

Tôm giống thả nuôi được thu mua từ các điểm khác nhau như Nghệ An, Ninh Thuận, Cà Mau, Quảng Trị, Nha Trang và Quảng Ninh (Bảng 4.5).

Bảng 4.5. Nguồn tôm giống thả nuôi ở các hộ tại vùng nghiên cứu

TT	Nguồn tôm giống (nhập tại)	Hộ điều tra		
		Nghệ An (n=50)	Nam Định (n=45)	Quảng Ninh (n=49)
1	Nghệ An, n (%)	19 (38,0)	12 (26,7)	8 (16,3)
2	Miền Nam[(1)], n (%)	25 (50,0)	16 (35,6)	16 (32,7)
3	Miền Trung[(2)], n (%)	6 (12,0)	17 (37,8)	0 (0)
4	Quảng Ninh, n (%)	0 (0)	0 (0)	25 (51,1)

Ghi chú: [(1)] Ninh Thuận, Cà Mau, [(2)] Quảng Trị, Nha Trang

Quảng Ninh sử dụng tôm giống thả nuôi có nguồn gốc ngay tại địa phương (Quảng Ninh) chiếm phần lớn (>50%), số còn lại chuyển từ Nghệ An, Ninh Thuận và Cà Mau. Ở đây, riêng con giống có nguồn gốc từ Quảng Ninh được mua tại trại sản xuất giống trên địa bàn Quảng Ninh nhưng chủ trang trại là người Trung Quốc, vì vậy người dân vẫn thường gọi giống đó từ Trung Quốc. Trong khi đó ở Nam Định và Nghệ An có con giống nhập từ miền Trung và miền Nam, hoàn toàn không sử dụng con giống từ Quảng Ninh (Bảng 4.5). Bên cạnh đó, các hộ nuôi cung cấp thông tin thêm con giống được chủ cơ sở trại giống chủ động gửi mẫu đến các cơ quan chức năng kiểm dịch và có giấy chứng nhận lô tôm sản xuất của trang trại không mang mầm bệnh như bệnh do virus đầu vàng

gây ra (YHV), bệnh Taura, bệnh do vi bào tử trùng (EPH), hoại tử cơ quan tạo máu và cơ quan lập biểu mô (IHHNV)…, đặc biệt với bệnh phổ biến như WSD và hoại tử gan tụy cấp (AHPND). Cá nhân mỗi hộ nuôi không lấy mẫu đại diện đi kiểm tra bất kỳ chỉ tiêu bệnh nào trước khi quyết định lấy giống, thay vào đó chủ hộ nuôi chọn tôm để mua dựa vào dấu hiệu cảm quan như phản xạ nhanh của con giống, sáng màu và tính đồng đều về kích cỡ. Hơn nữa, các hộ nuôi luôn có tư duy lựa chọn giống từ địa chỉ có uy tín trên thị trường như Công ty CP, Grobest, hợp tác xã Lộc Thủy…và năm trước mua ở công ty, địa chỉ nào có hiệu quả sẽ làm cơ sở để lấy giống thả nuôi cho vụ sau, năm sau.

Hình thức nuôi tôm ở các hộ áp dụng là mô hình nuôi thâm canh (hình thức nuôi có đầu tư con giống, kỹ thuật, thức ăn, quản lý môi trường ao nuôi….), vì vậy mật độ thả cao, với trung bình lớn hơn 80 con/m^2. Một số hộ nuôi tai Nam Định và Quảng Ninh thả nuôi với mật độ nhất là 120 con/m^2, trong khi đó mật độ thả cao nhất ở Nghệ An là 100con/m^2 (Bảng 4.6).

Bảng 4.6. Mật độ thả tôm giống ở các hộ nuôi

Địa phương	Mật độ thả tôm giống (con/m^2)		
	Thấp nhất	Cao nhất	Trung bình
Nghệ An (n=50)	80	100	96,3±1[a]
Nam Định (n=45)	50	120	96±2,3[a]
Quảng Ninh (n=49)	50	120	82,4±3,8[b]

Ghi chú: chữ cái không giống nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê p<0,0 5

Trong hướng dẫn kỹ thuật nuôi tôm chân trắng thâm canh có nêu mật độ thả từ 30-60 con/m^2 (đối với hộ mới nuôi tôm) và 50-100 con/m^2 (đối với hộ có kinh nghiệm và hỗ trợ từ cán bộ kỹ thuật) (Nguyễn Quang Trí, 2013). Song kết quả điều tra cho thấy 120 con/m^2 là mật độ tôm thả nuôi ở một số ao (Bảng 4.6), khi được hỏi lý do tại sao thả mật độ cao dù kỹ thuật nuôi đưa ra thấp hơn, các hộ

nuôi đã cùng đưa ra quan điểm "thả nhiều vì sẽ có sự hao hụt nhất định, sau khi hao hụt thì mật độ đạt được sẽ phù hợp với kỹ thuật".

Mật độ thả nuôi TCT ở mô hình thâm canh tại một số nước thuộc khu vực châu Á có sự khác nhau và tương đối đa dạng, ở Philippine mật độ thả nuôi chỉ đạt 38con/m^2, tiếp đến Đài Loan và Indonesia mật độ lần lượt là 73 và 78 con/m^2, trong khi đó ở Thái Lan mật độ thả 114 con/m^2 (ADB/NACA, 1997).

Cỡ giống tôm thả nuôi nhỏ nhất là post 10 và lớn nhất là post 15 đã được người dân tại Nam Định lựa chọn thả nuôi trong vụ 1 và 2 (Bảng 4.7). Trong khi đó ở Nghệ An và Quảng Ninh sử dụng cỡ tôm thả nhỏ hơn giao động từ post 8 đến post 12. Nhìn chung, cỡ giống trung bình được thả ở vùng nghiên cứu giao động post 10-11 (Bảng 4.7).

Bảng 4.7. Cỡ tôm giống khi thả

Địa phương	Cỡ tôm giống thả (post)		
	Thấp nhất	Cao nhất	Trung bình
Nghệ An (n=50)	8	12	11,4±0,1[a]
Nam Định (n=45)	10	15	11,5±0,2[a]
Quảng Ninh (n=49)	8	12	10,2±0,2[b]

Ghi chú: chữ cái không giống nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê p<0,0 5

Cỡ tôm thẻ thả nuôi được khuyến cáo và hướng dẫn chọn cỡ kích thước post ≥ 10 (Nguyễn Quang Trí, 2013), giống thả có kích thước nhỏ hơn post 10 ảnh hưởng đến tỷ lệ sống ngay khi thả, do "kích cỡ" của hậu ấu trùng trên thị trường được quy định theo ngày tuổi vì vậy post ≥ 10 đảm bảo đã hoàn tất giai đoạn biến thái (giai đoạn nauplii, zoea và mysis) và đã hoàn thành quá trình phát triển hình thái và sinh lý của nó, nếu nhỏ hơn post 10 có thể chúng chỉ mới hoàn thành quá trình biến thái song chưa hoàn thành quá trình sinh lý, dễ bị ảnh hưởng từ các yếu tố môi trường nước nuôi (BioAqua, 2014).

Tôm giống thả xuống ao nuôi ở kích thước nhỏ (< post15), do đó một bước kỹ thuật không kém phần quan trọng giúp hạn chế tối đa thay đổi điều kiện môi trường ảnh hưởng đến hao hụt tôm giống khi thả là hoạt động tạt Vitamin C, khoáng và cân bằng nhiệt độ giữa nước trong ao nuôi và nước trong túi chứa tôm giống. Nam Định có nhiều nhất số hộ không tuân thủ kỹ thuật giảm sốc cho tôm (75,6%) tiếp đến Quảng Ninh (57,1%) và cuối cùng là Nghệ An (40%) (Bảng 4.8). Mặc dù các kỹ thuật thực hiện các hộ nuôi đều đã biết qua tài liệu, tập huấn, song vẫn có những hộ nuôi không tuân thủ, do đó khó để thay đổi tư duy và thói quen của một số hộ nuôi.

Bảng 4.8. Hoạt động giảm sốc cho tôm giống khi thả

TT	Hoạt động giảm sốc	Nghệ An (n=50)	Nam Định (n=45)	Quảng Ninh (n=49)
1	Không, n (%)	20 (40,0)	34 (75,6)	28 (57,1)
2	Có, n (%)	30 (60,0)	11 (24,4)	21 (42,8)

4.1.2. Xác định yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh đốm trắng ở tôm chân trắng nuôi tại vùng nghiên cứu

4.1.2.1. Yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh đốm trắng ở tôm theo không gian

Kết quả phân tích cho thấy ở vùng nuôi TCT tại Nghệ An, Nam Định và Quảng Ninh, những hộ nuôi lấy nước vào ao nuôi trực tiếp từ kênh cấp tôm nuôi có nguy cơ nhiễm bệnh do WSSV cao gấp 6,3 lần so với những hộ nuôi lấy nước vào ao nuôi qua hệ thống ao lắng (p=0,007). Tiếp đến trong quá trình nuôi việc bổ sung nước vào ao nuôi cũng là nguy cơ cao hơn 3,6 lần so với ao không áp dụng kỹ thuật này (p=0,008). Bên cạnh đó, nước được lấy qua lưới lọc rất có ý nghĩa hạn chế tôm nhiễm bệnh do WSSV trong vụ nuôi, ở hộ có sử dụng lưới lọc khi lấy nước vào ao tôm giảm nguy cơ nhiễm WSD thấp hơn 3,2 lần so với hộ không áp dụng kỹ thuật này (p=0,016) (Bảng 4.9). Như vậy qua đây cho thấy kỹ thuật lấy nước vào ao nuôi có ý nghĩa giảm thiểu nguy cơ tôm nuôi nhiễm bệnh

do WSSV gây ra. Kết quả nghiên cứu của đề tài là minh chứng thêm chỉ ra vai trò quan trọng của kỹ thuật lấy nước cấp vào ao nuôi tôm.

Khi so sánh hoạt động cấp bổ sung nước vào ao nuôi tôm ở 3 tỉnh Nghệ An, Nam Định và Quảng Ninh nhận thấy số lần cấp nước vào ao nuôi có sự khác biệt ý nghĩa, thấp nhất ở Nam Định với trung bình 1,5 lần cấp nước/vụ nuôi, tiếp đến Nghệ An với 3,2 lần cấp nước/vụ nuôi và nhiều nhất là Quảng Ninh với 6,8 lần cấp nước/vụ nuôi (Bảng 4.3). Tương tự, việc sử dụng ao lắng để xử lý nước trước khi cấp vào ao nuôi tôm và sử dụng lưới lọc mỗi lần lấy được người dân tại Nam Định thực hiện tốt nhất với 100% hộ sử dụng ao lắng, 33,3% hộ sử dụng lưới lọc trong khi đó hộ nuôi ở Quảng Ninh thực hiện chưa tốt với 66,5% không sử dụng ao lắng và 83,7% không sử dụng lưới lọc (Hình 4.1). Như vậy, qua đây cho thấy thực hành nuôi, chăm sóc và quản lý ao nuôi của người dân tại 3 tỉnh có sự khác biệt trong đó hộ nuôi tại Nam Định thực hiện tốt nhất tiếp đến Nghệ an và cuối cùng là hộ nuôi tại Quảng Ninh.

Bảng 4.9. Mối quan hệ giữa hoạt động lấy nước vào ao nuôi tôm với bệnh đốm trắng xuất hiện trong ao nuôi

Yếu tố	Kiểu biến	WSSV (% nông hộ)		χ^2	P	OR
		Không	Có			
Lấy nước vào ao nuôi tôm	Qua ao lắng	91,3	62,6	7,18	0,007*	6,3
	Trực tiếp kênh cấp	8,7	37,4			
Sử dụng lưới lọc lấy nước vào ao	Có	56,5	28,7	5,75	0,016*	3,2
	Không	43,5	71,3			
Bổ sung nước trong quá trình nuôi	Không	73,9	44,2	7,11	0,008*	3,6
	Có	26,1	55,8			
WSSV xuất hiện ở vùng nuôi	Không	34,8	10,4	9,17	0,002*	4,6
	Có	65,2	89,6			

Ghi chú: (*) Sự sai khác có ý nghĩa p<0,05, "OR" Tỷ số chênh (Odd ratio)

Bên cạnh đó, trong khu vực nuôi tôm ở thời điểm có hộ nuôi báo xuất hiện tôm nhiễm bệnh đốm trắng thì khả năng ao nuôi còn lại trong khu vực này bị WSSV cao hơn gấp 4,6 lần so với những ao nuôi ở khu vực không bị WSSV (p=0,002) (Bảng 4.9).

Nguồn nước vào không qua xử lý là điều kiện thuận lợi đưa mầm bệnh vào ao nuôi, do WSSV có thể sống ngoài tế bào vật chủ và tồn tại trong môi trường nước biển ở 30^0C ít nhất 30 ngày và trong nước ao nuôi ít nhất 3-4 ngày (Momoyama *et al.,* 1998; Nakano *et al.,* 1998), nếu nguồn nước có mang mầm bệnh là virus gây WSD thì việc truyền lây theo trục ngang sẽ xảy ra (Chou *et al.,* 1998; Venegas *et al.,* 1999). Hoạt động cấp dẫn nước vào ao nuôi chưa xử lý tốt sẽ là con đường cung cấp bổ sung mầm bệnh vào ao nuôi (Momoyama *et al.,* 1998; Nakano *et al.,* 1998; Kongkeo 1997). Hơn nữa, nguồn nước được xác định là một trong những yếu tố nguy cơ gây tôm nuôi nhiễm WSD (Umesh *et al.,* 2008) và kết quả nghiên cứu mô tả dịch tễ học theo không gian nêu trên tại vùng nuôi Quảng Ninh, Nam Định và Nghệ An đã chỉ rõ nguồn nước cũng được xác định là nguyên nhân lớn nhất (34%) gây tôm nuôi nhiễm WSD (Hình 4.4).

Nước lấy vào ao nuôi không qua lưới lọc làm tăng khả năng dẫn bước các sinh vật nhỏ bé nhiễm WSSV vào trong ao nuôi (Lo *et al.,* 1996a), có rất nhiều loài có kích thước nhỏ như sinh vật phù du bao gồm cả động vật phù du và thực vật phù du được xác định mang WSSV gây bệnh đốm trắng cho tôm nuôi (Jiang, 2012; Liu *et al.,* 2007b). Trong nghiên cứu này đối với mô hình nuôi thâm canh, việc lấy bổ sung nước vào ao nuôi trong vụ nuôi là yếu tố nguy cơ gây tôm nuôi nhiễm bệnh đốm trắng, kết quả này hoàn toàn trùng hợp với nghiên cứu của Takahashi *et al,* (1995) khi nêu cấp nước vào ao nuôi, đặc biệt với khối lượng nước lớn có thể đã gây sốc cho tôm nuôi và do đó WSD dễ bộc phát, tuy nhiên điều này trái ngược với mô hình nuôi tôm quảng canh cải tiến. Ở mô hình nuôi quảng canh cải tiến thì việc bổ sung nước vào ao nuôi lại được xem là yếu tố ngăn ngừa (protector factor) xuất hiện dịch bệnh đốm trắng, nghĩa là việc điều tiết, lấy nước hợp lý chủ yếu là cấp nước vào ao nuôi trong

tháng trước (mùa khô) có tác dụng hạn chế bệnh virus đốm trắng xảy ra trong tháng sau của ao trong vụ nuôi (Nguyễn Văn Hảo và cs., 2007).

Bên cạnh đó, kết quả phân tích cũng đã chỉ ra ở vùng nghiên cứu diện tích ao nuôi và mực nước trong ao nuôi không có sự khác biệt ý nghĩa giữa ao tôm không mắc bệnh và ao tôm mắc bệnh do WSSV lần lượt có giá trị p tương ứng là 0,5 và 0,4 (Bảng 4.10).

Bảng 4.10. Quan hệ giữa diện tích nuôi tôm và mực nước ao nuôi với bệnh đốm trắng ở tôm xuất hiện trong ao nuôi

TT	Yếu tố	Tôm không bệnh	Tôm bệnh do WSSV	p
1	Diện tích ao nuôi (ha)	1,1±0,01	1,2±0,02	0,5
2	Mực nước ao nuôi (m)	1,3±0,01	1,3±0,03	0,4

4.1.2.2. Yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh đốm trắng ở tôm theo thời gian

Kết quả phân tích yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh ở tôm do WSSV gây ra ở vùng nghiên cứu cho thấy, nguy cơ xuất hiện WSSV ở những ao nuôi được thường xuyên kiểm tra môi trường sẽ thấp hơn 3,7 lần so với ao nuôi không thực hành kỹ thuật này ($\chi 2 = 7,89$; p=0,005) (Hình 4.11). Như vậy công tác kiểm tra môi trường ao nuôi thường xuyên có ý nghĩa quan trọng giúp giảm nguy cơ tôm nuôi bị bệnh và bùng phát dịch bệnh. Từ những năm 2004 Tổng cục Thủy sản đã giao cho Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I, II và III nhiệm vụ thường xuyên về hoạt động quan trắc giám sát vùng nuôi tôm, cá và nhuyễn thể tương ứng ở miền Bắc, Trung và Nam. Gần đây chi cục thủy sản thuộc các tỉnh như Quảng Ninh, Nam Định…cũng đã bắt đầu có chương trình quan trắc giám sát môi trường vùng nuôi. Kết quả của công tác giám sát môi trường có cơ sở khoa học đưa ra cảnh báo cũng như giải pháp kịp thời nhằm hạn chế bệnh xuất hiện ở vật nuôi, nâng cao năng suất và sản lượng, giúp nghề nuôi trồng thủy sản phát triển ổn định và bền vững.

Bảng 4.11. Quan hệ giữa vùng nuôi xuất hiện bệnh WSSV và hoạt động kiểm tra môi trường thường xuyên với bệnh đốm trắng ở tôm

Yếu tố	Kiểu biến	WSSV (% nông hộ)		χ^2	P	OR
		Không	Có			
K/tra môi trường thường xuyên	Có	65,2	33,9	7,89	0,005*	3,7
	Không	34,8	66,1			

Ghi chú: (*) Sự sai khác có ý nghĩa p<0,05; "OR" Odd ratio (tỷ số chênh)

Yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh đốm trắng ở tôm nuôi theo thời gian nêu trong nghiên cứu này hoàn toàn trùng hợp với các nghiên cứu đã được chỉ ra trước đây nhưng ở dạng mô hình nuôi kết hợp và quảng canh cải tiến tại huyện Cái Nước, tỉnh Cà Mau (Phan Quốc Việt và cs., 2011). Qua đây nhận thấy, rõ ràng dù áp dụng mô hình nuôi tôm thâm canh với chi phí đầu tư cao cả về cơ sở hạ tầng và kỹ thuật nhưng không giảm được các yếu tố nguy cơ gây tôm nhiễm WSD, nguyên nhân được xác định do các chủ hộ nuôi chưa nghiêm túc thực hiện đúng các hướng dẫn kỹ thuật liên quan đến cả chu kỳ nuôi tôm của một vụ tương ứng với mô hình nuôi tôm thâm canh.

Như vậy, nghiên cứu đã chỉ ra xét về mặt thời gian có 01 yếu tố là hoạt động kiểm tra môi trường ao nuôi không thường xuyên là yếu tố nguy cơ gây tôm nuôi nhiễm bệnh do WSSV gây ra ở tôm nuôi thuộc vùng nghiên cứu Nghệ An, Nam Định và Quảng Ninh.

4.1.2.3. Yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh đốm trắng ở tôm theo đối tượng

Nghiên cứu tại vùng nuôi ở Nghệ An, Nam Định và Quảng Ninh cho thấy sử dụng con giống có cỡ nhỏ hơn post 10 thì nguy cơ tôm nhiễm bệnh do WSSV cao hơn gấp 7,5 lần so với giống thả đạt cỡ post ≥ 10 (p=0,002) (Bảng 4.12). Bên cạnh đó, vai trò hoạt động giảm sốc cho tôm giống khi thả nuôi cũng được chỉ rõ, ở ao nuôi không áp dụng kỹ thuật giảm sốc cho tôm giống thì tôm nuôi có nguy

cơ nhiễm bệnh do WSSV gây ra cao hơn gấp 4,8 lần so với ao có áp dụng kỹ thuật này (p=0,001) (Bảng 4.12). Thực tế ở vùng nuôi kỹ thuật giảm sốc cho tôm khi thả nuôi chưa được quan tâm, nhiều hộ nuôi không áp dụng đặc biệt ở Nam Định, Quảng Ninh và Nghệ An với tỷ lệ lần lượt tương ứng 75,6; 58,1 và 40% (Bảng 4.8). Ngoài ra, sự xuất hiện của sinh vật khác ngoài tôm nuôi trong ao nuôi tôm là dấu hiệu báo nguy cơ tôm nuôi nhiễm bệnh do WSSV cao gấp 3,9 lần so với ao nuôi không xuất hiện sinh vật khác (p=0,006).

Bảng 4.12. Mối quan hệ giữa cỡ tôm giống, hoạt động thả tôm và xuất hiện sinh vật khác trong ao nuôi tôm với tôm bị bệnh đốm trắng

Yếu tố	Kiểu biến	WSSV (% nông hộ)		χ^2	p	OR
		Không	Có			
Cỡ post thả	≥10	91,3	58,3	9,46	0,002*	7,5
	<10	8,7	41,7			
Hoạt động giảm sốc tôm khi thả	Có	72,2	34,8	11,93	0,001*	4,8
	Không	27,8	65,2			
Sinh vật ngoài tôm nuôi có trong ao	Không	75,2	37,8	6,93	0,006*	3,9
	Có	24,8	62,2			

Ghi chú: (*) Sự sai khác có ý nghĩa p<0,05, "OR" Odd ratio (tỷ số chênh)

Bên cạnh đó, kết quả phân tích cũng đã chỉ ra ở vùng nghiên cứu mật độ thả nuôi không có sự khác biệt ý nghĩa giữa ao tôm không mắc bệnh và ao tôm mắc bệnh do WSSV với giá trị là p=0,8. Trái ngược với mô hình nuôi bán thâm canh, mật độ thả nuôi, kích thước ao nuôi và sự chia sẻ sử dụng chung nguồn nước ở là các yếu tố nguy cơ ảnh hưởng khả năng tôm nhiễm bệnh do WSSV (Tendencia *et al.*, 2011)

Tỷ số chênh OR ở cỡ giống tôm thả nuôi đạt giá trị 7,5 đây là yếu tố có nguy cơ cao nhất so với 07 yếu tố khác đã được phân tích chỉ ra (Bảng 4.9; Bảng 4.11 và Bảng 4.12) điều đó cho thấy cỡ tôm giống đưa vào nuôi có vai trò hết sức quan trọng. Cỡ tôm giống được tính theo ngày tuổi của chúng sau khi qua giai đoạn biến thái, khi đạt giống ≥ post 10 được khuyến cáo nên sử dụng chuyển thả nuôi ở ao. Ở cỡ này có thể đem lại sức chống chịu tốt bởi hội chứng đốm trắng hơn đối với cỡ giống nhỏ đồng thời giúp tăng trọng nhiều hơn vào những ngày đầu tiên trong ao (BioAqua, 2014). Một kết quả nghiên cứu theo dõi tỷ lệ sống của cỡ tôm thả đã xác nhận, tỷ lệ sống đạt cao nhất 79% (thả post 30), tỷ lệ giảm xuống 77% khi thả tôm post 20 và 67% (cỡ post 10), tỷ lệ sống giảm tỷ lệ thuận với cỡ tôm giống thả nuôi (De Yta *et al.,* 2004). Bên cạnh đó, những thay đổi đột ngột các yếu tố môi trường nước sẽ làm rối loạn các chức năng sinh lý trong cơ thể tôm giống, gây sốc, yếu, ảnh hưởng tới quá trình sinh trưởng, giảm sức đề kháng bệnh của tôm (Nguyễn Văn Thành, 2017). Vì vậy cỡ tôm thả giống và công tác thuần môi trường nhằm giảm sốc cho tôm giống khi thả đóng vai trò quan trọng, giúp tôm giống làm quen với môi trường hoàn toàn mới.

Khi tôm giống bắt đầu thả, các chuyên gia kỹ thuật khuyến cáo hộ nuôi thực hành các giải pháp giảm sốc cho tôm giống như tạt khoáng, Vitamin C và cân bằng nhiệt độ môi trường ao nuôi với nhiệt độ nước trong túi chứa tôm. Vitamin C được xem như là chất kháng ôxy hóa, kích thích hệ miễn dịch, hỗ trợ hấp thu sắt, giúp ngăn ngừa hiện tượng thiếu máu thường gặp và giảm sốc cho tôm nuôi (Lê Cung, 2015). Lý do cần có hoạt động giảm sốc cho tôm do cỡ tôm thả đang ở gian đoạn nhỏ, đặc biệt một số hộ nuôi sử dụng cỡ tôm nhỏ hơn post 10, giai đoạn này chúng mới hoàn thiện về quá trình biến thái song chưa hoàn thành quá trình sinh lý, dễ bị ảnh hưởng từ các yếu tố môi trường nước nuôi (BioAqua, 2014), đồng thời ảnh hưởng sốc lên tôm (nhiệt độ, độ mặn, pH….) tác động mạnh hệ thống bảo vệ của tôm tăng nguy cơ nhiễm bệnh trong đó có bệnh virus đốm trắng (Tendencia *et al.,* 2010).

Xét về yếu tố nguy cơ là sinh vật khác ngoài tôm chân trắng, kết quả nghiên cứu cho thấy có 11 loài động vật "hoang dã"ghi nhận xuất hiện trong vùng nuôi tôm, trong đó có 5 loài thuộc giáp xác (cáy đỏ, tôm rảo, tôm gai, tôm càng và còng lông) (Bảng 4.13). Trong số 11 loài được chỉ ra, có đến 10, 11 loài lần lượt có mặt tại vùng nuôi Nghệ An và Quảng Ninh, trong khi đó tại Nam Định chỉ với 6 loài được phát hiện có mặt trong vùng nuôi (Bảng 4.13).

Bảng 4.13. Thành phần các loài sinh vật xuất hiện trong vùng nuôi tôm.

TT	Loài sinh vật	Tên khoa học	Vùng nghiên cứu		
			Nghệ An (n=50)	**Nam Định** (n=45)	**Quảng Ninh** (n=49)
1	Cá bống, n(%)	*Gobius* sp	27(54,0)	-	2 (4,1)
2	Cáy đỏ, n(%)	*Uca arcuata*	**17(34,0)**	**8(17,8)**	**13(27,9)**
3	Tôm gai, n(%)	*Exopalaemon carinicauda*	**30(60,0)**	**7(15,6)**	**10(20,4)**
4	Tôm càng, n(%)	*Macrobrachium nipponense*	**17(34,0)**	**11(24,4)**	**5(11,6)**
5	Còng lông, n(%)	*Macrophthalmus convexus*	1(2,0)	-	4(8,2)
6	Ốc đinh, n(%)	*Cerithium cingulata*	**20(40,0)**	**39(86,7)**	**17(34,9)**
7	Dắt, n(%)	*Corbula erythrodon*	2(4,0)	-	-
8	Vẹm, n(%)	*Mytilus* sp	3(6,0)	5 (11,1)	1(2,3)
9	Nòng nọc, n(%)	*Tylototriton* sp	**15(30,0)**	**-**	**5(11,6)**
10	Tôm rảo, n(%)	*Metapenaeus ensis*	4 (8)	6 (13,3)	1(2,3)
11	Giun nhiều tơ, n(%)	*Nephthys polybranchia*	1(2,0)	-	1(2,3)

Ghi chú: (-) không xuất hiện ở vùng nuôi

Cáy đỏ, tôm gai, tôm càng, tôm rảo và ốc đinh là 5 loài sinh vật bắt gặp ở cả 3 vùng nghiên cứu, đồng thời chiếm tỷ lệ xuất hiện cao hơn so với các loài sinh vật khác, đặc biệt ốc đinh xuất hiện phổ biến và tỷ lệ cao ở Nam Định (86,7%), Nghệ An (40%) và Quảng Ninh (34,9%) (Bảng 4.13). Ngoài ra, cá bống xuất hiện khá phổ biến ở Nghệ An (54%) và Quảng Ninh (18,6%) bên cạnh 1 số

loài vẹm, nghêu và giun nhiều tơ hiện diện với tỷ lệ thấp lần lượt tương ứng 6,0%, 4,0%, 2,0% và 2,0-2,3% (Bảng 4.13).

Trong vụ nuôi thông thường có bổ sung nước vào ao nuôi, đây là hoạt động tạo điều kiện các sinh vật xâm nhập vào ao nếu chủ hộ không nghiêm túc thực hiện kiểm soát tốt nguồn nước vào ao (sử dụng lưới lọc, khử trùng nước trong ao lắng); tuy vậy, một số hộ nuôi không sử dụng ao lắng, đặc biệt Quảng Ninh có đến 60,5%, Nghệ An (12%). Các hộ nuôi này áp dụng biện pháp xử lý nước ngay trong ao nuôi tôm. Bên cạnh đó, tỷ lệ số hộ sử dụng lưới lọc ở cả 3 tỉnh đều thấp dao động trong khoảng 16,3-33,3% (Hình 4.1). Đây có thể là một trong những yếu tố quan trọng, lý giải tại sao các ao nuôi áp dụng mô hình nuôi thâm canh với quy mô đầu tư cao (con giống, thức ăn, ao đầm….) song tôm nuôi vẫn nhiễm bệnh, đặc biệt bệnh đốm và hoại tử gan tụy cấp. Thực tế trong quá trình nuôi, nghiên cứu đã xác nhận có hiện diện của 11 loài sinh vật (Bảng 4.13), trong số đó nhiều loài thuộc phân ngành đã xác định mang và lan truyền bệnh virus đốm trắng cho tôm nuôi như giáp xác (The World Bank, 2014), nhuyễn thể (Vazquez-Boucard *et al.*, 2010) và giun nhiều tơ (Haryadi *et al.*, 2015). Chúng là mối nguy tiềm ẩn, do đó khi xuất hiện trong ao nuôi, tôm nuôi có nguy cơ nhiễm bệnh đốm trắng, đặc biệt giáp xác là loài mẫn cảm cao đối với virus đốm trắng từ loài có kích thước nhỏ copepod (Chou Hsin-Yiu *et al.*, 1995; Yan *et al.*, 2007) cho đến các loài cua cỡ lớn (Pradeep *et al.*, 2012; Sahul Hameed *et al.*, 2003). Cá (cá bống, rô phi và cá đối) xuất hiện ở ao các hộ nuôi không nhiều ngoại trừ cá bống (ở Nghệ An và Quảng Ninh với tỷ lệ lần lượt tương ứng là 50 và 18,6%), các loài cá nói chung chưa có nghiên cứu chỉ ra là vật mang và lan truyền virus đốm trắng lên tôm nuôi, song chúng sẽ ảnh hưởng đến tôm nuôi do cạnh tranh thức ăn trong ao. Như vậy có thể thấy, tất cả các thao tác kỹ thuật cả trước và trong quá trình nuôi có vai trò quan trọng như nhau, 1 trong số đó không thực hiện nghiêm ngặt là kết quả xuất hiện sinh vật mang mầm bệnh, gây sốc tôm nuôi, tăng nguy cơ tôm nhiễm bệnh.

Hiện nay, trên thế giới cũng như ở Việt Nam chưa có biện pháp trị bệnh

đốm trắng hữu hiệu nào được áp dụng trong nuôi tôm, tuy nhiện biện pháp phòng bệnh đã được các nhà nghiên cứu chỉ ra và khuyến cáo áp dụng. Biện pháp phòng bệnh phổ biến nhất được khuyến cáo là biện pháp phòng bệnh tổng hợp bao gồm các khâu: khử trùng trứng và ấu trùng tôm, sử dụng tôm bố mẹ không mang mầm bệnh; khử trùng nước ương, nuôi; quản lý tốt môi trường - kiểm tra quan trắc môi trường nuôi thường xuyên; loại bỏ sinh vật mang mầm bệnh, sử dụng lưới chắn ngăn chặn sự xâm nhập của sinh vật mang mầm bệnh vào khu vực nuôi tôm, phát hiện sớm sự hiện diện của virus trong môi trường nuôi bằng phương pháp PCR (Chanratchakool, 1995).

Bên cạnh đó, một số nghiên cứu chỉ ra hiệu quả của việc sử dụng các chất kích thích miễn dịch như peptidoglycan, lipopolysacharide, β-1,3-glucan và β-1,6-glucan (Chang *et al.,* 2003; Song *et al.,* 1997), chất kháng virus-peptide 2E6 chiết xuất từ cây cỏ Chỉ (*Cynodon dactylon*) (Balasubramanian *et al.*,2008) hoặc chiết xuất từ cây Diệp Hạ Châu (Lý Thị Thanh Loan và cs., 2012). Tuy nhiên, tất cả các chất nêu trên được xem là những chất tiềm năng trong công tác phòng bệnh đốm trắng cho tôm ở quy mô phòng thí nghiệm, đến nay chưa được áp dụng rộng rải và chưa có báo cáo về hiệu quả trong điều kiện thực tế.

Một hướng nghiên cứu khác trong việc tìm giải pháp phòng bệnh đốm trắng ở tôm là tạo các dạng vaccine, chế phẩm dựa trên protein cấu trúc của WSSV với mục đích kích thích đáp ứng miễn dịch của tôm chống lại bệnh do WSSV gây ra. Một trong số protein cấu trúc được quan tâm là VP28. VP28 là một loại protein vỏ chính của WSSV, có vai trò chính giúp vi rút gắn lên tế bào tôm, khởi đầu cho quá trình nhiễm vi rút vào tế bào tôm. Vì vậy protein VP28 đã được chọn làm kháng nguyên đích trong việc tạo chế phẩm dạng vacine để phòng ngừa bệnh đốm trắng ở tôm. VP28 đã được biểu hiện thành công ở *E. coli* khi sử dụng sản phẩm trộn với thức ăn cho tôm ăn kết quả cho thấy hiệu quả bảo vệ miễn dịch lên tới 70% (Witteveldt *et al.,* 2004a, b). Gần đây nhiều nhóm nghiên cứu đã tập trung vào việc phát triển tạo chế phẩm Probiotic dạng bào tử *Bacillus subtilis* tái tổ hợp biểu hiện VP28 để phòng bệnh đốm trắng ở tôm (Fu *et al.,*

2011; Phan Tuấn Nghĩa và cs., 2015). Song kết quả thu được còn hạn chế, mới chỉ dừng lại ở quy mô phòng thí nghiệm. Thực tế cho đến hiện nay vẫn chưa có loại vắc xin hay bất kỳ sản phẩm nào tương tự đã được thương mại hóa mà có khả năng khống chế bệnh do WSSV gây ra..., biện pháp khuyến cáo đã và đang được áp dụng là người dân nghiêm túc thực hiện đầy đủ các công đoạn trong suốt cả quá trình vụ nuôi tôm.

4.2. NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐỘNG VẬT THỦY SINH CHỦ YẾU MANG WSSV TẠI NGHỆ AN, NAM ĐỊNH VÀ QUẢNG NINH

4.2.1. Động vật thuỷ sinh nhiễm WSSV thu được trong điều kiện tự nhiên

Tổng số 23 loài động vật thủy sinh thuộc 7 nhóm (giáp xác, bò sát, nhuyễn thể, cá, giun nhiều tơ, luân trùng và giáp xác chân chèo) được thu ở vùng nghiên cứu (Nghệ An, Nam Định và Quảng Ninh) từ ao lắng, ao tôm thâm canh và nguồn nước cấp (Bảng 4.14).

Bảng 4.14. Kết quả phân tích virus ở động vật thủy sinh

TT	Động vật thủy sinh	Tỷ lệ loài nhiễm WSSV/Số loài kiểm tra		
		Nghệ An	Nam Định	Quảng Ninh
1	Giáp xác	0/5	1/4 (25%)	0/5
2	Bò sát	0/1	#	0/1
3	Nhuyễn thể	0/3	0/2	0/2
4	Cá	0/1	#	0/1
5	Giun nhiều tơ	0/1	#	0/1
6	Luân trùng	0/7	0/4	0/4
7	Giáp xác chân chèo	0/5	0/4	0/5
Tổng		**0/23**	**1/14 (7,14%)**	**0/19**

Ghi chú: # đối tượng không thu được trong vùng nghiên cứu

Chi tiết các loài cụ thể thuộc 7 nhóm và số lượng mẫu thu phân tích tương ứng được chi tiết ở Bảng 3.1. Trong đó, Nghệ An có sự hiện diện đa dạng nhất với 23 loài thuộc 7 nhóm, mỗi nhóm giao động từ 1-7 loài/nhóm, Quảng Ninh với 19 loài thuộc 7 nhóm, mỗi nhóm giao động từ 1-5 loài/nhóm, trong khi đó Nam Định chỉ có 14 loài thuộc 4 nhóm có số loài từ 2-4 loài/nhóm (Bảng 4.14).

Trong số 23 loài động vật thủy sinh thu trong tự nhiên đã xác định được 1 loài thuộc giáp xác (tôm càng – *M.nipponense*) nhiễm WSSV, tỷ lệ nhiễm 7,14% (Bảng 4.14, 4.15 và Hình 4.6). Mẫu tôm càng này, chúng tôi thu được trong ao nuôi TCT thâm canh (70-80 con/m^2) tại Nam Định vào cuối tháng 6/2016. Một số thông tin được ghi nhận tại ao nuôi TCT có tôm càng nhiễm WSSV như sau: tôm thẻ được đưa vào ao nuôi bắt đầu từ tháng 4/2016, sau 1,5 tháng nuôi tôm thẻ có biểu hiện chết rải rác và đến cuối tháng nuôi thứ 2 (tương ứng tôm thẻ nuôi được 60 ngày tuổi) tôm chết với tỷ lệ cao. Nguyên nhân tôm thẻ chết được xác định là do nhiễm WSSV. Tôm nuôi ở giai đoạn 60 tuổi, có biểu hiện chết và dương tính với WSSV, vì vậy chủ hộ nuôi đã quyết định cho thu hoạch tôm. Khi chúng tôi thu được mẫu tôm càng ở ao, tôm càng có biểu hiện khỏe, cơ thể sáng màu, đường ruột đầy thức ăn (Hình 4.7A,B).

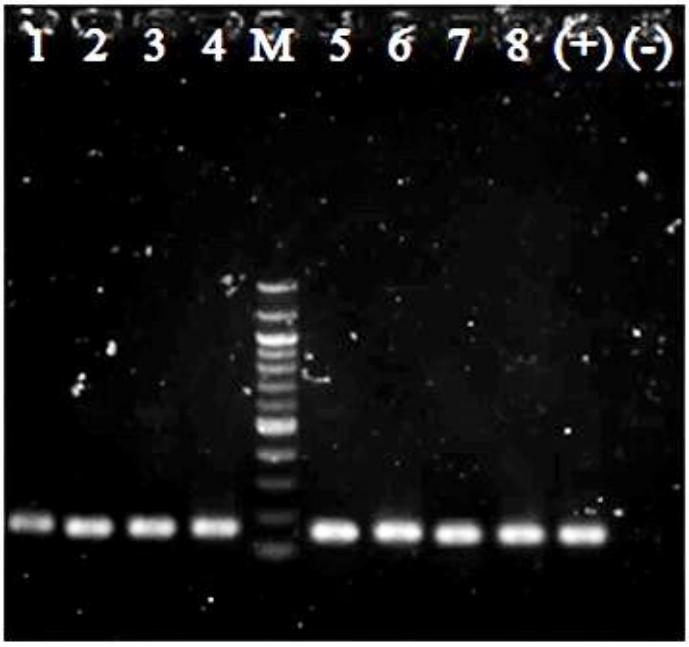
Chỉ xét riêng mẫu thuộc nhóm giáp xác thu tại Nam Định nhận thấy có 4 loài bao gồm tôm càng, tôm rảo, tôm gai và cáy đỏ xuất hiện ở vùng nuôi tôm. Trong đó, ở kênh cấp thu được 64 mẫu bao gồm tôm càng (11 mẫu), tôm rảo (15 mẫu), tôm gai (17 mẫu) và cáy đỏ (21 mẫu). Tại ao nuôi TCT không nhiễm WSD chúng tôi thu được tôm rảo và tôm gai với lần lượt là 7 và 5 mẫu, trong khi đó tại ao nuôi TCT bị WSD thu được1 loài tôm càng (8 mẫu) (Bảng 4.15). Như vậy số loài động vật giáp xác và số mẫu thu được tương ứng ở kênh cấp đa dạng và nhiều hơn so với trong ao nuôi tôm (Bảng 4.15). Tất cả 64 mẫu được cố định và phân tích chỉ tiêu WSSV, kết quả chỉ rõ duy nhất 1 loài tôm càng (8 mẫu) thu được trong ao nuôi TCT có kết quả dương tính với WSSV bằng kỹ thuật PCR (Hình 4.6 và Bảng 4.15). Mặc dù mang mầm bệnh do WSSV nhưng tôm càng không có biểu hiện bất thường, cơ thể sáng màu và phản xạ nhanh là những biểu

hiện dễ dàng nhận thấy khi thu mẫu (Hình 4.7). Trong số 4 loài giáp xác xuất hiện ở vùng nuôi Nam Định có tôm rảo là loài được xác định có khả năng mang và lan truyền WSSV cho tôm TCT và tôm sú (Hao *et al.*, 1999).

Bảng 4.15. Tên loài động vật thuộc nhóm giáp xác thu tại Nam Định

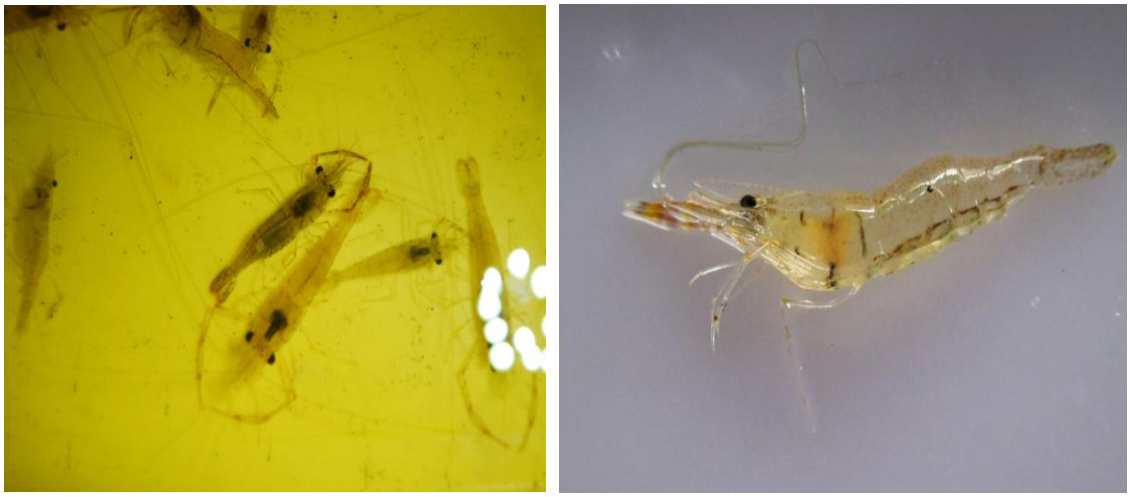
TT	Tên gọi theo địa phương	Tên khoa học	Tỷ lệ mẫu nhiễm WSSV/Số mẫu kiểm tra		
			Ao bị bệnh do WSSV	Ao không bị bệnh	Kênh cấp
1	Tôm càng	*Macrobrachium nipponense*	8/8	#	0/11
2	Tôm rảo	*Metapenaeus ensis*	#	0/7	0/15
3	Tôm gai	*Exopalaemon carinicauda*	#	0/5	0/17
4	Cáy đỏ	*Uca arcuata*	#	#	0/21
Tổng mẫu			**8**	**12**	**64**

Ghi chú: # loài không thu được ở điểm nghiên cứu



Hình 4.6. Tôm càng nhiễm WSSV thu trong điều kiện tự nhiên

M: Marker 100bp, 1-8 là số thứ tự 8 mẫu được thu trong ao nuôi tôm, (+) đối chứng dương và (-) đối chứng âm

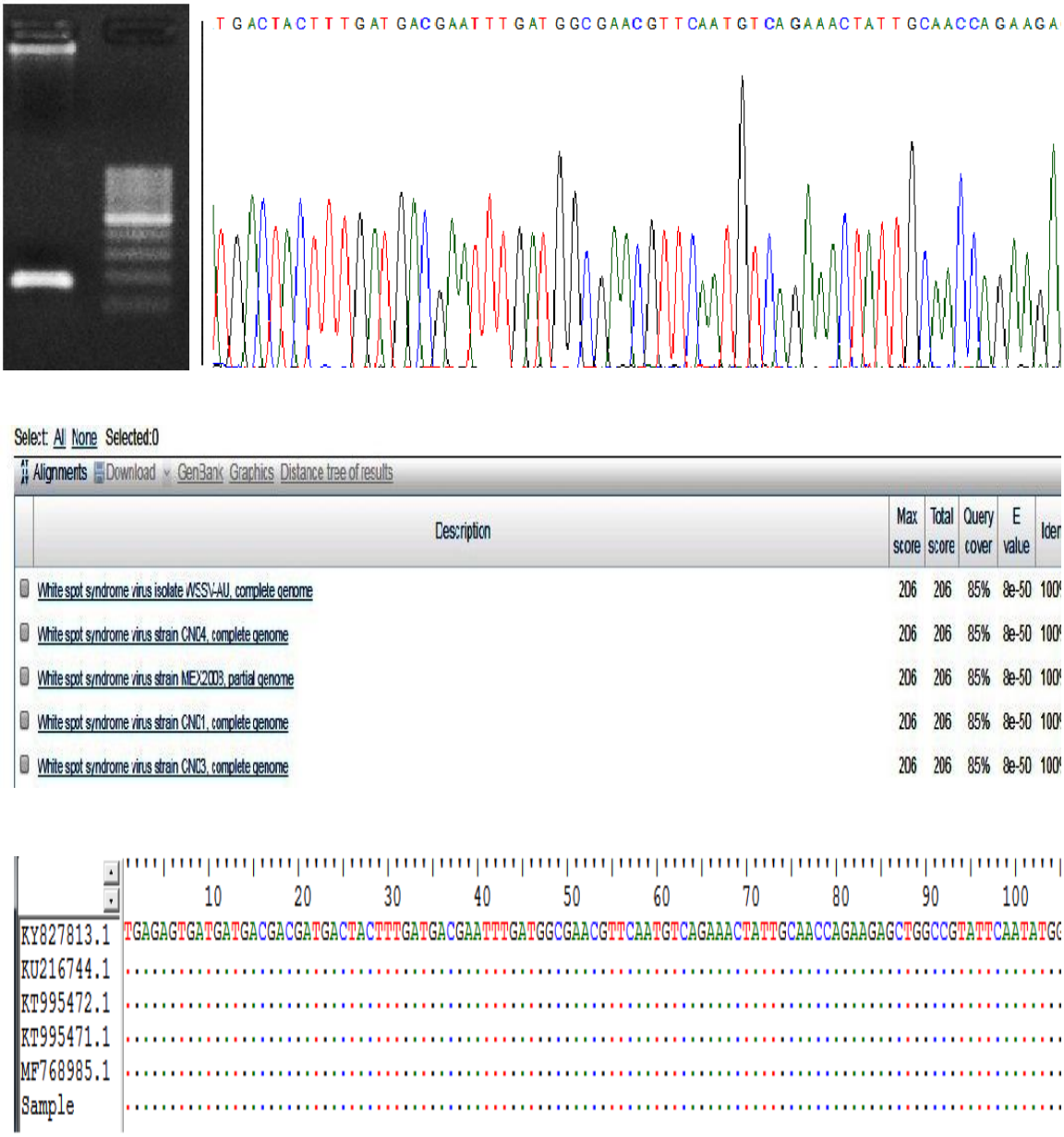


Hình 4.7. Hình thái tôm càng nhiễm WSSV
thu được ở ao nuôi tôm thẻ tại Nam Định
***(A)** Tôm khỏe, đường ruột tôm đầy thức ăn. **(B)**Cơ thể sáng màu*

Mặc dù nghiên cứu đã sử dụng cặp mồi WSSV 336 có kích thước 161bp để phát hiện WSSV trong mẫu tôm càng thu được ở tự nhiên bằng kỹ thuật PCR. Tuy nhiên để khẳng định đó là loài virus gây bệnh đốm trắng cho tôm nuôi, nghiên cứu tiếp tục thực hiện tinh sạch sản phẩm PCR và giải trình tự gen. Kết quả trình tự gen được so sánh tham chiếu trên ngân hàng gen. Kết quả so sánh cho thấy trình tự gen của virus nhiễm ở tôm càng có độ tương đồng là 100% so với trình tự của một chủng WSSV trên ngân hàng dữ liệu (Hình 4.8).

Kết quả giải trình tự như sau:

G A T G A G A C G T C G C T C A T C A A A G A T G G G G A A G A T C C T T A G A G A T C T T C A T G A G A G T G A T G A T G A C G A C G A T G A C T A C T T T G A T G A C G A A T T T G A T G G C G A A C G T T C A A T G T C A G A A A C T A T T G C A A C C A G A A G A G C T G G C C G T A T T C A A T A T G G T C C A G G T T T C



Hình 4.8. Kết quả định danh WSSV bằng sinh học phân tử

(A) *Sản phẩm PCR của virus nhiễm ở tôm càng chạy với cặp mồi WSSV366: ADN của virus được khuyếch đại bởi cặp mồi WSSV366 (giếng 1), 100bp DNA marker (giếng M).* ***(B)*** *giản đồ giải trình tự gen của virus.* ***(C)*** *Kết quả BLAST trình tự virus.* ***(D)*** *So sánh trình tự của virus với các trình tự tham chiếu.*

Khuyếch đại ADN của virus thu ở mẫu tôm càng tại Nam Định với cặp mồi WSSV366, sản phẩm ADN hiện rõ với độ dài khoảng 161bp (Hình 4.8A). Sản phẩm PCR đặc hiệu sau khi tinh sạch được giải trình tự và thu được các đỉnh

tín hiệu rõ ràng (Hình 4.8B). Kết quả BLAST tìm kiếm các trình tự tương đồng có trong Genbank cho thấy mẫu virus tương đồng rất cao (100%) với WSSV (Hình 4.8C). So sánh trình tự nucleotide (Hình 4.8D) cho biết virus tương đồng rất cao 6 mẫu white spot virus, không có đột biến điểm. Như vậy qua kết quả này, nghiên cứu khẳng định virus nhiễm ở tôm càng *(M. nipponense*) thu tại ao TCT nuôi thâm canh ở Nam Định là WSSV gây bệnh cho tôm nuôi nước lợ.

Trong các nghiên cứu đã được công bố thống kê tại Mục 2.3.1, giáp xác là loài được xác định có số lượng mang WSSV nhiều nhất chiếm khoảng 80% tổng số loài (123/153). Ở nghiên cứu này chúng tôi thu được 5 loài thuộc giáp xác bao gồm tôm càng, tôm gai, tôm rảo, cáy đỏ và còng lông, trong số này 3 loài tôm đã có công bố xác định có khả năng mang và lan truyền WSSV, đặc biệt tôm rảo là loài thu tại Việt Nam (Hao *et al.*, 1999; Lei *et al.*, 2002; OIE, 2016). Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi hoàn toàn trùng hợp khi chỉ ra tôm càng (*Macrobrachium nipponense*) nhiễm WSSV với tỷ lệ 7,14% (Bảng 4.14, Hình 4.6 và Hình 4.8). Hai loài thuộc cua (cáy đỏ và còng lông) hiện chưa có công bố nào chỉ ra chúng là loài có khả năng mang và lan truyền WSSV cho tôm nuôi nước lợ.

Hiện nay chưa có công bố nào trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng cho rằng cá và bò sát là loài có khả năng mang WSSV gây bệnh cho tôm nuôi nước lợ. Tương tự với các động vật thuộc nhóm nhuyễn thể (ốc đinh, vẹm và nghêu) chưa có kết quả về khả năng nhiễm WSSV ngoại trừ hàu (*Crassostrea gigas*). Mang và tuyến tiêu hóa của hàu nhiễm WSSV với tỷ lệ nhiễm lần lượt tương ứng 39% và 44% nhưng không gây bệnh cho hàu (Vazquez-Boucard *et al.*, 2012). Loài nhuyễn thể có hình thức ăn lọc vì vậy mang và ruột có kết quả dương tính với WSS là điều tất yếu khi trong môi trường nước có WSSV, do đó chúng còn được xem là sinh vật chỉ thị nhạy cảm khi sự hiện diện của WSSV ở mức thấp (Vazquez-Boucard *et al.*, 2010)

Động vật phù du bao gồm luân trùng và giáp xác chân chèo với 12 loài phổ biến bắt gặp ở ao nuôi và nguồn nước cấp, kết quả phân tích chỉ tiêu WSSV đều âm tính (Bảng 4.14). Trong số đó có 2 loài (*Branchionus plicatilis* và

Branchionus ucreus) đã được xác định dương tính với WSSV trong điều kiện tự nhiên và gây nhiễm ở Trung Quốc, tuy nhiên ở trong điều kiện tự nhiên số mẫu phân tích có kết quả dương tính với WSSV rất ít, chỉ với 3 trứng của *Branchionus ucreus* thu được trong ao nuôi có lịch sử tôm bị bệnh WSD (Yan *et al.*, 2004, 2007; Zhang *et al.*, 2006).

Nghiên cứu đã thu được *Nephthys polybranchiahu,* một loài giun nhiều tơ với số mẫu hạn chế (04 mẫu) và tất cả đều cho kết quả âm tính với WSSV bằng kỹ thuật phân tích PCR. Một thực tế dễ nhận thấy là các loài giun nhiều tơ trong tự nhiên hiện nay rất ít không chỉ vùng nghiên cứu mà ở hầu hết các thủy vực nuôi tôm nước lợ. Nguyên nhân có thể do các hộ nuôi tôm sử dụng nhiều loại hóa chất khử trùng, thuốc kháng sinh, đã ảnh hưởng đến nền chất đáy và ảnh hưởng trực tiếp đến loài giun, hơn nữa các hộ nuôi thâm canh, nền đáy được lót bạt do đó sự xuất hiện giun nhiều tơ trong ao nuôi là rất hiếm. Hiện nay, trên thế giới đã có công bố chỉ ra 2 loài thuộc giun nhiều tơ *Marphysa gravely* và *Dendronereis* spp mang WSSV và có khả năng lây truyền theo chiều ngang sang tôm trong cùng môi trường nuôi (Haryadi *et al.*, 2015; Vijayan *et al.*, 2005). Ở Việt Nam cũng đã xác định 1 loài giun cát (*Perinereis* sp) thu tại Khánh Hòa, sử dụng làm thức ăn nuôi vỗ tôm bố mẹ nhiễm WSSV trong điều kiện tự nhiên với tỷ lệ 32,07% (Phan Thị Vân và cs., 2017). Loài giun *Nephthys polybranchiahu* trong nghiên cứu của chúng tôi không thuộc loài đã được công bố nhiễm WSSV trên thế giới và ở Việt Nam. Tuy nhiên, với kết quả đã công bố nêu trên cho thấy: một số loài thuộc giun nhiều tơ đã xác định mang WSSV gây bệnh cho tôm nuôi do đó cần thận trọng và quan tâm đến nhóm loài giun nhiều tơ cho dù loài giun thu được trong nghiên cứu này có kết quả âm tính với WSSV.

4.2.2. Động vật thủy sinh chủ yếu mang WSSV trong điều kiện thí nghiệm

Trong khuôn khổ nghiên cứu này, tiêu chí để xác định động vật thủy sinh chủ yếu là loài động vật thủy sinh xuất hiện nhiều, với số lượng lớn, chúng bao gồm tôm rảo, tôm càng, tôm gai, cáy đỏ, nòng nọc ếch, ốc đinh, cá bống và 9 loài động vật phù du *(Branchionus angularis, B. budapestinensis, B. calyciflorus, B.*

plicatilis, B. ucreus, Polyarthra, Microsetella norvegica, Neocalanus gracilis và *Oithona nana)* là động vật thủy sinh chủ yếu (Bảng 3.1).

Theo tiêu chí nêu trên, động vật phù du bao gồm luân trùng và giáp xác chân chèo thu được trong luận án này là các loài động vật thủy sinh chủ yếu. Tất cả đều có kết quả âm tính với WSSV khi thu ở điều kiện tự nhiên tại ao nuôi, nguồn cấp nước. Tuy nhiên chúng tôi không bố trí gây nhiễm WSSV lên 9 loài động vật phù du này trong điều kiện thí nghiệm. Lý do bởi thí nghiệm thực hiện được yêu cầu phải có quy mô lớn bao gồm nuôi và kiểm soát được tảo thuần, sạch bệnh làm thức ăn cho 9 loài động vật phù du. Thí nghiệm cũng gặp khó khăn về việc thu mẫu đủ số lượng tương ứng với 9 loài động vật phù du đưa vào thí nghiệm. Do đó chúng tôi không tiến hành bố trí gây nhiễm WSSV lên động vật phù du trong điều kiện thí nghiệm.

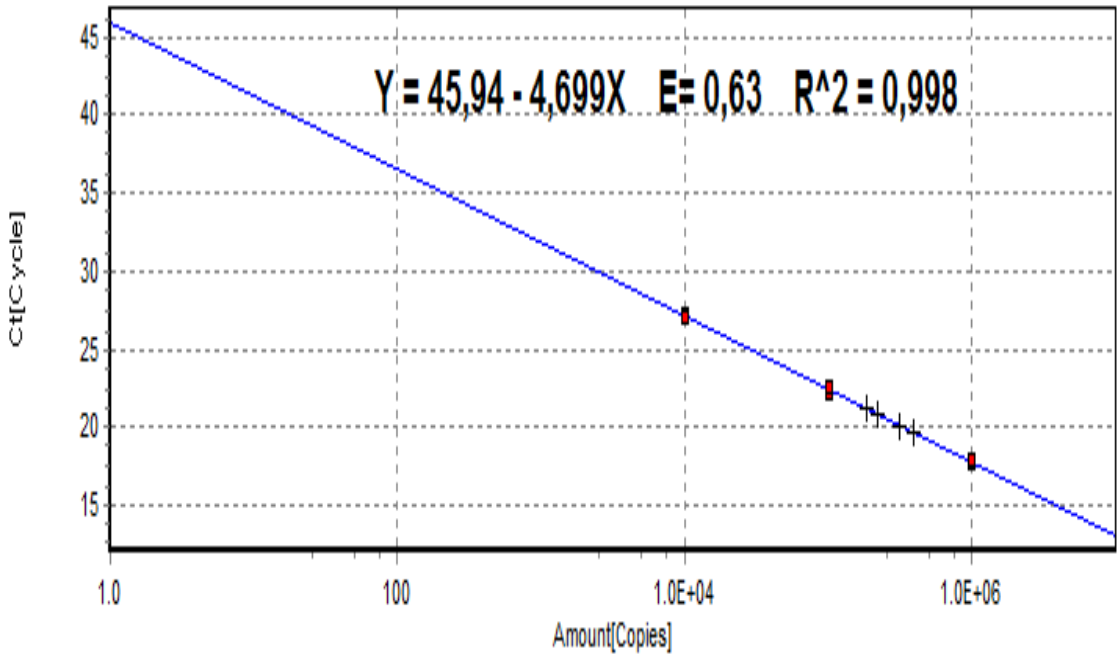
Tôm rảo là loài xuất hiện phổ biến trong nghiên cứu này, song đây là loài tôm được xác định có khả năng mang và lan truyền WSSV cho tôm nuôi ở Việt Nam (Hao *et al.,* 1999) và tôm càng đã nhiễm WSSV khi thu mẫu ở trong điều kiện tự nhiên vì vậy tôm rảo và tôm càng không lựa chọn đưa vào thí nghiệm gây nhiễm. Tóm lại, có 5 loài bao gồm tôm gai, cá bống, nòng nọc ếch, ốc đinh và cáy đỏ được lựa chọn đưa vào gây nhiễm WSSV trong điều kiện thí nghiệm.

Kích thước của 5 loài động vật lựa chọn đưa vào thí nghiệm gây nhiễm có khác nhau, vì vậy chúng tôi phân ra làm 2 nhóm. Cụ thể: nhóm 1 gồm một loài là cáy đỏ, có kích thước lớn hơn có khả năng áp dụng được phương pháp tiêm, nhóm 2 gồm 4 loài còn lại (cá bống, nòng nọc ếch, tôm gai và ốc đinh) có kích thước nhỏ được tiến hành thí nghiệm gây nhiễm WSSV bằng hình thức ngâm.

4.2.2.1. Nồng độ WSSV sử dụng trong thí nghiệm gây nhiễm

WSSV được thu nhận từ nguồn tôm chân trắng bệnh ở nông hộ tại Quảng Ninh và Hải Phòng. Mẫu tôm đã được kiểm tra xác định dương tính với WSSV, âm tính với YHV, Taura, IHHNV bằng kỹ thuật PCR trước khi nghiền lấy dịch lọc chứa WSSV. Dịch lọc chứa WSSV được chia nhỏ chứa trong các ống falcon 50

mL và bảo quản ở tủ lạnh -80^{0}C với mục đích có được một nồng độ virus cố định trong các lần thí nghiệm tiếp theo cho cùng một phương pháp gây nhiễm. Nghiên cứu đã tiến hành định lượng nồng độ WSSV trong dịch thu được bằng real time PCR. Kết quả thu được được trình bày tại Hình 4.9 và Bảng 4.16.



Hình 4.9. Đường chuẩn định lượng nồng độ WSSV (copy/mL)

(với E=0,63; R^2 =0,998)

Kết quả phân tích nồng độ virus bằng real time PCR là phương pháp có độ tin cậy cao thể hiện ở đường chuẩn có độ hồi quy tuyến tính tốt đạt giá trị R^2=0,992. Từ kết quả thu được, nghiên cứu tính được nồng độ virus trong 2 mẫu WSSV Hải Phòng và WSSV Quảng Ninh lần lượt tương ứng 1,02x10^6 copy/mL và 1,31x10^{7}copy/mL.

Bảng 4.16. Nồng độ WSSV sử dụng trong thí nghiệm gây nhiễm

TT	Tên mẫu	Nồng độ (copy/mL)	Phục vụ mục đích
1	WSSV Hải Phòng	1,02x10^6	Gây nhiễm tiêm
2	WSSV Quảng Ninh	1,31x10^7	Gây nhiễm ngâm

4.2.2.2. Động vật thủy sinh nhiễm WSSV trong điều kiện thí nghiệm bằng phương pháp tiêm

Nồng độ WSSV (copy/mL) hay độ pha loãng của dịch nghiền dưới màng lọc 0,45µm sử dụng gây nhiễm lên vật chủ đã được nghiên cứu và công bố. Sử dụng 0,1mL dung dịch chứa WSSV ở nồng độ $10^{6,6}$copy/mL tiêm lên tôm, kết quả cho thấy: chỉ sau 84 giờ gây nhiễm tỷ lệ tôm chết lên đến 50% (Escobedo-Bonilla *et al.,* 2006). Một thí nghiệm khác khi sử dụng WSSV ở nồng độ 10^{6}copy/mL tiêm lên tôm, kết quả cho thấy: sau 5 ngày tỷ lệ tôm chết là 50%, đến ngày thứ 9 tôm chết 100% (Wu *et al.*, 2005). Nồng độ WSSV thấp hơn cũng đã được xác định hiệu quả gây chết: với nồng độ 10^{1}-10^{2} copy/mL gây tôm chết ở ngày thứ 3 và tỷ lệ chết lên đến 80% ở ngày thứ 14. Khi nâng nồng độ lên 10^{3}-10^{5} copy/mL WSSV gây tôm chết 100% ở ngày thứ 12 của thí nghiệm (Wu *et al.*, 2005), đặc biệt có thí nghiệm chỉ ra với liều 1 x 10^{4}copy/mL gây chết tôm với tỷ lệ lên đến 100% sau 52 giờ tiêm (Durand and Lightner, 2002). Qua đó, cho thấy WSSV có độc lực mạnh gây chết vật chủ ngay khi ở nồng độ copy thấp 10^{1} -10^{2}copy/mL. Do đó đối với gây nhiễm WSSV lên vật chủ là tôm, các nghiên cứu phổ biến sử dung dịch thu được dưới màng lọc 0,45µm pha loãng ở 10^{-2}-10^{-4} để sử dụng gây nhiễm (Chen *et al.*, 2004; Laramore., 2007; Tuyen *et al.,* 2014). Đối với thí nghiệm gây nhiễm lên cua (*Scylla serrata*) cũng được báo cáo với độ pha loãng 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} và 10^{-4} lần lượt ảnh hưởng gây chết với tỷ lệ tương ứng là 100%, 100%, 66,7% và 38,9% ở 10 ngày sau khi tiêm (Liu *et al.,* 2011). Với những thông tin nêu trên, trong nghiên cứu này nồng độ WSSV đạt 1,02x10^{6}copy/mL (tương ứng với dịch thu được dưới màng lọc 0,45µm ở độ pha loãng 10^{-2}) gây nhiễm lên vật thí nghiệm hoàn toàn đảm bảo liều gây nhiễm.

Một thí nghiệm gây nhiễm thông thường sẽ thu mẫu và phân tích sau khoảng thời gian tính theo ngày. Tuy nhiên ở thí nghiệm này, nghiên cứu đã thực hiện theo dõi và thu mẫu theo các mốc giờ với mục đích nhằm xác định được thời điểm sớm nhất virus được nhân lên trong tế bào vật chủ đồng thời sau bao

nhiêu giờ virus có mặt trong môi trường nuôi khi vật chủ nhiễm tác nhân gây WSSV. Hơn nữa, kết quả có ý nghĩa trong thí nghiệm tiếp theo xác định bao nhiêu giờ khi xuất hiện WSSV trong môi trường nuôi thì tôm nhiễm WSSV.

Mẫu cáy đỏ ở các lô trong thí nghiệm được phân tích bằng phương pháp phát hiện mRNA của WSSV, kết quả dương tính WSSV cho phép chúng tôi khẳng định WSSV đã nhân lên trong tế bào vật chủ. Sau 107 giờ (4,5 ngày) gây nhiễm WSSV đã nhân lên trong tế bào cáy đỏ với tỷ lệ nhiễm 66,7% (Bảng 4.17 và Hình 4.10). Ở thí nghiệm gây nhiễm WSSV lên tôm trong điều kiện 22^0C, WSSV đã nhân lên trong tế bào tôm sau 27-30 giờ tiêm và ở tại thời điểm này tôm nhiễm WSSV chưa có biểu hiện bất thường và chưa có tỷ lệ chết ghi nhận (Sun *et al.,* 2013). Mặc dù, điều kiện thí nghiệm chưa có tính tương đồng cao, song qua đây có thể thấy WSSV cần thời gian dài hơn để nhân lên trong tế bào cáy đỏ so với quá trình nhân lên trong tôm. Đồng thời, cặn đáy bể và nước trong bể thí nghiệm đã xác định có mặt WSSV sau 175h cảm nhiễm (nghĩa là sau 68h kể từ khi cáy đỏ có kết quả dương tính với WSSV). Điều đó chứng tỏ đã có sự tồn tại WSSV ngoài vật chủ, kết quả này trùng khớp với các nghiên cứu minh chứng cho sự sống của WSSV ngoài vật chủ đã được chỉ ra từ những năm 1998 (Momoyama *et al.,* 1998; Nakano *et al.,* 1998). WSSV có thể sống ngoài vật chủ trong môi trường nước biển ở 30^0C ít nhất 30 ngày và trong nước ao nuôi ít nhất 3-4 ngày (Momoyama *et al.,* 1998; Nakano *et al.,* 1998). Bên cạnh đó, các mẫu (cáy đỏ, nước và cặn đáy) thu ở lô đối chứng đều cho kết quả âm tính với WSSV ở các thời điểm thu mẫu phân tích (Bảng 4.17 và Hình 4.10).

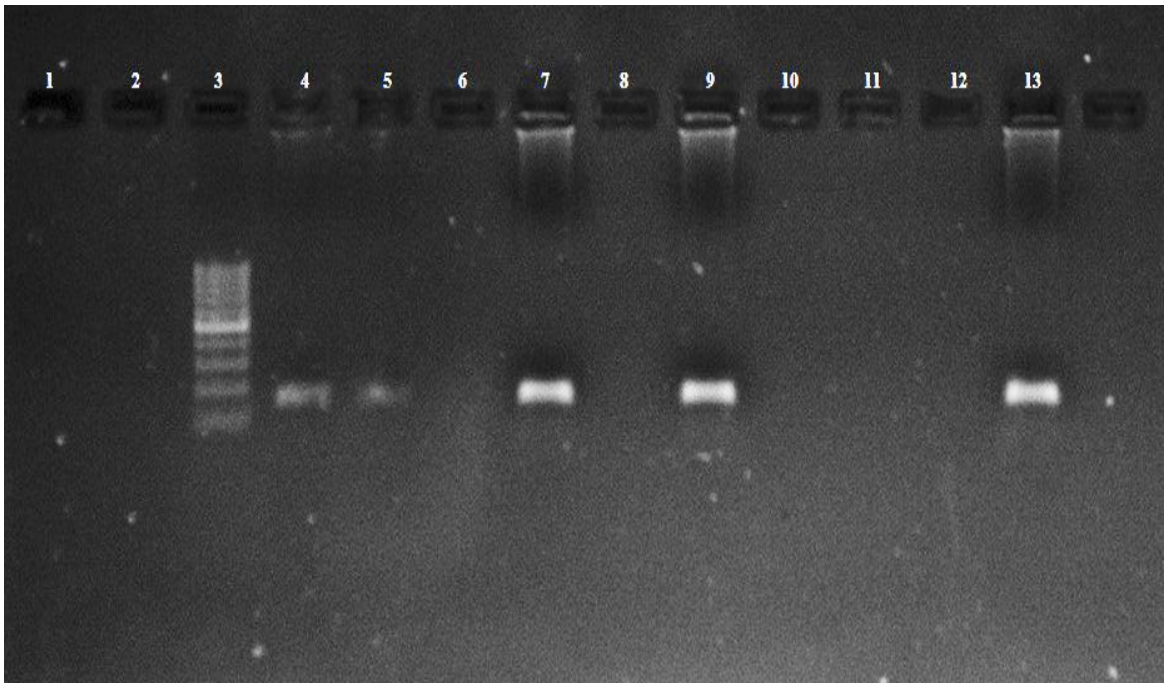
Trong quá trình theo dõi thí nghiệm nhận thấy, mặc dù WSSV nhân lên trong tế bào cáy đỏ ở lô thí nghiệm song không có bất kỳ biểu hiện bệnh lý khác thường nào ở cáy đỏ giữa 2 lô (thí nghiệm và đối chứng). Cáy đỏ hoạt động bình thường, phản xạ nhanh khi có tiếng động, màu sắc sáng hơn so với cáy đỏ ở thực địa, đây được biết đến như đặc điểm sinh lý phòng vệ của các sinh vật nói chung và cáy nói riêng, màu sắc thay đổi theo môi trường. Bên cạnh đó, chúng thường

bò lên rổ (khu vực không có nước) vào buổi sáng và ở trong môi trường nước suốt buổi chiều, biểu hiện hoạt động này phù hợp với đặc điểm sinh lý của Cáy đỏ khi trong ngày môi trường sống thường có hiện tượng thủy triều lên (cáy sống hoàn toàn trong nước), và thủy triều xuống (cáy sống trên cạn) cùng xuất hiện trong một ngày.

Bảng 4.17. Kết quả phân tích virus sau khi gây nhiễm nhân tạo WSSV lên cáy đỏ

Thời gian sau cảm nhiễm (giờ)	Kết quả phân tích WSSV					
	Lô cảm nhiễm WSSV			Lô đối chứng		
	Cáy đỏ	Nước	Cặn đáy bể	Cáy đỏ	Nước	Cặn đáy bể
24	-					
55	-					
72	-					
107	+(*)	-	-	-		
120	+	-	-	-	-	-
135	+	-	-	-	-	-
175	+	+	+	-	-	-
720	+	+	+	-	-	-

Ghi chú: (*) thời điểm cáy đỏ có kết quả dương tính với WSSV ở 107 giờ sau khi gây nhiễm nhân tạo, (-): mẫu phân tích có kết quả âm tính với WSSV, (+): mẫu phân tích có kết quả dương tính với WSSV. Thí nghiệm được bố trí trong điều kiện độ mặn 8-10‰ và nhiệt độ 27-29^{0}C, có sục khí nhẹ cung cấp oxi suốt trong thời gian triển khai thí nghiệm



Hình 4.10. WSSV đã được xác định ở các mẫu sau khi gây nhiễm theo thời gian

1,2,4 và 5: mẫu cáy đỏ thu sau 55, 72, 120 và 107h gây nhiễm, 6, 7, mẫu nước thu sau 107 và 175h gây nhiễm, 8,9 mẫu cạn bể thu sau 107 và 175h gây nhiễm, 10, 11 và 12 mẫu cáy đỏ, nước và cặn bể của lô đối chứng, 13 đối chứng dượng, 3: Marker 100bp.

Sau 107h gây nhiễm, WSSV đã sao chép nhân lên trong *U. arcuata* với kết quả dương tính virus đốm trắng bằng PCR thông qua kỹ thuật tách chiết mRNA, tổng hợp cDNA và khuyếch đại DNA (Bảng 4.17 và Hình 4.10), thí nghiệm tiếp tục được nuôi theo dõi đến 30 ngày nhưng *U. arcuata* không có bất kỳ biểu hiện khác thường nào. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả của một số nghiên cứu khác, khi chỉ ra rằng nhiều loài sinh vật thuộc giáp xác như cua xanh, cua bùn… là sinh vật chủ mang WSSV dưới hình thức lây nhiễm tự nhiên và nhân tạo, nhưng WSSV không ảnh hưởng đến vật chủ trong quá trình phát triển (Kanchanaphum *et al.*, 1998; Rajendran *et al.*, 1999b; Sahul Hameed *et al.*, 2003).

Virus đốm trắng có khả năng sao chép, nhân lên trên nhiều ký chủ khác nhau, nhiều nhất phải kể đến nhóm giáp xác, trong đó có cua (57 loài) thông qua hình thức gây nhiễm trong thí nghiệm và tự nhiên (Desrina *et al.*, 2013; Trương

Thị Mỹ Hạnh và cs., 2016). Đối với cua, WSSV không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống đồng thời không gây ra biểu hiện bệnh lý khác thường (Chakraborty and Ghosh., 2014; Rajendran *et al.,* 1999b), song đây được xác định là mối nguy tiềm ẩn gây bệnh lên tôm theo hình thức lan truyền bệnh theo chiều ngang (Kanchanaphum *et al.,* 1998).

4.2.2.3. Động vật thủy sinh nhiễm WSSV trong điều kiện thí nghiệm bằng phương pháp ngâm.

Động vật thủy sinh với kích thước nhỏ bao gồm tôm gai, cá bống, ốc đinh, nòng nọc ếch có kết quả âm tính với WSSV khi thu mẫu trong điều kiện tự nhiên (Bảng 4.14), đồng thời là động vật thủy sinh chủ yếu trong nghiên cứu này (Bảng 3.1), do đó chúng được lựa chọn tiến hành thử nghiệm gây nhiễm khả năng mang WSSV.

Nồng độ copy WSSV/mL sử dụng gây nhiễm tôm có kích cỡ từ 2-5g/con đã được nghiên cứu chỉ ra với nồng độ 10^4copy/mL là liều gây chết 50% (Corteel *et al.,* 2009) và liều gây chết LD_{75} là $1,3x10^4$copy/mL (Phan Tuấn Nghĩa và cs., 2015). Tương tự như phương pháp gây nhiễm bằng hình thức tiêm thì ở phương pháp này rất nhiều các nghiên cứu sử dụng liều pha loãng để gây nhiễm, kết quả chỉ ra với độ pha loãng 10^{-2}-10^{-7} là liều có thể gây nhiễm cho tôm nuôi, tỷ lệ mẫu có kết quả dương tính với WSSV tương ứng với độ pha loãng và thời gian như sau: 100% mẫu dương tính WSSV độ pha loãng 10^{-2} (sau 72h) và 10^{-3} -10^{-5} (sau 96h) và 10^{-6}-10^{-7} sau 168h có 25% tôm dương tính với WSSV (Escobedo-Bonilla *et al.,* 2005), khi áp dụng phương pháp ngâm độ pha loãng dịch chứa WSSV phổ biến ở 10^{-2}-10^{-3}. Với những cơ sở nêu trên, chúng tôi sử dụng liều ngâm động vật thủy sinh trong môi trường nước chứa nồng độ WSSV là $1,31x10^7$copy/mL (tương ứng với dịch thu được dưới màng lọc 0,45µL ở độ pha loãng 10^{-2}).

Nghiên cứu sử dụng độ pha loãng 10^{-2} tương ứng với $1,31x10^7$copy/mL sử dụng gây nhiễm cho 4 động vật thủy sinh, kết quả cho thấy sau 25 ngày theo dõi tỷ lệ nhiễm WSSV tích lũy của 3 đối tương (nòng nọc ếch, cá bống và ốc đinh) là

0%, trong khi đó tỷ lệ nhiễm WSSV của tôm gai là 100%. Bên cạnh đó nghiên cứu đã xác định ở ngày thứ 5 tôm gai đã có kết quả nhiễm 100% (Bảng 4.18).

Các động vật gây nhiễm trong thí nghiệm thu theo thời gian từ ngày thứ 5, 10, 15, 20 và 25, tất cả các mẫu thu được áp dụng phương pháp phân tích bằng cách phát hiện mRNA của WSSV trong mẫu phân tích, kết quả dương tính với WSSV cho phép chúng tôi khẳng định WSSV đã nhân lên trong tế bào vật chủ (tôm gai), trong trường hợp mẫu có kết quả âm tính đồng nghĩa với virus không nhân lên trong tế bào vật chủ (nòng nọc ếch, ốc đinh và cá bống).

Bảng 4.18. Kết quả xác định thời gian virus nhân lên trong tế bào động vật thủy sinh trong thí nghiệm gây nhiễm

Loài	Nhóm	n	Thời gian (ngày)					Tỷ lệ nhiễm tích lũy (%)
			5	10	15	20	25	0
Nòng nọc ếch	Cảm nhiễm	21	-	-	-	-	-	0
	Đối chứng	14	-	-	-	-	-	0
Cá bống	Cảm nhiễm	21	-	-	-	-	-	0
	Đối chứng	14	-	-	-	-	-	0
Ốc đinh	Cảm nhiễm	21	-	-	-	-	-	0
	Đối chứng	14	-	-	-	-	-	0
Tôm gai	Cảm nhiễm	21	+	+	+	+	+	100
	Đối chứng	14	-	-	-	-	-	0

Ghi chú: (-) kết quả âm tính với WSSV, (+) kết quả dương tính với WSSV

Bên cạnh việc phân tích mẫu với chỉ tiêu WSSV thì các dấu hiệu bệnh lý bằng quan sát cũng được ghi nhận. Tất cả các lô thí nghiệm cũng như lô đối chứng, động vật gây nhiễm không có sự khác biệt về hoạt động, màu sắc, đặc

biệt đối với tôm gai, các mẫu lô gây nhiễm có kết quả dương tính với WSSV (virus đã nhân lên trong tế bào tôm gai) song không có dấu hiệu bất thường nào khác về bệnh lý so với lô thí nghiệm đối chứng. Tôm gai có phản xạ nhanh (khi gõ tay vào thành bể, tôm nhảy lên mặt nước), cơ thể sang màu, đường ruột đầy thức ăn (Hình 4.11).

Như vậy, sau khi áp dụng phương pháp gây nhiễm bằng ngâm của Chen *et al.*, 2004, kết quả cho thấy sau 5 ngày gây nhiễm, WSSV đã nhân lên trong tế bào tôm gai, trong khi đó cũng cùng phương pháp gây nhiễm và cùng thời gian theo dõi nhưng WSSV không nhân lên trong tế bào cá bống, ốc đinh và nòng nọc ếch (Bảng 4.18).

Chúng tôi tiến hành tiếp thí nghiệm lần 2 đối với những động vật thủy sinh bao gồm ốc đinh, nòng nọc ếch và cá bống khi có kết quả ở thí nghiệm lần 1 là WSSV không nhân lên trong tế bào. Các bước tiến hành cơ bản áp dụng như lần 1, song có thay đổi cách tiến hành ở bước ba. Động vật gây nhiễm được nuôi suốt trong môi trường nước có chứa WSSV thay vì trước đây chỉ ngâm trong 120 phút. Ở thí nghiệm lần 2, thí nghiệm được theo dõi trong 30 ngày, kết quả thu được tương tự như thí nghiệm lần 1, các mẫu cá bống, ốc đinh và nòng nọc ếch trong lô thí nghiệm gây nhiễm cũng như lô đối chứng đều âm tính với WSSV từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 30 của thí nghiệm. Cá bống, ốc đinh và nòng nọc ếch không có bất kỳ biểu hiện khác thường nào được ghi nhận khi so sánh giữa lô gây nhiễm ngâm WSSV và lô đối chứng (không ngâm WSSV). Phân tích WSSV bằng cách phát hiện mRNA của WSSV trong mẫu phân tích đều cho kết quả âm tính lần lượt tương ứng ở ngày sau khi gây nhiễm 1, 5, 9, 15, 20, 25, và 30.



Hình 4.11. Động vật thủy sinh chủ yếu được gây nhiễm bằng phương pháp ngâm

***(A)** Cá Bống, **(B)** nòng nọc ếch, **(C)** ốc đinh và **(D)** tôm gai*

Nòng nọc ếch, cá bống và ốc đinh xuất hiện phổ biến trong vùng nuôi, thậm chí ốc đinh và cá bống xuất hiện số lượng nhiều trong ao nuôi tôm thâm canh, đặc biệt nhiều ở vào cuối vụ nuôi, song đều cho kết quả âm tính với WSSV bằng phân tích PCR trong điều kiện thu mẫu ở tự nhiên (Bảng 4.14). Chúng được lựa chọn thử nghiệm gây nhiễm cho sống trong môi trường nước chứa WSSV (30 ngày), nhưng kết quả cho thấy WSSV không nhân lên trong vật chủ nòng nọc ếch, cá bống và ốc đinh (Bảng 4.18). Đến nay, trên thế giới chưa có công bố nào chỉ ra khả năng mang WSSV của 3 loài nêu trên. Trên thực tế, các chương trình khuyến ngư đang khuyến khích người dân nên thả nuôi cá rô phi trong ao lắng, chúng là yếu tố cải thiện tốt môi trường nước cho tôm nuôi. Kết quả này mở ra hướng mới, an toàn cho các hộ nuôi khi nuôi ghép cá bống và tôm hoặc áp dụng mô hình nuôi luân canh 1 vụ cá bống 1 vụ tôm. Hình thức nuôi ghép cá bống tôm hay nuôi luân canh có hiệu quả trong việc giảm thiểu bệnh do WSSV ở tôm nuôi, nâng cao năng suất vật nuôi. Đồng thời sự xuất hiện ốc đinh và nòng nọc ếch ở

vùng nuôi tôm không phải là yếu tố nguy cơ gây TCT nhiễm bệnh do WSSV trong suốt vụ nuôi.

4.3 KHẢ NĂNG LAN TRUYỀN WSSV TỪ ĐỘNG VẬT THỦY SINH SANG TÔM THẺ CHÂN TRẮNG TRONG CÙNG MÔI TRƯỜNG NUÔI

4.3.1 Khả năng lây truyền WSSV từ cáy đỏ sang tôm chân trắng

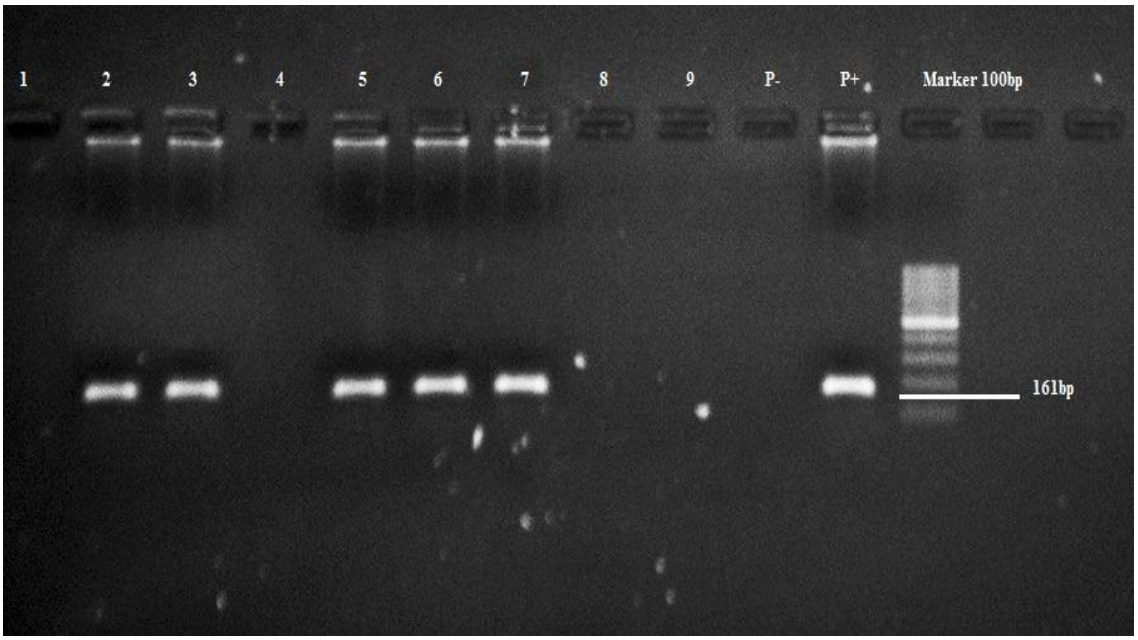
Đánh giá khả năng lan truyền WSSV từ cáy đỏ sang tôm chân trắng trong cùng môi trường nuôi nhốt được triển khai như sau: kế thừa kết quả nghiên cứu ở Mục 4.2.4 xác định thời gian virus đã nhân lên trong tế bào vật chủ cáy đỏ, là thời điểm thả tôm chân trắng vào nuôi cùng với cáy đỏ. Kết quả phân tích bằng cách phát hiện mRNA thông qua tổng hợp cDNA của WSSV trong mẫu tôm chân trắng cho thấy: sau 175h (tức sau 68h nuôi chung) tôm chưa nhiễm WSSV, nhưng sang đến 190 giờ (sau 83 giờ kể từ khi cáy đỏ nhiễm WSSV) một số mẫu tôm đã có kết quả dương tính với WSSV và tỷ lệ số mẫu dương tính tăng dần theo thời gian (Bảng 4.19 và Hình 4.12). Kết thúc thí nghiệm tỷ lệ tích lũy tôm nhiễm WSSV là 81,8%, trong khi đó lô đối chứng cho kết qủa âm tính với WSSV ở cả cáy và tôm (Bảng 4.19).

Một số tôm có biểu hiện bệnh lý khá điển hình của bệnh đốm trắng như ăn ít, đốm trắng nhỏ xuất hiện ở vỏ đầu ngực (Lo and Kou, 1998; Torlakovic *et al.*, 2012) đã xuất hiện sau 251h (tương ứng với 6 ngày) nuôi chung tôm thẻ với cáy đỏ (*U. arcuata*) mang WSSV (Hình 4.13B), trong khi đó cáy đỏ không có biểu hiện bất thường nào, dấu hiệu nhận được mô tả tương tự như thí nghiệm thực hiện ở nội dung 4.2.4. Như vậy, WSSV đã lan truyền từ *U. arcuata* sang tôm nuôi thông qua môi trường nước với hình thức nuôi chung tôm không nhiễm bệnh với cáy đỏ nhiễm virus đốm trắng, đây là hình thức lan truyền bệnh theo phương thức truyền ngang (Kanchanaphum *et al.*, 1998).

Bảng 4.19. Kết quả phân tích WSSV ở cáy đỏ và tôm thẻ trong thí nghiệm xác định khả năng lan truyền WSSV

Thí nghiệm	Loài ĐV	Số mẫu phân tích	Tỷ lệ (%) mẫu nhiễm WSSV theo thời gian (giờ)						Tỷ lệ nhiễm tích lũy (%)
			175	190	215	251	275	299	
Gây nhiễm	Tôm	33	0	66,7	83,3	100	100	100	81,8
	Cáy đỏ	33	100	100	100	100	100	100	100
Đối chứng	Tôm	11	0	0	0	0	0	#	0
	Cáy đỏ	11	0	0	0	0	0	#	0

Ghi chú: (#) không thu mẫu phân tích



Hình 4.12. WSSV đã được xác định ở các mẫu sau khi tôm được nuôi chung trong cùng môi trường nước với cáy đỏ mang WSSV theo thời gian

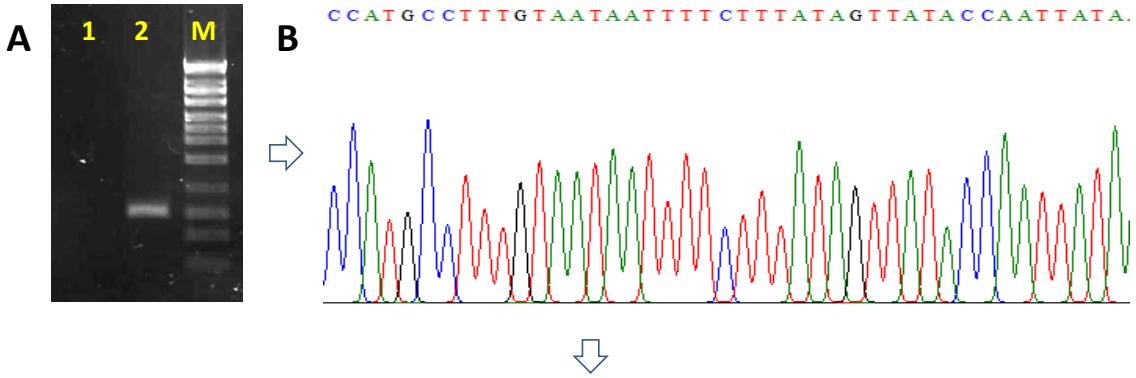
1,2,3 cáy đỏ lấy nhiễm lần lượt sau 72, 107 và 175h, 4 tôm sau 175h nuôi chung cáy đỏ, 5,6, và 7 lần lượt là tôm, nước và cặn bể sau 190h ở lô gây nhiễm, 8,9 và 10 lần lượt là mẫu tôm, nước và cặn bể ở lô đối chứng, 11 đối chứng dương và 12: Marker 100bp,

Hình 4.13. Bố trí thí nghiệm xác định khả năng lan truyền WSSV từ cáy đỏ sang tôm thẻ trong cùng môi trường.

(A) bố trí thí nghiệm, (B) biểu hiện bệnh lý điển hình của tôm thẻ (mũi tên) sau 6 ngày nuôi cùng cáy đỏ mang WSSV

Trong số loài thuộc cáy (Uca) nói riêng đến nay trên thế giới đã xác định được duy nhất 1 loài có tên *Uca pugilator* nhiễm WSSV trong điều kiện thí nghiệm gây nhiễm ở Thái Lan (Kanchanaphum *et al.,* 1998). *Uca pugilator* nhiễm WSSV song không có biểu hiện bệnh lý bất thường nào được ghi nhận, chúng phát triển bình thường (Kanchanaphum *et al.,* 1998). Cũng theo Kanchanaphum *et al.,* (1998) cáy *Uca pugilator* có khả năng lan truyền WSSV sang tôm thẻ nuôi sau 24 giờ trong cùng điều kiện môi trường nuôi. Trong thí nghiệm tác giả đã sử dụng kỹ thuật PCR và lai in situ (in situ hybridization) phân tích mẫu *Uca pugilator* và TCT. Như vậy, có thể thấy *Uca arcuata* trong nghiên cứu này có kết quả tương đồng với loài *Uca pugilator* ở Thái Lan, ngoại trừ kết quả virus lan truyền từ cáy (*Uca pugilator)* sang tôm thẻ nhanh chỉ sau 24 giờ, trong khi đó *U. arcuata* cần đến 83 giờ WSSV mới nhiễm lên trong tế bào tôm thẻ. Xét về loài cua nói chung, đến nay trên thế giới đã xác định có 57 loài mang virus đốm trắng (Trương Thị Mỹ Hạnh và cs., 2016), tuy nhiên phần số lớn trong

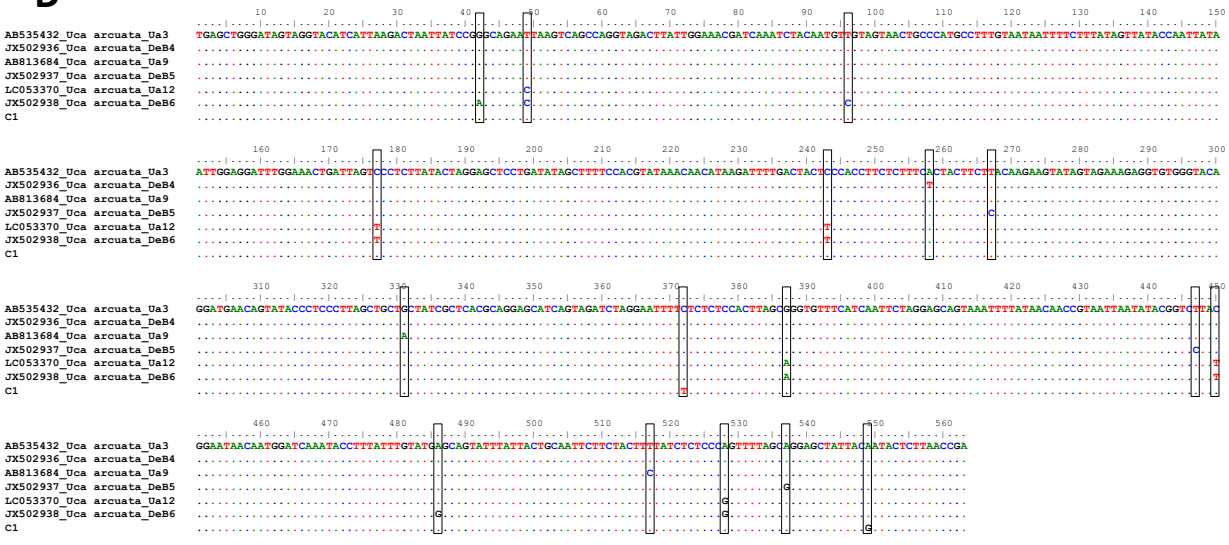
số chúng không bị ảnh hưởng do virus đốm trắng gây ra, chúng được xem là vec tơ/vật chủ trung gian lan truyền bệnh.



C

Description	Query cover	E value	Ident	Accession
Uca arcuata mitochondrial COI gene for cytochrome oxidase subunit I, partial cds, isolate: Ua3	100%	0.0	99%	AB535432.1
Uca arcuata isolate DeB4 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	100%	0.0	99%	JX502936.1
Uca arcuata mitochondrial gene for cytochrome oxidase subunit I, partial cds, isolate: Ua9	100%	0.0	99%	AB813684.1
Uca arcuata isolate DeB5 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	100%	0.0	99%	JX502937.1
Uca arcuata mitochondrial COI gene for cytochrome oxidase subunit I, partial cds, isolate: Ua12	100%	0.0	99%	LC053370.1
Uca arcuata isolate DeB6 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	100%	0.0	98%	JX502938.1

D



Hình 4.14. Kết quả định danh cáy đỏ bằng sinh học phân tử

(A) *Sản phẩm PCR của mẫu cáy đỏ chạy với cặp mồi COI: ADN của cáy đỏ được khuếch đại bởi mồi COI (giếng 2), 200 bp DNA marker (giếng M).* ***(B)*** *Giản đồ giải trình tự gen COI của mẫu cáy đỏ.* ***(C)*** *Kết quả BLAST trình tự COI của cáy đỏ.* ***(D)*** *So sánh trình tự gen của cáy đỏ (C1) với các trình tự tham chiếu; các vị trí có sai khác nucleotide được đóng khung.*

Kết quả nghiên cứu của luận án đã chỉ ra *U. arcuata* là động vật có khả năng mang và lan truyền WSSV cho tôm nuôi. Đây là kết quả bổ sung thêm vào danh sách loài mang WSSV trên thế giới, đồng thời là kết quả xác nhận loài cáy đầu tiên ở Việt Nam mang và lan truyền virus cho tôm nuôi. Kết quả là cơ sở cho nghiên cứu tiếp theo đưa ra khuyến cáo, đề xuất giải pháp có hiệu quả ngăn ngừa/loại bỏ sự có mặt của các vật chủ mang mầm bệnh đốm trắng trong quá trình nuôi tôm nước lợ, loại bỏ mắt xích lan truyền bệnh đốm trắng, góp phần khống chế hiệu quả bệnh đốm trắng cho nghề nuôi tôm công nghiệp thì việc giám định loài bằng sinh học phân tử là hết sức quan trọng và cần thiết.

Khuyếch đại ADN của cáy đỏ với cặp mồi COI sản phẩm ADN hiện rõ với độ dài khoảng 700bp (Hình 4.14A). Ngoài ra, khi sử dụng cặp mồi 16Sar/16Sbr khuếch đại gen 16S rRNA (Shih *et al.*, 2009) cũng cho sản phẩm PCR đặc hiệu 540bp (kết quả không trình bày).

Sản phẩm PCR đặc hiệu sau khi tinh sạch được giải trình tự và thu được các đỉnh tín hiệu rõ ràng (Hình 4.14B). Kết quả BLAST tìm kiếm các trình tự tương đồng có trong Genbank cho thấy mẫu cáy đỏ có tương đồng rất cao với loài *Uca arcuata* với độ tương đồng 99% (Hình 4.14C). So sánh trình tự nucleotide (Hình 4.14D) cho biết cáy đỏ tương đồng rất cao 6 mẫu *Uca arcuata*, với 17 đột biến điểm. Như vậy kết quả định danh theo hình thái học hoàn toàn trùng khớp với kết quả định danh bằng sinh học phân tử với cặp mồi COI. Kết quả định danh này hoàn toàn trùng hợp với nghiên cứu của nhóm tác giả Shih *et al.*, (2009).

4.3.2 Khả năng lan truyền WSSV từ tôm càng sang tôm chân trắng

Sau khi xác định tôm càng nhiễm WSSV trong điều kiện tự nhiên (Bảng 4.14, Bảng 4.15 và Hình 4.6). Kết quả đó chưa xác định được virus từ tôm càng truyền sang tôm chân trắng hay ngược lại, điều đó có nghĩa không khẳng định được tôm càng là véc tơ lan truyền WSSV sang tôm thẻ. Một thử nghiệm đã được thực hiện bởi Sánchez-Paz, (2010) khi cho chim mòng biển và gà ăn thức ăn chứa WSSV, YHV, TSV, IHHNV, bằng kỹ thuật PCR/RT-PCR trong ruột và

phân của mong biển và gà đã phân tích được virus, song sử dụng virus thu từ mòng biển và gà gây nhiễm lên tôm thi kết quả cho thấy chỉ 2 loại virus IHHNV và TSV có độc lực gây bệnh cho tôm, trong khi đó WSSV và YHV không có khả năng gây bệnh cho tôm nuôi (Sánchez-Paz, 2010). Vì vậy không loại trừ khả năng tôm càng nhiễm WSSV nhưng virus không lan truyền sang tôm thẻ nuôi. Do do, nghiên cứu đã triển khai bố trí thí nghiệm nhằm xác định tôm càng có phải là véc tơ lan truyền bệnh đốm trắng cho tôm thẻ nuôi không.

Kết quả cho thấy rõ ràng đã có sự lây nhiễm WSSV từ tôm càng sang tôm thẻ nuôi ở ngày thứ 5 sau khi gây nhiễm với tỷ lệ 25 % mẫu nhiễm, trong khi đó mẫu tôm càng có tỷ lệ nhiễm WSSV là 100% (Bảng 4.20) . Số mẫu tôm thẻ nhiễm WSSV tăng dần tỷ lệ thuận theo thời gian thí nghiệm từ ngày thứ 5, 10, 15, đến ngày thứ 20, 25 lần lượt có tỷ lệ mẫu dương tính với WSSV tương ứng từ 25; 66,7; 83,3 đến 100% (Bảng 4.20). Trong khi đó, lô đối chứng các mẫu phân tích tiếp tục có kết quả âm tính đối với WSSV ở cả tôm thẻ và tôm càng (Bảng 4.20).

Bảng 4.20. Kết quả phân tích WSSV ở tôm càng và tôm thẻ trong thí nghiệm xác định khả năng lan truyền WSSV

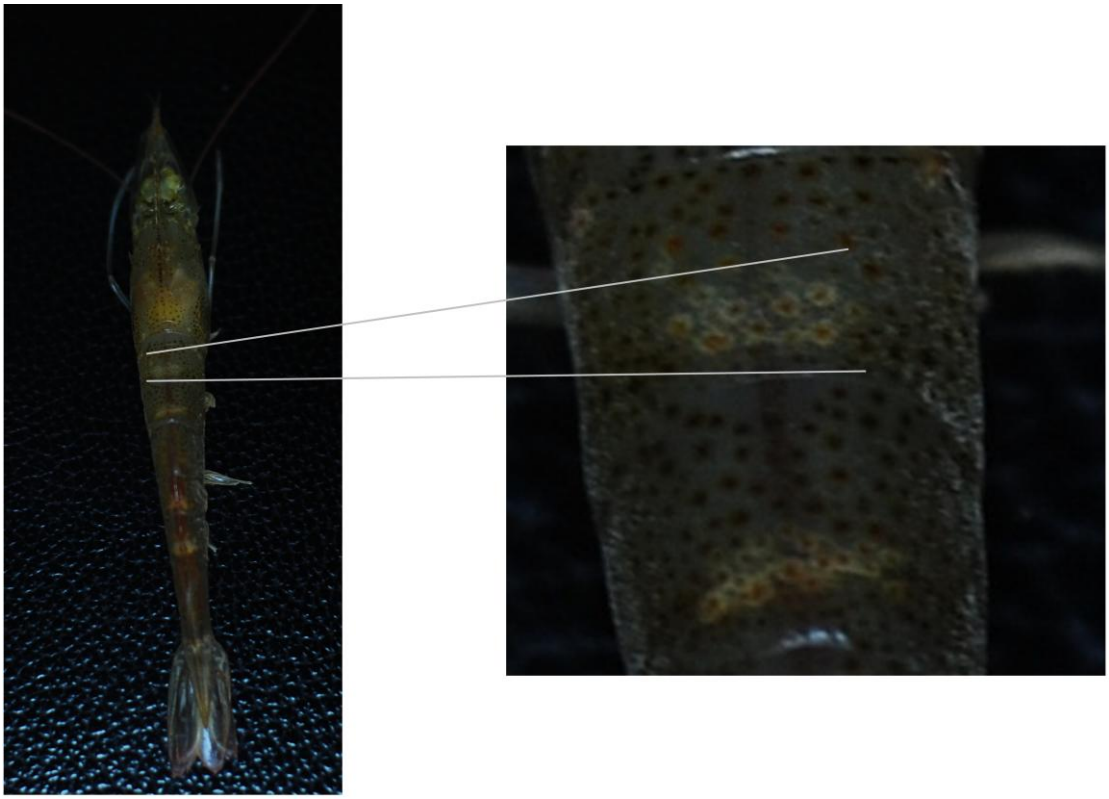
Thời gian (ngày[1])	Tỷ lệ mẫu dương tính WSSV (%)			
	Lô cảm nhiễm WSSV		Lô đối chứng	
	Tôm càng (n=33)	Tôm thẻ (n=33)	Tôm càng (n=22)	Tôm thẻ (n=22)
5	100	25	0	0
10	100	66,7	0	0
15	100	83,3	0	0
20	100	100	0	0
25	100	100	0	0
Tỷ lệ nhiễm tích lũy (%)	100	75,0	0	0

Ghi chú: [1] thời gian thu mẫu sau khi cảm nhiễm



Hình 4.15. Bố trí thí nghiệm xác định khả năng lan truyền WSSV từ tôm càng sang tôm chân trắng trong cùng môi trường.

A: Dãy thí nghiệm ngâm tôm càng trong môi trường nuôi chứa virus trong 120 giờ, B: Hình thái của tôm càng khi gây nhiễm



Hình 4.16. Biểu hiện bệnh lý của tôm thẻ nhiễm bệnh đốm trắng từ tôm càng

Xuất hiện các đốm trắng trên cơ thể tôm

Ngoài việc thu mẫu phân tích xác định tỷ lệ mẫu dương tính với WSSV, chúng tôi cũng đã ghi nhận biểu hiện bệnh lý của động vật thí nghiệm. Kết quả

cho thấy: biểu hiện bệnh lý của tôm càng không có sự khác biệt giữa lô thí nghiệm gây nhiễm và lô đối chứng, tôm càng khỏe, phản xạ nhanh, ruột chứa đầy thức ăn, dấu hiệu ghi nhận được tương tự như tôm càng thu được ở trong ao nuôi tôm (trong điều kiện tự nhiên), trong khi đó tôm chân trắng có hiểu hiện yếu, bỏ ăn, bơi lờ đờ sát thành bể. Biểu hiện bệnh lý của tôm chân trắng hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu đã công bố trước đây (Crockford, 2008; Lightner, 1996). Trong khi đó, tôm càng trong lô thí nghiệm không có biểu hiện bất thường dù có kết quả dương tính với WSSV, khác với *M. rosenbergii* thuộc giống Macrobrachium dù không chết khi nhiễm WSSV nhưng chúng có biểu hiện yếu, bơi lờ đờ ở ngày thứ 3 sau khi gây nhiễm, tuy nhiên chúng có khả năng hồi phục tốt và nhanh ở những ngày tiếp theo của thí nghiệm (Sarathi *et al.,* 2008).

Theo kết quả nghiên cứu của Zhao *et al.,* (2017) cho thấy: mang của *M. nipponense* nhiễm WSSV sau 48-96 giờ gây nhiễm bằng hình thức ngâm, nhưng không có bất kỳ tổn thương nào được ghi nhận về biến đổi mô học ở tôm nhiễm WSSV, tôm hoạt động bình thường. Nhóm tác giả nhận định đây là loài có khả năng kháng lại WSSV (Zhao *et al.,* 2017).

Số mẫu tôm càng thu được trong ao nuôi tôm nhiễm WSSV nêu trên có kích cỡ khác nhau, từ giai đoạn trưởng thành đến thành thục (ôm trứng), sau 5-6 tháng loài tôm này đã thành thục và sinh sản, vì vậy nếu một mẫu tôm càng ôm trứng nhiễm WSSV xuất hiện trong ao nuôi sẽ có khả năng lan truyền bệnh sang tôm nuôi nhanh và phát tán rộng. Kết quả nghiên cứu đạt được ở đây có ý nghĩa quan trọng trong việc giúp người nuôi nhận biết và kiểm soát tôm càng tốt, ngăn chặn mầm bệnh sinh học có khả năng lan truyền bệnh do WSSV lên tôm nuôi.

Tôm càng là loài tôm sống được trong điều kiện môi trường có biên độ dao động lớn độ mặn (từ nước ngọt đến nước lợ), đồng thời là loài phổ biến có tính thương mại và giá trị kinh tế tại Trung Quốc và Nhật Bản (New, 2005). Ở Việt Nam, loài tôm này đã được xác định có giá trị, tuy nhiên số lượng ít không đáp ứng đủ nhu cầu, do đó năm 2003 đã có nghiên cứu thử nghiệm nhằm tối ưu

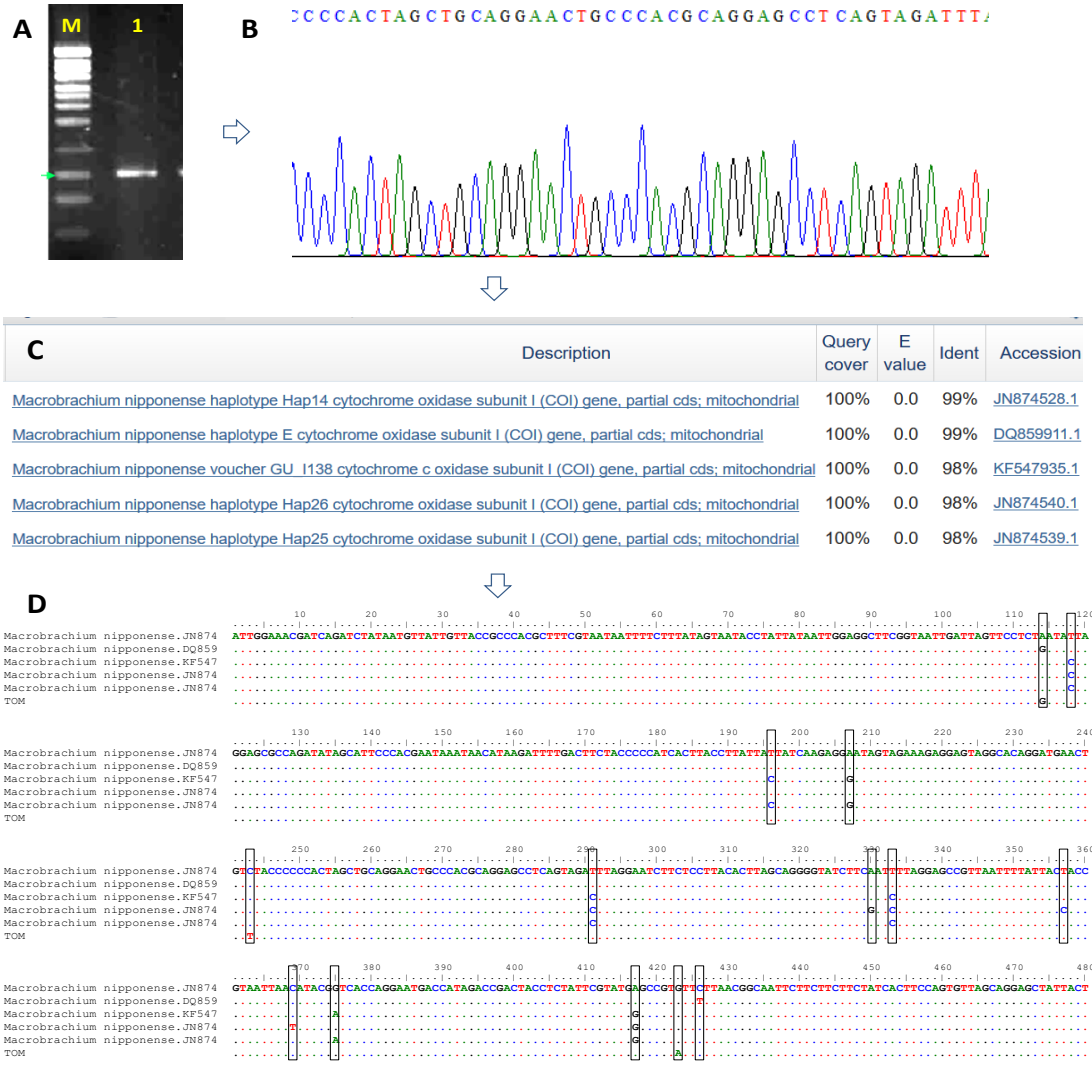
hóa điều kiện ương nuôi và sinh sản trong điều kiện nước ngọt để có thể cho sản lượng cao đáp ứng đủ nhu cầu thị trường (An *et al.*, 2003). Hơn nữa, kết quả nghiên cứu đã xác định được *M. nipponense* không có biểu hiện bất thường, cơ thể sáng màu và phản xạ nhanh mặc dù WSSV đã nhân lên trong tế bào vật chủ, qua đây có thể nhận định *M. nipponense* có khả năng đáp ứng miễn dịch tự nhiên tốt đối với tác nhân gây bệnh do WSSV, đây sẽ là đặc tính có lợi thế của loài để phát triển nuôi thương mại đối với đối tượng *M.nipponense.* Kết quả nghiên cứu xác định *M. nipponense* nhiễm WSSV trong điều kiện tự nhiên và có khả năng lan truyền WSSV tôm thẻ nuôi là nghiên cứu đầu tiên được công bố ở Việt Nam. Đối với tôm thuộc giống Macrobrachium, hiện nay đã xác định được 3 loài bao gồm *M. idella, M. lamerrae, M. rosenbergii* có khả năng mang và lan truyền WSSV cho tôm nuôi (Đặng Thị Hoàng Oanh và cs., 2012; Sahul Hameed *et al.*, 2000), trong đó *M. rosenbergii* được xác định có khả năng đáp miễn dịch tốt với WSSV (Sarathi *et al.*, 2008).

Như vậy, với kết quả trình bày trên cho thấy tôm càng là động vật có khả năng mang và lan truyền bệnh đốm trắng cho tôm nuôi. Bằng mô tả hình thái học tôm càng được nhận diện là *Macrobranchium nipponense.* Tuy nhiên, để cảnh báo cho người nuôi nhận dạng loài tôm càng và loại bỏ sự có mặt của chúng trong quá trình nuôi TCT cũng như tôm sú, thì việc giám định lại tên loài bằng phương pháp có độ tin cậy cao là cần thiết. Vì vậy chúng tôi ứng dụng phương pháp sinh học phân tử để giám định lại loài *M. nipponense.*

Mẫu tôm càng được khuyếch đại ADN với cặp mồi COI, kết quả điện di cho thấy hình ảnh sản phẩm có độ dài tương ứng khoảng 600bp (Hình 4.17A). Sản phẩm PCR đặc hiệu sau khi tinh sạch được giải trình tự và thu được các đỉnh tín hiệu rõ ràng (Hình 4.17B). Kết quả BLAST tìm kiếm các trình tự tương đồng có trên ngân hàng Genbank cho thấy mẫu tôm gai có tương đồng rất cao với loài *Macrobranchium nipponense* với độ tương đồng 98-99% (Hình 4.17C). Ở độ tượng đồng 99% với 2 mẫu *Macrobranchium nipponense* và độ tương đồng 98% với 2 mẫu cùng xác định có 7 đột biến điểm (Hình 4.17D). Như vậy kết quả định

danh theo hình thái học hoàn toàn trùng khớp với kết quả định danh bằng sinh học phân tử với cặp mồi COI.

Kết quả phân tích trùng hợp với nghiên cứu trước đây khi sử dụng cặp mồi COI để định danh phân loại *M.nipponense* (Liu *et al.*, 2007b), ngoài ra có thể sử dụng cặp mồi 16S [16S-F-Car (5'-TGC CTG TTT ATC AAA AAC ATG TC-3') và 16S-R-Car (5'-AGA TAG AAA CCA ACC TGG CTC-3')] cũng cho kết quả tương tự (Salman *et al.*, 2006)



Hình 4.17. Kết quả định danh tôm càng bằng sinh học phân tử

(A) *Sản phẩm PCR của mẫu tôm càng chạy với cặp mồi COI: ADN của tôm càng được khuyếch đại bởi mồi COI (giếng 1), 200 bp DNA marker (giếng M).* ***(B)*** *Giản đồ giải trình tự gen COI của mẫu tôm càng.* ***(C)*** *Kết quả BLAST trình tự COI của tôm càng.* ***(D)*** *So sánh trình tự gen của tôm càng (C1) với các trình tự tham chiếu; các vị trí có sai khác nucleotide được đóng khung*

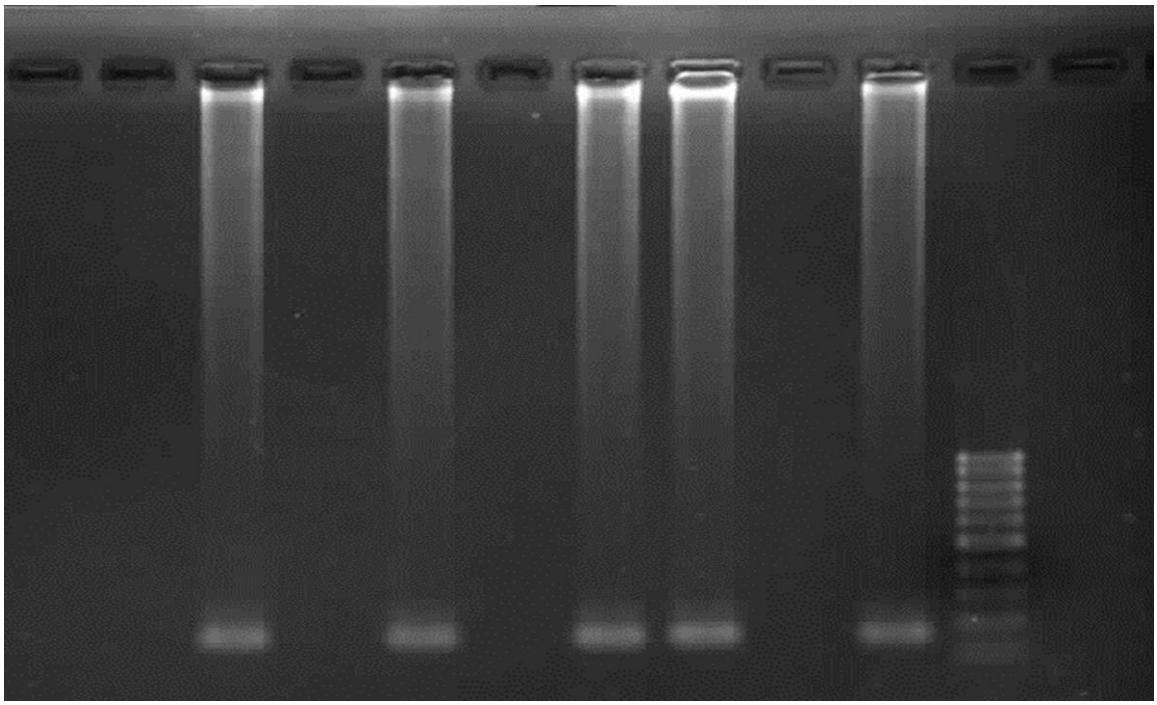
4.3.3 Khả năng lan truyền WSSV từ tôm gai sang tôm chân trắng

Thí nghiệm được bố trí nhằm xác định khả năng lan truyền WSSV từ tôm gai sang tôm thẻ khi chúng được nuôi nhốt trong cùng một môi trường nước. Sau 5 ngày gây nhiễm tôm gai có kết quả dương tính với virus đốm trắng 100% trong khi đó tôm chân trắng đạt 41,7% , tỷ lệ này tăng dần theo thời gian ở các ngày thí nghiệm tiếp theo đạt 91,7% (ngày thứ 10) và 100% từ ngày thứ 15 trở về sau. Tuy nhiên, thí nghiệm chỉ kéo dài đến ngày thứ 22 do tôm chân trắng chết hết. Biểu hiện bệnh lý của tôm thẻ nhiễm bệnh được ghi nhận bao gồm yếu, bơi lờ đờ bỏ ăn và chết, biểu hiện bệnh lý trùng hợp với mô tả tôm nhiễm WSSV của Crockford, (2008). Trong khi đó, lô đối chứng cho kết quả phân tích âm tính với WSSV ở cả tôm thẻ và tôm càng (Bảng 4.21, Hình 4.18).

Bảng 4.21. Kết quả phân tích WSSV ở tôm gai và tôm thẻ trong thí nghiệm xác định khả năng lan truyền WSSV

Thời gian (ngày[1])	Tỷ lệ mẫu dương tính WSSV (%)			
	Lô cảm nhiễm WSSVV		Lô đối chứng	
	Tôm gai n=33)	Tôm thẻ (n=33)	Tôm gai (n=22)	Tôm thẻ (n=22)
5	100	41,7	0	0
10	100	91,7	0	0
15	100	100	0	0
20	100	100	0	0
22	100	100	0	0
Tỷ lệ nhiễm tích lũy (%)	100	86,6	0	0

Ghi chú: [1] thời gian thu mẫu sau khi cảm nhiễm



Hình 4.18. WSSV đã được xác định ở các mẫu sau khi tôm được nuôi chung trong cùng môi trường nước với tôm gai mang WSSV theo thời gian

Giếng số 1, 2: tôm thẻ ở ngày thứ 1 và 3, giếng 3, 5, 7 và 8: tôm thẻ lô thí nghiệm ở ngày thứ 5, 10, 15 và 20, giếng 4 và 6: tôm thẻ ở lô đối chứng ngày thứ 10, 15, P^-: đối chứng âm, P^+: đối chứng dương, Marker 100bp

Tôm gai (*E. carinicauda)* thu được ở nguồn cấp và ao nuôi (ao tôm khỏe) đều có kết quả âm tính với WSSVV (Bảng 4.14), vì vậy tôm gai được lựa chọn thử nghiệm gây nhiễm. Kết quả gây nhiễm cho thấy, tỷ lệ tích lũy tôm gai nhiễm WSSVV là 100% sau 22 ngày theo dõi thí nghiệm, trong khi đó tôm thẻ nuôi chung có tỷ lệ nhiễm WSSV là 86,6%, bên cạnh đó lô đối chứng cả tôm gai và tôm thẻ đều cho kết quả âm tính với WSSV từ ngày đầu thí nghiệm đến khi kết thúc thí nghiệm (Bảng 4.21). Trong suốt quá trình thí nghiệm tôm gai không có biểu hiện bất thường, chúng vẫn bắt mồi, hoạt động bình thường dù có kết quả dương tính với virus đốm trắng từ ngày thứ 5 của thí nghiệm (Bảng 4.21). Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam chỉ ra tôm gai, loài giáp xác mang và lan truyền WSSV sang tôm thẻ nuôi hay nói khác tôm gai là véc tơ lan truyền bệnh tác nhân WSSV lên tôm thẻ nuôi trong cùng môi trường nuôi nhốt. Kết quả nghiên cứu này hoàn toàn trùng hợp với nghiên cứu trước đây khi chỉ ra *E. carinicauda*

nhiễm WSSV trong cả điều kiện tự nhiên và thí nghiệm (Lei *et al.*, 2002; OIE 2016). Hơn nữa, kết quả nghiên cứu của Duan *et al.*, (2015, 2014) và Wang *et al.*, (2013) đã chỉ ra WSSV không ảnh hưởng đến loài tôm *E. carinicauda*. Nguyên nhân được xác định WSSV không ảnh hưởng đến tôm gai do bởi 1 loài protein có tên EcCRT cư trú trong mang, gan tụy, cơ, buồng trứng, ruột, dạ dày và mắt, đặc biệt với mức biểu hiện cao nhất trong hemocytes và trong buồng trứng. EcCRT đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa ion Ca^{2+} trong cơ thể, phân tử ion này có vai trò trong việc đáp ứng miễn dịch tự nhiên với một số tác nhân virus, trong đó có WSSV. Nghiên cứu được thực hiện chỉ ra sau 6h mầm bệnh do WSSV nhiễm lên tôm *E. carinicauda* thì mức độ/hàm lượng biểu hiện của bản sao EcCRT cả ở bạch cầu và gan tụy *E. carinicauda* đạt ở mức cao (Duan *et al.*, 2014, 2015; Wang *et al.*, 2013). Đây là đặc điểm lợi thế của loài *E. carinicauda*, do đó chúng được nghiên cứu nuôi phổ biến, có sản lượng thương mại ở Trung Quốc (Liang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015).

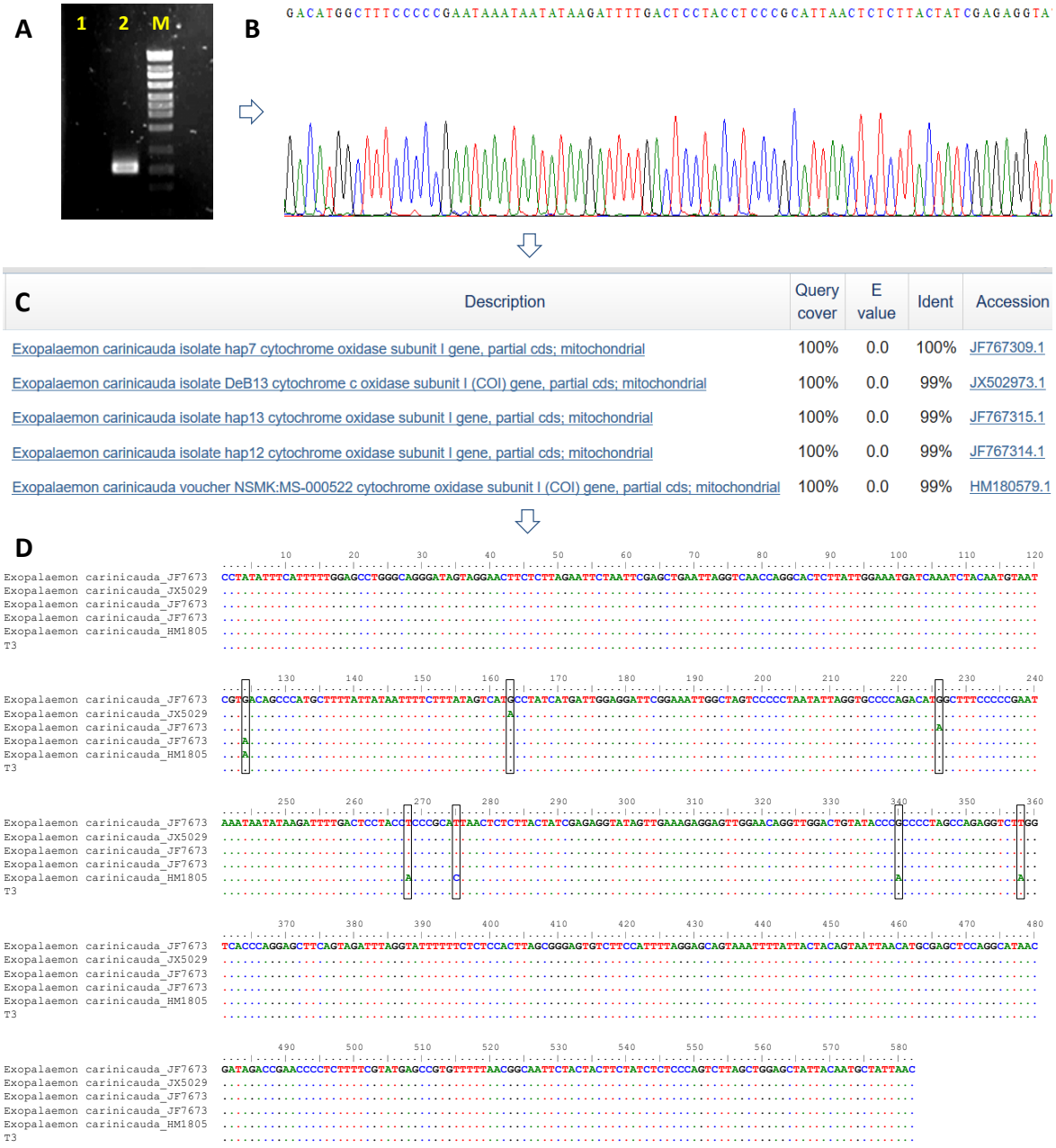
Tôm gai *E. carinicauda* là loài tôm thích nghi được trong điều kiện môi trường có biên độ giao động nhiệt độ và độ mặn lớn tương ứng từ 2-30‰ và 16-34^0C, thời gian đạt đến cỡ thành thục ngắn (40-55 ngày), đặc biệt *E. carinicauda* có đáp ứng miễn dịch với bệnh virus đốm trắng *V. anguillarum*, chính vì vậy loài tôm này được đưa vào nuôi mang tính sản phẩm thương mại khá phát triển tại Trung Quốc (Liang *et al.*, 2014; C. Zhang *et al.*, 2015). Ở Việt Nam loài tôm này chưa được nghiên cứu nuôi thương mại, không giống như loài tôm càng (*M. nipponense)* đã được nghiên cứu nuôi ở môi trường nước ngọt với sản phẩm thương mại, tuy nhiên chúng có đặc điểm chung là xuất hiện rải rác ở vùng nước lợ, kênh cấp nước vào vùng nuôi tôm. Trong quá trình nuôi tôm, đặc biệt nuôi thâm canh việc xuất hiện loài tôm khác ngoài tôm thẻ nuôi là điều tất cả các hộ nuôi không mong muốn do chúng cạnh tranh thức ăn của tôm nuôi, là mối nguy lan truyền bệnh do virus, vi khuẩn. Loài tôm gai xuất hiện trong ao nuôi thường do sơ suất không sử dụng lưới lọc trong quá trình lấy nước vào ao nuôi, do đó trứng và tôm gai con theo đó vào ao, hoặc trước khi nuôi vụ mới hộ nuôi chưa thực hiện nghiêm túc việc cải tạo ao nuôi (nền đáy, bờ bao quanh ao). Một số đặc

điểm cơ bản hình thái học của *E. carinicauda* cần được mô tả và thông tin rộng rãi đến người nuôi/hộ nuôi là cần thiết, là cơ sở để giúp hộ nuôi nhận biết quản lý hạn chế sự xuất hiện của chúng trong ao nuôi.

Tương tự như cáy đỏ và tôm càng thì tôm gai được giám định loài bằng phương pháp sinh học phân tử sau khi xác định là loài có khả năng mang và lan truyền WSSV sang tôm thẻ nuôi cùng môi trường nước.

Mẫu tôm gai được khuyếch đại ADN với cặp mồi COI, kết quả điện di cho thấy hình ảnh sản phẩm có độ dài tương ứng khoảng 700bp (Hình 4.19A). Sản phẩm PCR đặc hiệu sau khi tinh sạch được giải trình tự và thu được các đỉnh tín hiệu rõ ràng (Hình 4.19B). Kết quả BLAST tìm kiếm các trình tự tương đồng có trên ngân hàng Genbank cho thấy mẫu tôm gai có tương đồng rất cao với loài *Exopalaemon carinicauda* với độ tương đồng 99-100% (Hình 4.19C). Ở độ tượng đồng 99% với 4 mẫu *Exopalaemon carinicauda* xác định có 7 đột biến điểm (Hình 4.19D). Như vậy kết quả định danh theo hình thái học hoàn toàn trùng khớp với kết quả định danh bằng sinh học phân tử với cặp mồi COI.

Kết quả nghiên cứu trùng khớp với nghiên cứu của nhóm tác giả Zhang *et al.,* (2015), ngoài ra nhóm tác giả chỉ ra có thể sử dụng cặp mồi ITS1 [5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3' (ITSF1) và 5'-AGCGAT CCACCATTAGAAGT-3' (ITSR2)] cũng cho kết quả tương tự trong nghiên cứu định danh loài E. carinicauda (Zhang *et al.,* 2015). Ngoài 2 cặp mồi nêu trên (COI và ITS1) được sử dụng rộng rãi, thì có thể sử dụng cặp mồi jgHCO2198 và jgLCO1490 của nhóm tác giả Geller *et al.,* (2013), cặp mồi này cho phép định danh loài trong phạm vi rộng (các loài thuộc động vật không xương sống trong đó có giáp xác), cặp mồi này cơ bản dựa trên cặp mồi COI của Folmer *et al.,* (1994), ngoại trừ đã thay thế các vị trí bị thoái hóa bằng các nucleotides inosine và chỉnh sửa và bổ sung bốn nucleotide tự nhiên để đạt được kết quả phân tích trong phạm vi rộng các loài động vật thuỷ sinh không xương sống nói chung và nhóm tôm nói riêng (Geller *et al.,* 2013).



Hình 4.19. Kết quả định danh tôm gai bằng sinh học phân tử

(A) *Sản phẩm PCR của mẫu tôm gai chạy với cặp mồi COI: ADN của tôm gai được khuyếch đại bởi mồi COI (giếng 2), 500 bp DNA marker (giếng M).* ***(B)*** *Giản đồ giải trình tự gen COI của mẫu tôm gai.* ***(C)*** *Kết quả BLAST trình tự COI của tôm gai.* ***(D)*** *So sánh trình tự gen của tôm gai (C1) với các trình tự tham chiếu; các vị trí có sai khác nucleotide được đóng khung*

PHẦN 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

5.1. KẾT LUẬN

1) Điều tra hiện trạng vùng nuôi, đánh giá mối nguy liên quan đến tôm nuôi bị bệnh đốm trắng tại 3 tỉnh Quảng Ninh, Nghệ An và Nam Định.

- Đã thu mẫu và thống kê xác định 23 loài động vật thủy sinh xuất hiện vùng nuôi tôm tại Nghệ An, Quảng Ninh và Nam Định. Trong đó 16 loài xuất hiện với tần suất cao bao gồm; tôm rảo, tôm càng, tôm gai, cáy đỏ, nòng nọc ếch, ốc đinh, cá bống và 9 loài động vật phù du.

- Có 8 yếu tố được xác định là mối nguy liên quan đến dịch bệnh đốm trắng ở tôm tại các tỉnh Nghệ An, Nam Định và Quảng Ninh bao gồm lấy nước vào ao không qua hệ thống ao lắng, không sử dụng lưới lọc khi lấy nước, thả giống với cỡ nhỏ hơn post 10, không giảm sốc khi thả tôm nuôi, bổ sung nước vào ao nuôi trong quá trình nuôi, ao nằm trong vùng nuôi có ao bệnh, không kiểm tra môi trường nước ao nuôi thường xuyên và xuất hiện giáp xác trong ao nuôi.

2) Nghiên cứu xác định động vật thủy sinh chủ yếu mang virus đốm trắng tại vùng nuôi tôm nước lợ ở Nghệ An, Nam Định và Quảng Ninh.

- Đã xác định được 3 loài động vật thủy sinh chủ yếu trong số 16 loài mang virus đốm trắng, trong đó tôm càng (*Macrobranchium nipponense*) mang virus đốm trắng thu được trong điều kiện tự nhiên, cáy đỏ *(Uca arcuata)* và tôm gai (*Exopalaemon carinicauda*) mang virus đốm trắng trong điều kiện thí nghiệm.

3) Nghiên cứu xác định khả năng lan truyền WSSV từ động vật thủy sinh sang tôm chân trắng trong cùng môi trường nuôi cho thấy:

- Tôm càng, cáy đỏ và tôm gai là những vector lây truyền và gây bệnh đốm trắng cho tôm chân trắng *L. vannamei*

- Nghiên cứu bổ sung 3 loài mới là tôm càng, tôm gai và cáy đỏ vào danh sách sinh vật mang và lan truyền mầm bệnh đốm trắng cho tôm nuôi ở Việt

Nam. Trong đó, bổ sung 1 loài mới là cáy đỏ vào danh sách loài sinh vật mang mầm bệnh đốm trắng cho tôm nuôi trên thế giới.

- Kết quả giám định loài cho thấy ADN của tôm càng, cáy đỏ và tôm gai có kết quả tương đồng 99-100% với các loài tương ứng trên ngân hàng gen. Kết quả phân lập định danh loài bằng hình thái học hoàn toàn trùng khớp với kết quả định danh bằng sinh học phân tử.

5.2. ĐỀ XUẤT

Với những kết quả đạt được của luận án cũng nhưng những hạn chế chưa thực hiện được trong nghiên cứu này, chúng tôi đưa ra một số đề xuất sau:

Tiếp tục nghiên cứu thu mẫu động vật thủy sinh phân tích theo phương pháp cắt dọc để xác định động vật mang virus trong điều kiện thu mẫu tự nhiên. Nghiên cứu thí nghiệm gây nhiễm xác định khả năng mang WSSV của nhóm động vật phù du xuất hiện chủ yếu ở vùng nghiên cứu.

Thông tin rộng rãi đến hộ nuôi về 3 loài mang và truyền virus đốm trắng cho tôm nuôi và một số đặc điểm cơ bản nhận dạng.

Xây dựng mô hình nuôi có can thiệp ngăn ngừa sự xâm nhập của các sinh vật mang và lây truyền bệnh đốm trắng nhằm giảm thiểu dịch bệnh đốm trắng cho tôm nuôi nước lợ ở các vùng nuôi Nghệ An, Quảng Ninh và Nam Định.

Tiếp tục nghiên cứu xác định khả năng mang mầm bệnh virus đốm trắng đối với 9 loài động vật phù du được xác định hiện diện phổ biến ở các vùng nuôi tôm tại Quảng Ninh, Nghệ An, Nam Định.

NHỮNG CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Trương Thị Mỹ Hạnh, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Đặng Thị Lụa, Lê Thị Mây và Phan Thị Vân (2016). Sinh vật mang virus gây bệnh đốm trắng trên tôm. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Kỳ 2, Tháng 5: 85-97.

2. Trương Thị Mỹ Hạnh, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Phạm Thế Việt và Phan Thị Vân (2017). Đánh giá khả năng lây nhiễm virus đốm trắng từ cáy đỏ (*Uca* sp.) sang tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Tạp chí Khoa học Nông Nghiệp Việt Nam, Tập 15, Số 2: 198-204

3. Trương Thị Mỹ Hạnh, Phan Trọng Bình, Phạm Thế Việt, Huỳnh Thị Mỹ Lệ và Phan Thị Vân (2017). Nghiên cứu sự nhiễm virus đốm trắng (WSSV) ở tôm càng (*Macrobrachium nipponense*) và khả năng lan truyền bệnh sang tôm thẻ (*Litopenaeus vannamei*). Tạp chí Khoa học Công Nghệ Việt Nam. Tập 19, Số 8: 33-38

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu Tiếng Việt

1. BioAqua (2014). Chọn tôm giống post / hậu ấu trùng ở kích cỡ nào? Bài đăng tải trên BioAqua ngày 19/9/2014 lúc 9h giờ 20. Truy cập tại: http://bioaqua.vn/chon-tom-giong-postlarvae-hau-au-trung-o-kich-co-nao/
2. Bùi Quang Tề (2006). Giáo trình Bệnh động vật Thủy sản. Nhà xuất bản Nông Nghiệp. tr. 1- 438.
3. Cục Thú y (2014). Công tác Thú Y năm 2014 và Kế hoạch công tác Thú Y năm 2015. Báo cáo chuyên đề. tr. 1–16.
4. Cục Thú y (2015). Công tác Thú Y năm 2015 và Kế hoạch công tác Thú Y năm 2016. Báo cáo chuyên đề. tr. 1-18.
5. Cục Thú y (2016). Công tác Thú Y năm 2016 và Kế hoạch công tác Thú Y năm 2017. Báo cáo chuyên đề. tr. 1–14.
6. Chu Văn Trí (2017). Tiềm năng và định hướng phát triển nghề nuôi tôm tại Quảng Ninh. Bài đăng tải ngày 25/5/2017 lúc 11giờ. Truy cập tại trang: http://www.quangninh.gov.vn/vi-VN/so/sonongnghiepptnt/Trang/Tin%20chi%20ti%E1%BA%BFt.aspx?newsid=1369&dt=2017-05-26&cid=3
7. Đặng Ngọc Thanh và Hồ Thanh Hải (2001a). Động vật chí Việt Nam. Tập 5. Nhà xuất bản Khoa học và kĩ thuật. tr. 1–239.
8. Đặng Ngọc Thanh và Hồ Thanh Hải (2001b). Động vật chí Việt Nam . Tập 1. Nhà xuất bản Khoa học và kĩ thuật. tr. 1–263.
9. Đặng Ngọc Thanh, Thái Trần Bái và Phạm Văn Miên (1980). Định loại động vật không xương sống nước ngọt bắc Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội. tr. 1–573.
10. Đặng Thị Hoàng Oanh, Lê Hữu Thôi và Hoàng Thanh Phương (2012). Đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm càng xanh (*Macrobranchium rosenbergii*) cảm nhiễm virus gây bệnh đốm trắng. Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ 21b. tr. 1–9.
11. Đỗ Thị Hòa (2002). Báo cáo khoa học Đề tài "Nghiên cứu bệnh virus đốm trắng trên tôm Sú và đề xuất biện pháp trị bệnh tại Khánh Hòa. Đề tại cấp tỉnh tại Khánh Hòa, Nha Trang.
12. Đỗ Thị Hòa, Nguyễn Thị Thùy Giang và Nguyễn Thị Nguyệt Huệ (2013). Hội

chứng chết đỏ ở tôm chân trắng (*Litopenaeus Vannamei*). Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y, Hội Thú Y Việt Nam 20(7). tr. 71–79.

13. Lê Cung (2015). Sử dụng Vitamin C trong nuôi trồng Thủy Sản. Tạp chí Thủy sản Việt Nam đăng tải ngày 24/9/2015 lúc 14 giờ 25. Truy cập tại trang: http://thuysanvietnam.com.vn/su-dung-vitamin-c-trong-nuoi-trong-thuy-san-article-13284.tsvn.
14. Lý Thị Thanh Loan, Võ Hồng Phượng, Mã Tú Lan, Chung Minh Lợi (2012). Thử nghiệm sản phẩm Diệp Hạ Châu trong phòng bệnh đốm trắng do virus gây hội chứng đốm trắng trên tôm sú. Báo cáo Đề tài cấp Bộ.
15. Nguyễn Quang Trí (2013). Quy trình nuôi tôm thâm canh - bán thâm canh. Tạp chí Thủy sản Việt Nam đăng tải ngày 26/4/2013 lúc 18 giờ 45. Truy cập tại trang: http://thuysanvietnam.com.vn/quy-trinh-nuoi-tom-tham-canh-ban-tham-canh-article-4532.tsvn
16. Nguyễn Văn Hảo (2004). Một số bệnh thường gặp trên tôm Sú, Các Phương Pháp Chẩn Đoán và Phòng Trị. Nhà xuất bản Nông nghiệp. tr. 1-225.
17. Nguyễn Văn Hảo, Ngô Xuân Tuyến, Đỗ Văn Hoàng và Nguyễn Công Dũng (2007). Dịch tễ học bệnh đốm trắng trên tôm Sú (*Penaeus Monodon*) ở mô hình nuôi tôm quảng canh cải tiến tại đồng bằng sông Cửu Long. Hội nghị khoa học Quốc gia "Biển Đông - 2007. Nha Trang". tr. 52 - 59.
18. Nguyễn Văn Khôi (2001). Động Vật Chí Việt Nam. Tập 9. Nhà xuất bản Khoa học và kĩ thuật. tr. 1–385.
19. Nguyễn Văn Thành (2015). Hướng dẫn thả tôm an toàn và đạt tỷ tệ ống cao. Bài được đăng tải ngày 29/6/2015 lúc 9h15. Truy cập tại: http://vinhthinhbiostadt.com/vi/tin-tuc/huong-dan-cach-tha-tom-giong-an-toan-dat-ty-le-song-cao-517.html 24.9
20. Nguyễn Việt Thắng, Nguyễn Văn Hảo và Lý Thị Thanh Loan (1996). Xác định nguyên nhân gây chết của ôm ở đồng bằng sông cửu long và các biện pháp tổng hợp để phòng trị. Báo cáo đề tài cấp Nhà nước.
21. Như Văn Cẩn (2016). Hiện trạng và định hướng phát triển nuôi tôm nước lợ. Tạp chí Thủy sản Việt Nam đăng tải ngày 8/7/2016 lúc 10 giờ 50. Truy cập tại trang: http://thuysanvietnam.com.vn/hien-trang-va-dinh-huong-phat-trien-nuoi-tom-nuoc-lo-article-15673.tsvn .
22. Phan Quốc Việt, Nguyễn Văn Hảo và Nguyễn Minh Đức (2011). Đánh giá một số yếu tố nguy cơ liên quan bệnh đốm trắng trên tôm Sú (*Penaeus Monodon*) Cà Mau.

Hội nghị khoa học Thủy sản Toàn Quốc, tổ chức tại Thành phố Hồ Chí Minh, ngày 16/12/2011. tr. 198-206.

23. Phan Tuấn Nghĩa, Bùi Việt Hà, Nguyễn Thị Lan Anh và Nguyễn Văn Cường (2015). Báo cáo tổng kết đê tài cấp Nhà nước Nghiên cứu chế tạo chế phẩm Probiotic dạng bào tử *Bacillus Subtilis* tái tổ hợp để phòng virus gây bệnh đốm trắng ở tôm. tr. 1–171.
24. Phan Thị Vân, Trương Thị Mỹ Hạnh, Huỳnh Thị Mỹ Lệ và Phạm Thế Việt (2017). Xác định sự có mặt của virus đốm trắng trong thức ăn tươi sống dùng nuôi vỗ tôm bố mẹ. Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển Nông thôn 1.tr 84–88.
25. Tổng cục Thống kê (2016). Kim ngạch hàng hóa xuất khẩu năm 2014, 2015,2016. Truy cập tại http://www.gso.gov.vn/default.aspx?tabid=629
26. Thanh Hoa (2016). Nam Định: Quản lý quy hoạch vùng nuôi tôm chân trắng. Bài đăng ngày 3/11/2016 lúc 11 giờ 58. Truy cập tại trang: http://tomkhoe.vn/article-detail/nam-dinh-quan-ly-quy-hoach-vung-nuoi-tom-the-chan-trang .
27. Thảo Linh (2014). Năm tỉnh nuôi tôm lớn nhất miền Bắc. Tạp chí Thủy sản, báo đăng ngày 21/5/2014 lúc 10 giờ 07. Truy cập tại: http://thuysanvietnam.com.vn/5-dia-phuong-nuoi-tom-lon-nhat-mien-bac-article-8206.tsvn .
28. Trần Hữu Tiến (2016). Phát triển bền vững kinh tế Thủy Sản. Báo mới đăng Ngày 1/4/2016 lúc 10 giời 41. Truy cập tại: https://baomoi.com/phat-trien-ben-vung-kinh-te-thuy-san/c/19022270.epi
29. Trương Thị Mỹ Hạnh, Đặng Thị Lụa, Lê Thị Mây, Huỳnh Thị Mỹ Lệ và Phan Thị Vân (2016). Sinh vật mang virus gây bệnh trên tôm. Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển Nông thôn 10/2016. tr. 85–94.
30. VASEP (2016). Tổng quan ngành Thủy sản Việt Nam. Báo cáo năm 2016. tr. 1–14.
31. Võ Văn Tuấn, Mathias Corteel, Patrick Sorgeloos và Hans Nauwynck (2010). Bệnh đốm trắng trên tôm thẻ và tôm nước ngọt. Tạp chí Khoa học Nông Lâm Nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM. tr. 183–89.

Tài liệu Tiếng Anh

1. Abbot R.T and S.P Dance (2000). Compendium of Seashells: A color guide to more than 4200 of the world's marine shell. Am Malacol inc. pp. 1–509.
2. ADB/NACA (1997) Shrimp and carp aquaculture sustainability. In: Proceedings of

Regional Study and Workshop on Aquaculture Sustainability and the Environment, Beijing, China, Oct. (1995) NACA, Bangkok, Thailand. pp. 1-19.

3. An N.Q, P.D Phuc, P.T Anh, N.T Tu, L.N Tuyen and L.P Binh (2003). Experiments on seed production and commercial culture of the freshwater prawn *(Macrobrachium nipponense*). Proc 6 th Tech Symp Mekong Fish Pakse, Lao PDR 26-28 Nov 2003. pp. 251-268.
4. Balasubramanian G, M Sarathi, C Venkatesan, J Thomas and A S Hameed (2008). Oral administration of antiviral plant extract of *Cynodon dactylon* on a large scale production against white spot syndrome virus in *Penaeus monodon*. Aquaculture 279. pp 2-5.
5. Bett C and L. Vinatea (2009). Combined effect of body weight, temperature and salinity on shrimp *Litopenaeus vannamei* oxygen consumption rate. Brazilian J Oceanogr 57. pp. 305–314 .
6. Cai S, T Huang, C Wang, X Song, X Sun, J Yu, Y Zhang and C Yang (1995). Epidemiological tudies on the explosive epidemic disease of prawn 1994-1994. J Fish China 19. pp. 112–117.
7. Chakraborty S and Ghosh U (2014). White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Crustaceans: An Overview of Host - Pathogen Interaction. J Mar Biol Oceanogr 3. pp. 3–17.
8. Chakraborty A, S.K Otta, B Joseph, S Kumar, M. S Hossain, I Karunasagar, M.N Venugopal and I Karunasagar (2002). Prevalence of white spot syndrome virus in wild crustaceans along the coast of India. Curr Sci 82. pp. 1392–1397.
9. Chang PS, H.C Chen HC and Y C Wang (1998). Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. In: Aquaculture. pp. 233–242.
10. Chang Y, S Peng, H Wang, H Hsu, C Ho and C Wang (2001). Sequencing and amplified restriction fragment length polymorphism analysis of ribonucleotide reductase large subunit gene of the white spot syndrome virus in blue crab (*Callinectes sapidus*) from American coastal waters. Mar Biotechnol 3. pp. 163–171.
11. Chang C F, M S Su, H Y Chen and I C Liao (2003). Dietary beta-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. Fish & Shellfish Immunology 15. pp. 297-310.
12. Chanratchakool P, J.F Turnbull, S.F Smith and C Limsuwan (1995). Health management

in shrimp ponds. 2nd edition. Aquat Anim Heal Res Institute, Bangkok. pp. 1–111.

13. Chazal N and D Gerlier (2003). Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. Microbiol Mol Biol Rev 67. pp. 226–237.
14. Chen L.L, H.L Hsia, H.C Hsu, C.F Chang, S.E Peng, C.F Lo and H.G Kou (2004). Susceptibility of *Penaeus japonicus, P. monodon, and P. semisulcatus* to White Spot Syndrome Virus (WSSV). J Fish Soc Taiwan 32. pp: 101–114.
15. Chou Hsin-Yiu, C.Y Huang, C.F Lo and G.H Kou (1998). Studies on transmission of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon* and *P. japonicus* via waterborne contact and oral ingestion. In: Aquaculture. pp. 263–276.
16. Chou Hsin-Yiu, C.Y Huang, C.H Wang, H.C Chiang and C.F Lo (1995). Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Dis Aquat Organ 23. pp. 165–173 .
17. Corbel V, Zuprizal, Z Shi, C Huang, Sumartono, J.M Arcier and J.R Bonami (2001). Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). J Fish Dis 24. pp. 377–382 .
18. Corteel M, J.J Dantas-Lima, M Wille, V Alday-Sanz , M.B Pensaert, P Sorgeloos and H.J Nauwynck (2009). Molt stage and cuticle damage influence white spot syndrome virus immersion infection in penaeid shrimp. Vet Microbiol 137. pp. 209–216 .
19. Crockford M (2008). White Spot Disease" Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures. http://www.scahls.org.au/__data/ assets/pdf_file/0009/1516518/White_Spot_Syndrome_Virus.pdf
20. De Yta AG, D.B Rouse and D.A Davis (2004). Influence of Nursery Period on the Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei* Under Pond Production Conditions. J World Aquac Soc 35. pp. 357–365 .
21. Desrina, Marc C.J.Verdegem, A.J Johan, Verreth and M.V Just (2013). On the transmission of the white spot syndrome virus: A review. Aquaculture 23. pp. 13–48.
22. Duan Y, J. Li, Z Zhang, J Li, Q Ge and P Liu (2015). Amino acid sequence of EcCRT shared high identity (82%–85%) with that of other crustaceans. Phylogenetic analysis showed that EcCRT of *E. carinicauda* was clustered together with CRT of other shrimps, indicating that EcCRT should be a member of the CRT fam. Fish Shellfish Immunol 47. pp. 1067–1074.
23. Duan Y, P Liu, J Li, Y Wang, J Li and P Chen (2014). Fish & Shell fi sh Immunology

Molecular responses of calreticulin gene to *Vibrio anguillarum* and WSSV challenge in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. Fish Shellfish Immunol 36. pp. 164–171 .

24. Durand S, D.V Lightner, L.M Nunan, R.M Redman, J Mari and J.R Bonami (1996). Application of gene probes as diagnostic tools for White Spot Baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. Dis Aquat Org 27. pp. 59–66 .
25. Durand S V and D.V Lightner. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. J Fish Dis 25. pp. 381–389 .
26. Edgerton B (2004). Susceptibility of the Australian freshwater crayfish Cherax destructor albidus to white spot syndrome virus (WSSV). Dis Aquat Organ. pp. 187-193.
27. Escobedo-Bonilla CM, V Alday-Sanz, M Wille, P Sorgeloos, M.B Pensaert and H.J Nauwynck (2008). A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. J. Fish Dis. 31. pp. 1–18.
28. Escobedo-Bonilla CM, L Audoorn, M Wille, V Alday-Sanz, P Sorgeloos, M.B Pensaert and H.J Nauwynck (2006). Standardized white spot syndrome virus (WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes. Dis Aquat Organ 68. pp.181–188 .
29. Escobedo-Bonilla CM, M Wille, V Alday Sanz, P Sorgeloos, M.B Pensaert and H.J Nauwynck (2005) In vivo titration of white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. Dis Aquat Organ 66. pp. 163–170 .
30. FAO (1986) Shrimp culture: pond design, operation and management. NACA Train Man Ser No 2 (2). pp. 1–400.
31. Flegel TW (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. Aquaculture 258. pp. 1–33.
32. Flegel TW (1997). Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World J Microbiol Biotechnol 13. pp. 433–442 .
33. Folmer O, M Black, W Hoeh, R Lutz and R Vrijenhoek (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol 3. pp. 294–299 .
34. Fu L L, Y B Wang, Z C Wu and W F Li (2011). In vivo assessment for oral delivery of Bacillus subtilis harboring a viral protein (VP28) against white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 322. pp: 33-38.

35. Galavíz-Silva L, Z.J Molina-Garza, J.M Alcocer-González, J.L Rosales-Encinas and C Ibarra-Gámez (2004). White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. Aquaculture 242. pp. 53–68 .
36. Gao H, J Kong, Z Li, G Xiao and X Meng (2011). Quantitative analysis of temperature, salinity and pH on WSSV proliferation in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* by real-time PCR. Aquaculture 312. pp. 26–31 .
37. Geller J, C Meyer, M Parker and H Hawk (2013). Redesign of PCR primers for mitochondrial Cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. Mol Ecol Resour 13. pp. 1–11.
38. Group CP (1996). Methods to prevent virus carriers and virus-free postlarvae. Shrimp Cult Newsl (January), 1–4 C. P, Bangkok.
39. Hai TN, P.M Duc, V.N Son, T.H Minh and N.T Phuong (2015). Innovation in Seed Production and Farming of Marine Shrimp in Vietnam. Aquac (World Aquac Soc 46. pp. 1–45.
40. Hao NV, L.T.T Loan and L.H Phuoc, (1999). Presence the two viral pathogens WSSV and MBV in three wild shrimp species (*Penaeus indicus, Etapenaeus ensis, Metapenaeus lysianassa*) cultured in the mangrove forest of Ca Mau province. Asian Fish Sci 12. pp. 309–325.
41. Haryadi D, J.A.J Verreth, M.C.J Verdegem and J.M Vlak (2015). Transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from Dendronereis spp. (Peters) (Nereididae) to penaeid shrimp. J Fish Dis 38. pp. 419–428 .
42. Hongtao X, P Chun^ai, W Lei, Z Junping, D Jie, W Chang^an, X Jianhai, J Qi and H Yunde (1999). Development of polymerase chain reaction assay for detection of Penaeus chinensis non-occluded baculovirus. Chinese J Virol 15. pp. 354–359.
43. Hossain MS, A Chakraborty, B Joseph, S.K Otta and I Karunasagar (2001a) Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. Aquaculture 198. pp. 1–11 .
44. Hossain MS, S.K Otta, I Karunasagar and I Karunasagar (2001b) Detection of white spot syndrome virus (WSSV) in wild captured shrimp and in non-cultured crustaceans from shrimp ponds in Bangladesh by polymerase chain reaction. Fish Pathol 36.pp. 9-18.
45. Huang C (2002). Proteomic Analysis of Shrimp White Spot Syndrome Viral Proteins and Characterization of a Novel Envelope Protein VP466. Mol Cell Proteomics 1. pp.

223–231 .

46. Inouye K, K Yamano, N Ikeda, T Kimura, H Nakano, K Momoyama, J Kobayashi and S Miyajima (1996). The Penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes Penaeid acute viremia (PAV). Fish Pathol 31. pp. 39–45.
47. Jiang G (2012). Can white spot syndrome virus be transmitted through the phytoplankton→rotifer →artemia→shrimp pathway? African J Biotechnol 11. pp. 1277–1282.
48. Jiravanichpaisal P, K Söderhäll and I Söderhäll (2004). Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. Fish Shellfish Immunol 17. pp. 265–275 .
49. Kanchanaphum P, C Wongteerasupaya, N Sitidilokratana, V Boonsaeng, S Panyim, A Tassanakajon, B Withyachumnarnkul and T.W Flegel (1998). Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. Dis Aquat Organ 34. pp. 1–7 .
50. Karunasagar I, S.K Otta and I Karunasagar (1997). Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. Aquaculture 153. pp. 9–13 .
51. Kim, C.S., Seung Hyuk Choi, M.S.K. and K.H.K., 2014. Resistance against white spot syndrome virus (WSSV) infection in wild marine crab Gaetice depressus by injection of recombinant VP28 protein. J. Fish Pathol., 27, 11–16.
52. Kongkeo H (1997). Comparison of intensive shrimp farming systems in Indonesia, Philippines, Taiwan and Thailand. Aquac Res 28. pp. 789–796.
53. Kou G, S Peng, Y Chiu and C Lo (1998). Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. Flegel TW Adv shrimp Biotechnol Natl Cent Genet Eng Biotechnol Bangkok 267–271.
54. Laramore SE (2007). Susceptibility of the Peppermint Shrimp Lysmata wurdemanni to the White Spot Syndrome Virus. J Shellfish Res 26. pp. 623–627.
55. Lei ZL, J Huang, C.Y Shi, L.J Zhang and K.K Yu (2002). Investigation into the hosts of white spot syndrome virus (WSSV). Oceanol Limnol Sin 33. pp. 250–258.
56. Leu J, J Tsai, H Wang, A Wang, G Kou and C Lo (2005). The unique stacked rings in the nucleocapsid of the white spot syndrome virus virion are formed by the major structural protein VP664, the largest viral structural protein ever found. J Virol 79. pp. 7–140.

57. Li Q, J Zhang, Y Chen and F Yang (2003). White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for Artemia at different developmental stages. Dis Aquat Organ 57. pp. 261–264.
58. Li Z, Q Lin, J Chen, J.L Wu, T.K Lim, S.S Loh, X Tang and C.L Hew (2007). Shotgun Identification of the Structural Proteome of Shrimp White Spot Syndrome Virus and iTRAQ Differentiation of Envelope and Nucleocapsid Subproteomes. Mol Cell Proteomics 6. pp. 1609–1620 .
59. Liang J-P, J Li, J.T Li, P Liu, F.Z Zhao, G.X Nie, X.J Li and X.H Kong (2014). Effects of salinity on spawning and larval development of Exopalaemon carinicauda. Ying yong sheng tai xue bao = J Appl Ecol 25. pp. 5–13.
60. Lightner DV (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge. In: A handbook. pp. 1-256.
61. Lightner DV and R.M Redman (1998) Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture 164. pp. 201–220 .
62. Lightner D V, K.W Hasson, B.L White and R.M Redman (1998). Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with asian white spot syndrome virus and asian yellow head virus. J Aquat Anim Health 10. pp. 271–281 .
63. Lightner D V (2003). The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV: history in the Americas and current status. 32nd Jt Meet United States-Japan Coop Progr Nat Resour s/n: pp. 1-20.
64. Liu B, Z Yu, X Song and Y Guan (2007a). Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. J Invertebr Pathol 95. pp. 87–92 .
65. Liu M-Y, Y.X Cai and C.S Tzeng (2007b) Molecular Systematics of the Freshwater Prawn Genus *Macrobrachium Bate*, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) Inferred from mtDNA Sequences, with Emphasis on East Asian Species. Zool Stud 46. pp. 272–289.
66. Liu W, D Qian and X.J Yan (2011). Studies on pathogenicity and prevalence of white spot syndrome virus in mud crab, *Scylla serrata* (Forskal), in Zhejiang Province, China. J Fish Dis 34. pp. 131–138 .
67. Lo C.F and G.H Kou (1998). Virus-associated White Spot Syndrome of Shrimp in Taiwan : A Review. Fish Pathol 33. pp. 365–371 .

68. Lo C, H Hsu, M Tsai, C Ho, S Peng, G Kou and D.V Lightner (1999). Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. Dis Aquat Organ 35. pp. 175–185 .
69. Lo CF, C.H Ho, C.H Chen, K.F Liu, Y.L Chiu, P.Y Yeh, S.E Peng, H.C Hsu, H.C Liu, C.F Chang, Su M Sen, C.H Wang and G.H Kou (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. Dis Aquat Org 30. pp. 53–72 .
70. Lo CF, C.H Ho, S.E Peng, C.H Chen, H.C Hsu, Y.L Chiu, C.F Chang, K.F Liu, Su M Sen, C.H Wang and G.H Kou (1996a). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. Dis Aquat Org 27. pp. 215–225 .
71. Lo CF, J.H Leu, C.H Lo, C.H Chen, S.E Peng, Y.T Chen, C.M Chou, P.Y Yeh, C.J Huang, H.Y Chou, C.H Wang and G.H Kou (1996b). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. Dis Aquat Organ 25. pp. 133–141.
72. Lotz J. and MAS (2009). Model of White spot Syndrome Virus (WSSV) Epidemics in *Litopenaeus vannamei.* Dis Aquat Organ 50. pp. 199–209.
73. Lu Y, L.M Tapay, J.A Brock and P.C Loh (1994). Infection of the yellow head baculo like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). J Fish Dis 17. pp. 649–656 .
74. Lu Y, L.M Tapay, R.B Gose, J.A Brock and P.C Loh (1997). Infectivity of Yellow Head Virus (YHV) and the Chinese baculo-like virus (CBV) in two species of penaeid shrimp Penaeus stylirostris (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). In: Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel TW and MacRae IH, (Eds). Asian Fish Soc, Manila, Philipp. pp. 297–304.
75. Maeda M, T Itami, A Furumoto, O Hennig, T Imamura, M Kondo, I Hirono, T Aoki and Y Takahashi (1998). Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) in wild-caught shrimp and other crustaceans . Fish Pathol 33. pp. 373–380.
76. Magbanua FO, K.T Natividad, V.P Migo, C.G Alfafara, F.O de la Peña, R.O Miranda, J.D Albaladejo, E.C Nadala, P.C Loh and L Mahilum-Tapay (2000). White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. Dis Aquat Organ 42. pp. 77–82 .

77. Mohan S (2008). Study on natural reservoirs of shrimp pathogenic viruses. MSc Thesis, Department of Fishery Microbiology, Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University, College of Fisheries, Mangalore. pp. 1-79.
78. Momoyama K, M Hiraoka, H Nakano, M Sameshima (1998). Cryopreservation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) and its survival in sea water at different temperatures. Fish Pathol 33. pp. 95–96.
79. Momoyama K and K Muroga (2005). Diseases of cultured kuruma shrimp in Japan: A review. Fish Pathol 40. pp. 1–14.
80. MPEDA/NACA. 2003. Shrimp Health Management Extension Manual. Prepared by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA) and Marine Products Export Development Authority (MPEDA), India, in cooperation with the Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand; Cochin, India. pp. 1-46.
81. Nakano H, M Hiraoka, M Sameshima, T Kimura and K Momoyama (1998). Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaeid acute viremia (PAV), by some chemical and physical treatments. Fish Pathol 33. pp. 65–71.
82. Nakano H, H Koube, S Umezawa, K Momoyama, M Hiraoka, K Inouye K and S Oseko (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus,* in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trials. Fish Pathol 29. pp. 135–139.
83. New MB (2005). Freshwater prawn farming: Global status, recent research and a glance at the future. In: Aquaculture Research. pp. 210–230.
84. OIE (2016). Report of the meeting of the OIE ad hoc group on susceptibility of crustacean species to infection with OIE listed diseases. World Organ Anim Heal. pp. 1–28.
85. Park JH, Y.S Lee, S Lee and Y Lee (1998). An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. Dis Aquat Organ 34. pp. 71–75 .
86. Peter M, W.W George, V.C Donald, V.R.T Marcos, N Adolfo, J.A.L Luc, P.B.Ralaimarindaza, Ana.Philip-Pierre, B.R.L Hanisi and Nikuli Melba (2014). Case study III: Shrimp White spot syndrome virus outbreak in mozambique and madagascar. World bank Rep 88257–GLB. pp. 1–97.
87. Pradeep B, P Rai, S.A Mohan, M.S Shekhar and I Karunasagar (2012). Biology, Host Range, Pathogenesis and Diagnosis of White spot syndrome virus. Indian J Virol 23. pp.

161–174 .

88. Rajan PR, P Ramasamy, V Purushothaman and G.P Brennan (2000). White spot baculovirus syndrome in the Indian shrimp *Penaeus monodon* and *P. indicus.* Aquaculture 184. pp. 31–44 .
89. Rajendran K V, K.K Vijayan, T.C Santiago and R.M Krol (1999a). Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India. J Fish Dis 22. pp. 183–191 .
90. Rajendran K V, K.K Vijayan, T.C Santiago, R.M Krol (1999b). Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India. J Fish Dis 22. pp. 183–191 .
91. Ramirez-Douriet C, R.D Silva-Davila, J Mendez-Lozana, D Escobedo-Urias, I.L Arana and M Lopez-Meyer (2005). White spot syndrome virus detection in zooplankton of coastal lagoons and shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico 135th Annual Meeting of the merican Fisheries Society, Anchorage, Alaska. pp. 11-16.
92. Ruiz-Velazco, J. M Javier., H Alfredo; M.G Victor and J.M Francisco (2010). Dynamics of Intensive Production of Shrimp Litopenaeus Vannamei Affected by White Spot Disease." *Aquaculture* 300(1–4). p: 113–19.
93. Sahul Hameed A, K Yoganandhan, S Sathish, M Rasheed, V Murugan and K Jayaraman (2001). White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs *(Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). Aquaculture 201. pp. 179–186 .
94. Sahul Hameed AS, G Balasubramanian, S Syed Musthaq and Yoganandhan (2003). Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). Dis Aquat Organ 57. pp. 157–161 .
95. Sahul Hameed AS, M.X Charles and M Anilkumar (2000). Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. Aquaculture 183. pp. 207–213 .
96. Salman SD, T.J Page, M.D Naser, A.G Yasser (2006). The invasion of *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849) (Caridea: Palaemonidae) into the Southern Iraqi Marshes. Aquat Invasions 1. pp. 109–115.
97. Sánchez-Paz A (2010). White spot syndrome virus: An overview on an emergent concern. Vet. Res. 41. pp. 22-34.
98. Sangamaheswaran A.P and M.J.P Jeyaseelan (2001). White Spot Viral Disease in

Penaeid Shrimp – A Review. NAGA ICLARM Q 24. pp. 16–22.

99. Sarathi M, A Nazeer Basha, M Ravi, C Venkatesan, B Senthil Kumar and A.S Sahul Hameed (2008). Clearance of white spot syndrome virus (WSSV) and immunological changes in experimentally WSSV-injected *Macrobrachium rosenbergii*. Fish Shellfish Immunol 25. pp. 222–230 .
100. Shi Z, C Huang, J Zhang, D Chen and J.R Bonami (2000). White spot syndrome virus (WSSV) experimental infection of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. J Fish Dis 23. pp. 285–288 .
101. Shih H-T, E Kamrani, P Davie and M.Y Liu (2009). Genetic evidence for the recognition of two fiddler crabs, Uca iranica and U. albimana (Crustacea: Brachyura: Ocypodidae.....). Springer Sci Revised: 1. pp. 1–10.
102. Song Y L, J J Liu, L C Chan and H H Sung (1997). Glucan-induced disease resistance in tiger shrim (*Penaeus monodon*). Fish Vaccinology 90. pp: 413-421.
103. Sritunyalucksana K, W Wannapapho, C.F Lo and T.W Flegel (2006). PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. J Virol 80. pp. 10734–10742 .
104. Stentiford GD and D.V Lightner (2011). Cases of White Spot Disease (WSD) in European shrimp farms. Aquaculture 319. pp. 302–306 .
105. Sun Y, F Li and J Xiang (2013). Analysis on the dynamic changes of the amount of WSSV in Chinese shrimp Fenneropenaeus chinensis during infection. Aquaculture 376–379. pp. 124–132.
106. Supamattaya K, R.W Hoffmann, S Boonyaratpalin and P Kanchanaphum (1998). Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. Dis Aquat Organ 32. pp. 79–86 .
107. Takahashi Y, K Fukada, M Kondo, A Chongthaleong, K Nishi, M Nishimura, K Ogata, I Shinya, K Takise, Y Fujishima and M Matsumaura (2003). Detection and prevention of wssv infection in culture shrimp. Asian Aquac Mag. pp. 25–27.
108. Takahashi Y, M Itami and T Kondo (1995). Immunodefense system of crustacea. Fish Pathol 30. pp. 141–150 .
109. Takahashi Y, T Itami, M Kondo, M Maeda, R Fujii, S Tomonaga, K Supamattaya and S Boonyaratpalin (1994). Electron Microscopic Evidence of Bacilliform Virus Infection in

Kuruma Shrimp (*Penaeus japonicus*). Fish Pathol 29. pp. 121–125.

110. Tang KFJ, C.R Pantoja, R.M Redman and D.V Lightner (2013). A histological variant of white spot syndrome virus (WSSV) from the Kingdom of Saudi Arabia. J. Invertebr. Pathol. 113. pp. 82–85.
111. Tang X, J Wu, J Sivaraman and C.L Hew (2007). Crystal Structures of Major Envelope Proteins VP26 and VP28 from White Spot Syndrome Virus Shed Light on Their Evolutionary Relationship. J Virol 81. pp. 6709–6717 .
112. Tendencia EA, R.H Bosma and J.A.J Verreth (2010). WSSV risk factors related to water physico-chemical properties and microflora in semi-intensive *Penaeus monodon* culture ponds in the Philippines. Aquaculture 302. pp. 164–168 .
113. Tendencia EA, R.H Bosma and J.A.J Verreth (2011). White spot syndrome virus (WSSV) risk factors associated with shrimp farming practices in polyculture and monoculture farms in the Philippines. Aquaculture 311. pp. 87–93 .
114. The World Bank (2014). Reducing Disease Risk In Aquaculture. World Bank Agric Environ Serv .pp. 1-119.
115. Tonguthai K (1996). The use of chemicals in aquaculture in Thailand. Use Chem aquculture Asia Proc Meet use Chem Aquac Asia 20-22 May, 1996, Tigbauan, Philipp Southeast Asian Fish Dev Center Eds Arthur, JR; Lavilla-Pitogo, CR; Subasinghe, RP. pp. 207–220.
116. Torlakovic L, I Olsen, C Petzold, H Tiainen and B Ogaard (2012). Clinical color intensity of white spot lesions might be a better predictor of enamel demineralization depth than traditional clinical grading. Am J Orthod Dentofac Orthop 142. pp. 191–198 .
117. Tuyen NX, J Verreth, J.M Vlak JM and de Jong MCM (2014) Horizontal transmission dynamics of White spot syndrome virus by cohabitation trials in juvenile *Penaeus monodon* and *P. vannamei*. Prev Vet Med 117. pp. 286–294 .
118. Umesh NR, C.V Mohan, M.J Phillips, B.V Bhat, G Ravi Babu, A.B Chandra Mohan and P.A Padiyar (2008). Risk analysis in aquaculture - experiences from small-scale shrimp farmers of India.pp: 1-178.
119. Unzueta-Bustamante ML, R Silveira-Cofficny, A.A Prieto, G Aguirre-Guzmán and R Vázquez-Juárez (2004). Susceptibility of Litopenaeus schmitti and Cherax quadricarinatus to white spot syndrome virus (WSSV) . Susceptibilidad Litopenaeus schmitti y Cherax quadricarinatus al virus del síndrome la mancha blanca 30. pp. 537–

545.

120. Van Hulten MC, R.W Goldbach and J.M Vlak (2000). Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. J Gen Virol 81. pp. 2525–2529.
121. Van Hulten MCand J.M Vlak (2001). Identification and phylogeny of a protein kinase gene of white spot syndrome virus. Virus Genes 22. pp. 201–207.
122. Van Hulten MC, J Witteveldt, S Peters, N Kloosterboer, R Tarchini, M Fiers, H Sandbrink, R.K Lankhorst and J.M Vlak (2001). The white spot syndrome virus DNA genome sequence. Virology 286. pp. 7–22 .
123. Vanpatten KA, L.M Nunan and D.V Lightner (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. Aquaculture 241. pp. 31–46 .
124. Vazquez-Boucard, C. Escobedo-Fregoso, L. Mercier, R. Llera-Herrera, C. Escobedo-Bonilla and Ma. de J. Duran-Avelar (2012). Crassostrea gigas oysters as a shrimp farm bioindicator of white spot syndrome virus. Dis Aquat Org Dis Aquat Org 98. pp. 201-207.
125. Vazquez-Boucard C, P Alvarez-Ruiz, C Escobedo-Fregoso C, G Anguiano-Vega, Duran-Avelar M de J, V.S Pinto and C.M Escobedo-Bonilla (2010). Detection of white spot syndrome virus (WSSV) in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. J Invertebr Pathol 104. pp. 245–247 .
126. Venegas CA, L Nonaka, K Mushiake, K Shimizu, T Nishizawa1 and K Muroga (1999). Pathogenicity of Penaeid Rod-shaped DNA Virus (PRDV) to Kuruma Prawn in Different Developmental Stages. Fish Pathol 34. pp. 19-23 .
127. Vijayan KK, V Stalin Raj, C.P Balasubramanian, S.V Alavandi, V Thillai Sekhar and T.C Santiago (2005). Polychaete worms--a vector for white spot syndrome virus (WSSV). Dis Aquat Organ 63. pp. 107-111 .
128. Wang L, F Li, B Wang and J Xiang (2013). A new shrimp peritrophin-like gene from exopalaemon carinicauda involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection. Fish Shellfish Immunol 35. pp. 840–846 .
129. Wang Q, B.L White, R.M Redman and D.V Lightner (1999). Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. Aquaculture 170. pp. 179–194.

130. Wang YC, C.F Lo, P.S Chang and G.H Kou (1998). Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. In: Aquaculture. pp. 221–231.
131. Witteveldt J, C C Cifuentes, J M Vlark and M C Van Hulten (2004a). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. Journal of Virology 78. pp: 2057-2061.
132. Witteveldt J, J M Vlark and M C Van Hulten (2004b). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. Fish & Shellfish Immunology 16. pp: 517-579.
133. Wongteerasupaya C, J.E Vickers, S Sriurairatana, G.L Nash, A Akarajamorn, V Boonsaeng, S Panyim, A Tassanakajon, B Withyachumnarnkul and T.W Flegel (1995). A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. Dis Aquat Organ 21. pp. 69–77 .
134. Wongteerasupaya C, S Wongwisansri, V Boonsaeng, S Panyim, P Pratanpipat, G.L Nash, B Withyachumnarnkul and T.W Flegel (1996). DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species. Aquaculture 143. pp. 23–32 .
135. Wu W, L Wang and X Zhang (2005). Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. Virology 332. pp. 578–583 .
136. Wyban J, W.A Walsh and D.M Godin (1995). Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture 138. pp. 267–279.
137. Yan D.C, S.L Dong, J Huang, X.M Yu, M.Y Feng and X.Y Liu (2004). White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. Dis Aquat Organ 59. pp. 67–73.
138. Yan D.C, S.Y Feng, J Huang and S.L Dong (2007). Rotifer cellular membranes bind to white spot syndrome virus (WSSV). Aquaculture 273. pp. 423–426 .
139. Yang F, J He, X Lin, Q Li, D Pan, X Zhang and X Xu (2001). Complete Genome Sequence of the Shrimp White Spot Bacilliform Virus. J Virol 75. pp. 11811–11820 .
140. Yi G, Z Wang, Y Qi, L Yao, J Qian and L Hu (2004). Vp28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. J

Biochem Mol Biol 37. pp. 726–734 .

141. You X, Y Su, Y Mao, M Liu, J Wang, M Zhang and C Wu C (2010). Effect of high water temperature on mortality, immune response and viral replication of WSSV-infected *Marsupenaeus japonicus* juveniles and adults. Aquaculture 305. pp. 133–137 .
142. Zhang C, Li F and J Xiang (2015a). Effect of temperature on the standard metabolic rates of juvenile and adult *Exopalaemon carinicauda*. Chinese J Oceanol Limnol 33. pp. 381–388 .
143. Zhang JS, S.L Dong, X.L Tian, Y.W Dong, X.Y Liu and D.C Yan (2006). Studies on the rotifer (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. Aquaculture 261. pp. 1181–1185 .
144. Zhang XZ, X.Q Cheng, Y.X Yu, H Shen and X.H Wan (2015b). Analysis of ITS1 sequences and genetic relationships between populations of ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*, in the East China Sea. Genet Mol Res 14. pp. 12316–12322.
145. Zhao C, H Fu, S Sun, H Qiao, W Zhang, S Jin, S Jiang, Y Xiong and Y Gong (2017). Experimental inoculation of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* with white spot syndrome virus (WSSV). Dis Aquat Organ 126. pp: 45-52.
146. Zhu Y, Q Ding and F Yang (2007). Characterization of a homologous-region-binding protein from white spot syndrome virus by phage display. Virus Res 125. pp. 145–152 .

PHỤ LỤC

1.1 Phiếu điều tra

THÔNG TIN CHUNG

Họ và tên chủ hộ: .....

Số điện thoại ……..

Địa chỉ: Thôn: ..... Xã .....

Huyện: .....

THÔNG TIN VỀ AO NUÔI

1. Số ao nuôi: .....(ao) Tổng diện tích nuôi: .....(m^2)

2. Hình thức nuôi: Thâm canh Bán thâm canh Khác

3. Mực nước trong ao nuôi .....(m)

4. Nguồn nước cấp

Trực tiếp từ kênh cấp Qua ao xử lý

5. Xử lý nước trước khi nuôi: Có Không

Hóa chất và cách xử lý.....

.....

6. Thời gian thả nuôi:

Vụ 1: từ tháng .....đến tháng.....

Vụ 2: từ tháng .....đến tháng .....

Nếu nuôi 1 vụ lý do tại sao?.....

.....

7. Mật độ thả: .....(con/m^2)

8. Cỡ giống thả:.....

9. Loài tôm thả nuôi: .....

10. Con giống:

Nguồn giống: .....

Trước khi thả nuôi có kiểm dịch không? Có Không

(Nếu có ghi rõ kiểm tra ở đâu, loại bệnh gì?) .....

.....

11. Trước khi thả giống có xử lý không?.....

Nếu có: Phương thức xử lý như thế nào?

12. Các loại thuốc, hóa chất sử dụng trong quá trình nuôi?, mục đích sử dụng thuốc đó

.....

.....

13. Loại thức ăn cho tôm ăn.....

.....

11. Trong quá trình nuôi có thay nước không?.....

12. Số lần thay trong 1 vụ.....

13. Lượng nước thay trong 1 lần.....Có sử dụng lưới lọc không?.....

14. Trong quá trình nuôi thường bắt gặp loài sinh vật nào ngoài tôm nuôi chính?

Kể tên:.....

.....

.....

15. Mương cấp có những sinh vật hoang dã nào hiện diện? Kể tên.....

.....

.....

THÔNG TIN VỀ DỊCH BỆNH

16. Hộ nuôi có tôm bị chết do WSSV không?

Có Không

17. Thời gian chết kéo dài?.....

18. Giai đoạn tôm chết (thả được ? ngày) ……...

……..

…….

19. Dấu hiệu của tôm có hiện tượng chết do WSSV (mô tả): .....

.....

.....

20. Khi tôm nhiễm WSSV, tỷ lệ chết thường bao nhiêu?

.....

.....

21. Trước và trong thời gian tôm chết thời tiết có gì khác thường? Các yếu tố môi trường như nhiệt độ nước, pH, S‰, khí độc, khí hậu.....?

.....

.....

.....

22. Khi tôm bắt đầu có hiện tượng chết ông (bà) có sử dụng thuốc gì để trị bệnh không? Hiệu quả? .....

.....

.....

23. Theo ông (bà) hiện tượng tôm chết WSSV có lây lan giữa các hộ không?

Có Không Không biết

24. Khi tôm bị chết, các loài giáp xác khác trong ao (cua, còng, tôm đất....) có bị chết không.

Có Không Không biết

25. Theo ông (bà) WSSV là nguyên nhân gây ra hiện tượng tôm chết hàng loạt?

Có Không

26. Sau bao lâu kể từ khi tôm nhiễm WSSV, gia đình nuôi thả lại tôm?

1 tháng 2 tháng 1 vụ khác

27. Nhận định chủ quan, nguồn gốc tôm nhiễm WSSV từ đâu?

.....

28, Bệnh do WSSV xảy ra trong 3 năm gần đây, nếu có xảy ra trong ao nuôi của gia đình, tích dấu (x), ghi rõ tháng mấy?

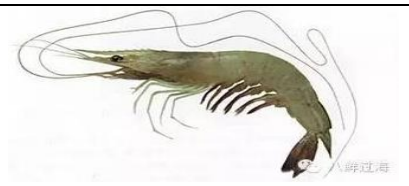
Tên bệnh	2014		2015		2016	
	Vụ 1	Vụ 2	Vụ 1	Vụ 2	Vụ 1	Vụ 2
WSSV						

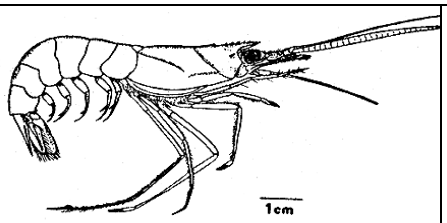
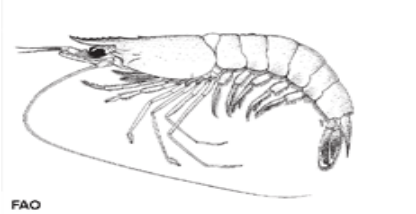
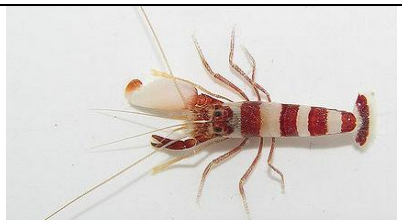
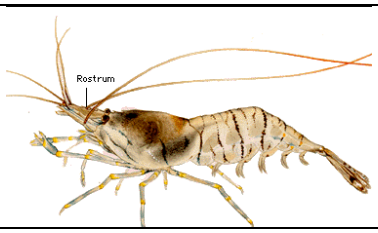
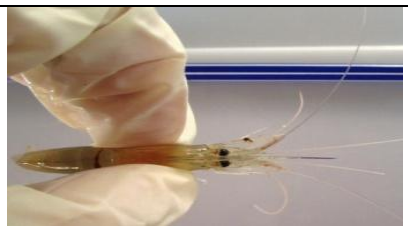
Ngày.....tháng.....năm.....

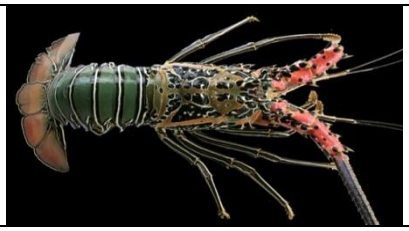
Người phỏng vấn

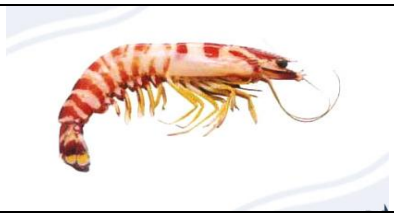
1.2 Hình ảnh danh mục sinh vật mang virus đốm trắng công bố trên thế giới

DANH MỤC LOÀI TÔM MANG VIRUS ĐỐM TRẮNG

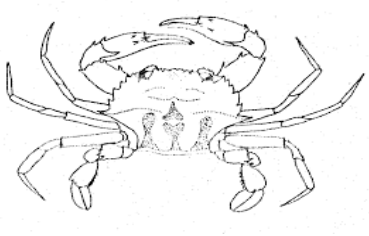
		
Farfantepenaeus aztecus	*Farfantepenaeus duorarum*	*Fenneropenaeus indicus*
		
Fenneropenaeus merguiensis	*Fenneropenaeus penicillatus*	*Litopenaeus stylirostris*
		
Metapenaeus dobsonii	*Marsupenaeaus japonicas*	*Litopenaeus setiferus*
		
Metapenaeus monoceros	*Metapenaeus ensis*	*Metapenaeus brevicornis*
		
Penaeus penicillatus	*Penaeus semisulcatus*	*Penaeus chinensis*
		
Penaeus duorarum	*Penaeus merguiensis*	*Penaeus schmitti*

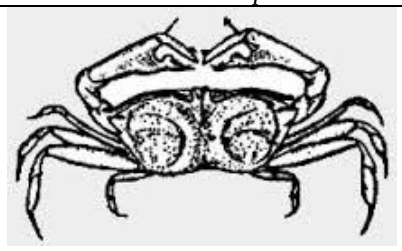
		
Penaeus setiferus	*Penaeus aztecus*	*Parapenaeopsis stylifera*
		
Solenocera indica	*Trachypenaeus curvirostris*	*Alpheus sp.*
		
Alpheus lobidens	*Alpheus brevicristatus*	*Callianassa sp.*
X		
Exopalaemon orientalis	*Macrobrachium rosenbergii*	*Palaemon adspersus*
	X	
Macrobrachium idella	*Macrobrachium lamerrae*	*Exopalaemon carinicauda*
		
Panulirus homarus	*Panulirus longipes*	*Panulirus ornatus*

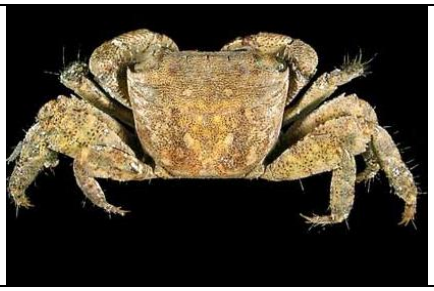
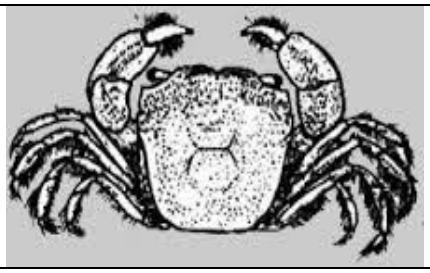
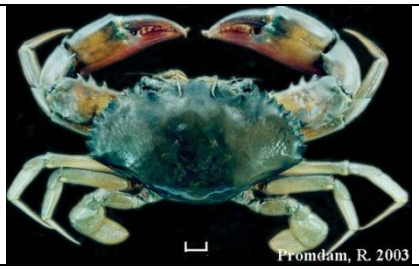
		
Panulirus penicillatus	*Panulirus polyphagus*	*Panulirus versicolor*
		
Scyllarus arctus	*Astacus astacus*	*Astacus leptodactylus*
		
Cherax destructor	*Cherax quadricarinatus*	*Pacifastacus leniusculus*
		
Procambarus clarkii	*Orconectes limosus*	*Orconectes punctimanus*
	X	
Acetes sp.	*Aristeus sp.*	*Heterocarpus sp.*
		
Metapenaeus elegans	*Metapenaeus affinis*	*Palaemon styliferus*

		X
Penaeus canaliculatus	*Solenocera crassicornis*	*Seranopsis longipes*
Solenocera choprai	*Trachypenaeus curvirostris*	*Squilla mantis*
		
Farfantepenaeus paulensis	*Farfantepenaeus brasiliensis*	*Macrobranchium nipponense*

DANH MỤC LOÀI CUA NHIỄM VIRUS ĐỐM TRẮNG

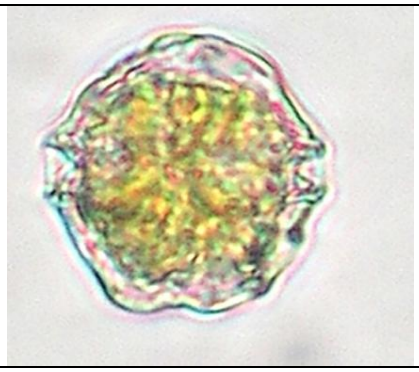
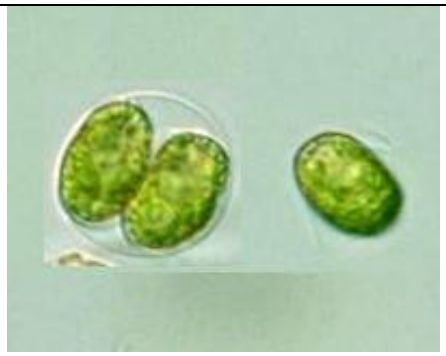
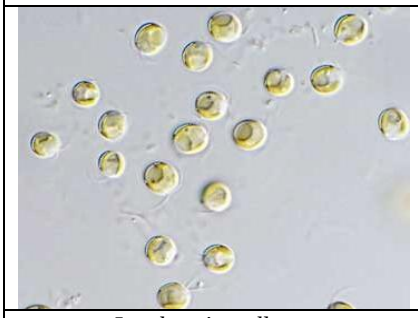
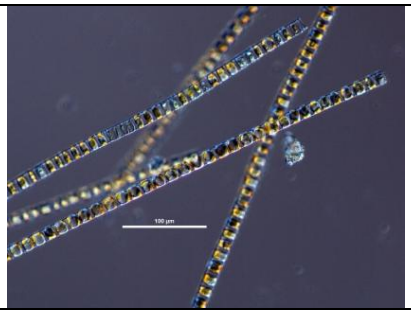
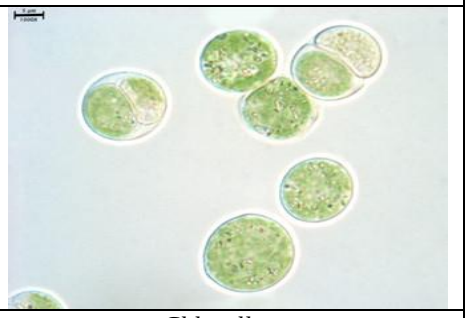
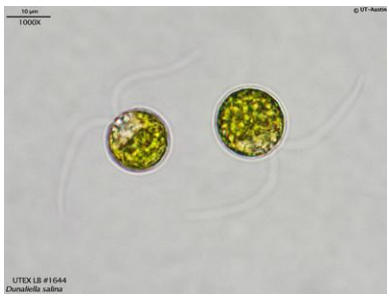
		
Atergatis integerrimus	*Calappa philarigus*	*Uca arcuata*
		
Callinectes sapidus	*Callinectes arcuatus*	*Cancer pagurus*
		
Carcinus maenas	*Charybdis annulata*	*Charybdis feriatus*
		
Charybdis granulata	*Charybdis japonica*	*Charybdis lucifera*
		
Charybdis natator	*Charybdis cruciata*	*Charybdis hoplites*

		
Charybdis riversandersoni	*Charybdis cruciate*	*Charybdis feriatus*
	x	x
Charybdis granulata	*Charybdis natatus*	*Demania splendida*
		
Doclea hybrida	*Lio. puber*	*Gelasimus marionis nitidus*
		
Grapsus albolineatus	*Halimede ochtodes*	*Helice tridens*
		
Liagore rubronaculata	*Liocarcinus depurator*	*Liocarcinus puber*
		x
Lithodes maja	*Macrophthalmus sulcatus*	*Matuta miersi*

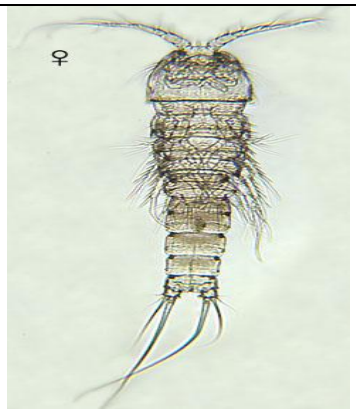
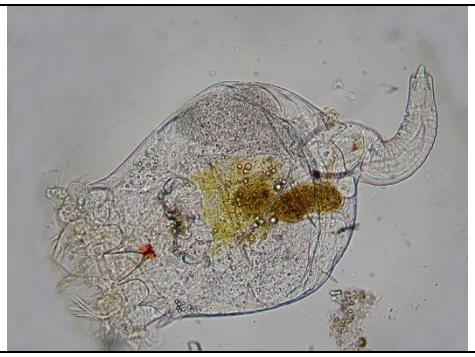
		
Matura planipes.	*Menippe rumphii*	*Metapograpsus messor*
	X	X
Paradorippe granulate	*Paratelphusa hydrodomous*	*Paratelphusa pulvinata*
	X	
Phylira syndactyla	*Parthenope prensor*	*Podophthalmus vigil*
		
Portunus pelagicus	*Portunus sanguinolentus*	*Pseudograpsus intermedius*
X		
Sesarma oceanica	*Scylla serrata*	*Scylla olivacea*

	X	
Scylla paramamosain	*Somanniathelpusa tranquebaricca*	*Thalamite danae*
	 *Uca pugilator*	

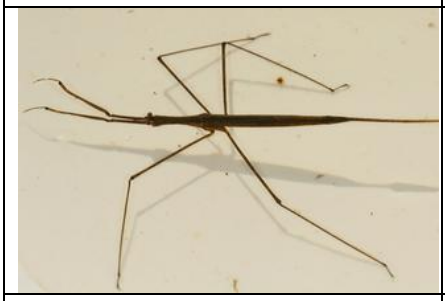
DANH MỤC LOÀI THỰC VẬT PHÙ DU NHIỄM VIRUS ĐỐM TRẮNG

		
Alexandrium tamarense	*Alexandrium minutum*	*Isochrysis zhanjiangensis*
		
Platymonas subcordiformis	*Heterosigma akashiwo*	*Scrippsiella trochoidea*
		
Isochrysis galbana	*Skeletonema costatum*	*Chlorella sp*
		
Dunaliella salina		

DANH MỤC LOÀI ĐỘNG VẬT PHÙ DU NHIỄM VIRUS ĐỐM TRẮNG

		
Branchiopoda cladocera	*Branchiopoda*	*Artemia franciscana*
		
Chaetognata	*Acartia clause*	*Nitocra sp*
x		
Schmackeria dubia	*Brachionus urceu*	*Brachionus plicatilis*

DANH MỤC LOÀI CÔN TRÙNG, GIUN NHIỀU TƠ VÀ NHUYỄN THỂ NHIỄM VIRUS ĐỐM TRẮNG

		
Coleoptera	*Ephydridae*	*Notonecta*
		X
Ranatra	*Dragon nymph*	*Dendronereis spp*
X		
Marphysa gravelyi	*Crassostrea gigas*	*Perinereis* sp