Innate immune responses of whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) experimentally infected with acute hepatopancreas necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus*

Tuan V. Vo*, Truc T. T. Nguyen, & Binh T. T. Vo

Faculty of Fisheries, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: March 22, 2018

Revised: August 29, 2018

Accepted: September 18, 2018

Keywords

Immune responses

Penaeus vannamei

Vibrio parahaemolyticus

***Corresponding author**

Vo Van Tuan

Email: vovantuan@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

The innate immune responses of the whiteleg shrimps (*Penaeus vannamei*) experimentally challenged with *V. parahaemolyticus* by immersion were investigated for a period of 120 h. The results showed that the lethal dose 50% (LD₅₀) of shrimps (2 - 3 g) challenged with *V. parahaemolyticus* was 4.7×10^6 CFU/mL. No significant differences in immune parameters were observed between the control and challenged group right after challenge (0 hpi). However, the total haemocyte count, phenoloxidase activity and respiratory bursts activity were decreased in the challenged shrimps after 24 and 48 hpi and significantly different from those in the control shrimps ($P < 0.05$). At 72, 96 and 120 hpi, there were no significant differences in the total haemocyte count, phenoloxidase activity and respiratory burst activity between two treatments. The observations of this study showed that the innate immune responses of the whiteleg shrimp were decreased due to the infection by *V. parahaemolyticus*.

Cited as: Vo, T. V., Nguyen, T. T. T., & Vo, B. T. T. (2019). Innate immune responses of whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) experimentally infected with acute hepatopancreas necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *The Journal of Agriculture and Development* 18(1), 80-88.

Đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thẻ chân trắng, *Penaeus vannamei*, cảm nhiễm bởi vi khuẩn gây hoại tử gan tụy cấp *Vibrio parahaemolyticus*

Võ Văn Tuấn*, Nguyễn Thị Thanh Trúc & Võ Thị Thanh Bình

Khoa Thủy Sản, Trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 22/03/2018

Ngày chỉnh sửa: 29/08/2018

Ngày chấp nhận: 18/09/2018

Từ khóa

Đáp ứng miễn dịch

Penaeus vannamei

Vibrio parahaemolyticus

*Tác giả liên hệ

Võ Văn Tuấn

Email: vovantuan@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) cảm nhiễm bởi vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thông qua phương pháp ngâm được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm trong thời gian 120 giờ. Kết quả thí nghiệm cho thấy chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* sử dụng gây cảm nhiễm trên tôm thẻ (2 - 3 g) với liều gây chết 50% (LD₅₀) là $4,7 \times 10^6$ CFU/mL. Không có sự khác biệt về các chỉ tiêu miễn dịch giữa nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức gây nhiễm ở thời điểm 0 h. Tuy nhiên, ở thời điểm 24 và 48 h, tổng tế bào máu, hoạt tính phenoloxidase và hoạt tính của gốc oxy hoá tự do (respiratory burst) ở tôm cảm nhiễm bởi *V. parahaemolyticus* giảm đáng kể và khác biệt có ý nghĩa so với nhóm đối chứng ($P < 0,05$). Ở các thời điểm thu mẫu tiếp theo (72, 96 và 120 giờ) thì không có sự khác biệt về tổng tế bào máu, hoạt tính phenoloxidase và hoạt tính của gốc oxy hoá tự do giữa hai nghiệm thức. Từ kết quả này có thể kết luận rằng hệ thống miễn dịch tự nhiên của tôm thẻ bị suy yếu do cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp *V. parahaemolyticus*.

1. Đặt Vấn Đề

Tôm thẻ, *Penaeus vannamei*, là một trong những loài tôm được nuôi khá phổ biến ở vùng Western (Menz & Blake, 1980) và chiếm khoảng 95% tổng sản lượng tôm nuôi (Lightner, 2011). Với việc gia tăng diện tích nuôi và thâm canh hóa dẫn đến sự xuất hiện và lây lan của nhiều tác nhân gây bệnh nguy hiểm (Lightner, 2011), đặc biệt là bệnh do vi khuẩn và virus. Những năm gần đây, ngành nuôi tôm trên thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng đang phải đối mặt với một dịch bệnh mới với tên gọi ban đầu là hội chứng chết sớm (early mortality syndrome – EMS) hay bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (Acute hepatopancreas necrosis syndrome – AHPND) trên tôm thẻ chân trắng. Khả năng bệnh bùng phát và lây lan rất nhanh. Bệnh xuất hiện đầu tiên tại Trung Quốc (2009), sau đó lây lan nhanh sang Việt Nam (2010), Malaysia (2011), Thái Lan (2012), Mexico (2014), và Philippines (2015) (Zorriehzahra & Banaederakhshan, 2015).

Hệ thống miễn dịch của giáp xác nói chung và của tôm nói riêng thiếu những yếu tố cần thiết cho đáp ứng miễn dịch đặc hiệu như tế bào lympho T, phân tử MHC (major histocompatibility) và Ig. Quá trình đề kháng ở giáp xác chủ yếu dựa vào cơ chế đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu (miễn dịch tự nhiên), trong đó tế bào máu giữ vai trò quan trọng trong quá trình đáp ứng miễn dịch ở giáp xác nhằm chống lại các tác nhân gây bệnh như vi khuẩn, nấm, ký sinh trùng... (Bachere & ctv., 2004; Jose & ctv., 2010; Mattozzo & Marin, 2010). Tế bào máu ở giáp xác tham gia trực tiếp vào quá trình nhận diện, thực bào, phong toả và sản sinh ra các hợp chất kháng khuẩn như phenoloxidase, các gốc oxy hoá tự do (reactive oxygen intermediates), superoxide dismutase (Song & Hsieh, 1994; Hernández-López & ctv., 1996; Dantas-Lima & ctv., 2013). Quá trình thực bào ở giáp xác, đặc biệt là tôm thẻ (*Penaeus vannamei*) đối với tác nhân vi khuẩn gây bệnh như *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii* đã được nghiên cứu bởi tác giả (Vo & ctv., 2015).

Phương pháp phân tích các chỉ tiêu miễn dịch đã được nghiên cứu trên tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*) (Dang & ctv., 2012). Các nghiên cứu về quá trình đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thể cảm nhiễm bởi vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* đã được ghi nhận (Liu & ctv., 2004; Tseng & Chen, 2004; Hsu & Chen, 2007). Tuy nhiên, có rất ít nghiên cứu về khả năng đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thể sau khi bị cảm nhiễm bởi tác nhân vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (*Vibrio parahaemolyticus*). Do đó, mục tiêu của đề tài nhằm đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thể cảm nhiễm bởi vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Tôm thể (PL₁₁), nhập từ Trại sản xuất tôm giống sạch bệnh của công ty Việt Úc, được nuôi trong hệ thống tuần hoàn tại Trại thực nghiệm Thủy sản – Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM. Tôm được cho ăn 2 lần/ngày với 5% trọng lượng thân. Nhiệt độ nước trong bể được duy trì ở mức $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, pH 7,5 - 8,0, độ mặn 12 ± 1 g/L, độ kiềm > 80 mg/L, ammonia tổng $< 0,5$ mg/L, và nitrite $< 0,15$ mg/L. Tôm với trọng lượng từ 2 - 3 g sẽ được chọn để tiến hành thí nghiệm.

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (EMS/APHND) được phân lập, định danh và giữ giống (-80°C) tại phòng thí nghiệm Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Vi khuẩn và điều kiện nuôi cấy

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* được phục hồi trên môi trường TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt), bổ sung 1% NaCl, ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. Chọn một khuẩn lạc cấy thuần sang môi trường TSA (Tryptic Soya Agar), bổ sung 1% NaCl, ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. Sau đó chọn một khuẩn lạc riêng lẻ tăng sinh trong môi trường TSB (Tryptic Soya Broth), bổ sung 1% NaCl, ở nhiệt độ 30°C trong 7 giờ với số vòng lắc 150 vòng/phút. Mật độ vi khuẩn sẽ được xác định bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 610 nm, sau đó sẽ được quy đổi dựa trên công thức

đường chuẩn CFU/mL = $(11,92 \times \text{OD}_{610 \text{ nm}} - 1,13) \times 10^8$ (số liệu chưa công bố).

2.2.2. Phương pháp xác định LD₅₀ (Lethal Dose 50%) của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Thí nghiệm xác định giá trị LD₅₀ được bố trí theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên với bốn nghiệm thức có các liều gây nhiễm chênh lệch nhau 10 lần và một nghiệm thức đối chứng không gây nhiễm. Vi khuẩn sau khi tăng sinh trong môi trường TSB, bổ sung 1% NaCl, ở nhiệt độ 30°C trong 7 giờ với số vòng lắc 150 vòng/phút. Sau đó tiến hành gây bệnh thực nghiệm bằng cách cho trực tiếp huyền phù vi khuẩn vào bể thí nghiệm 50 L (chứa 18 L nước và 2 L canh vi khuẩn) để đạt được nồng độ pha loãng 10^{-1} . Sau đó, lấy 2 L nước từ bể này cho vào bể thứ hai chứa 18 L nước để đạt nồng độ pha loãng 10^{-2} . Tiếp tục làm như vậy cho cho bể thứ ba và thứ tư để đạt nồng độ pha loãng là 10^{-3} và 10^{-4} . Tôm được ngâm 2 giờ, sau đó rửa qua nước biển với độ mặn 12 ± 1 g/L và sẽ được bố trí vào bể thí nghiệm mới chứa 20 L nước. Mỗi bể được bố trí 20 tôm (2 - 3 g/con) tương ứng với một nồng độ pha loãng và được lặp lại 3 lần. Tôm ở bể đối chứng được ngâm trong 20 L nước với lượng TSB bằng với lượng TSB chứa huyền phù vi khuẩn trong bể thí nghiệm. Thí nghiệm được theo dõi trong 10 ngày. Tôm có biểu hiện bệnh lý sẽ được thu mẫu (gan tụy) cấy phân lập trên môi trường TCBS và môi trường chọn lọc Chromagar Vibrio. Giá trị LD₅₀ được tính theo công thức (Reed & Muench, 1938):

$$\log \text{LD}_{50} = \log(\text{tỷ lệ chết} > 50\%) + (\log(10^{-1}) \times \text{pd}) = y.$$

$$\text{pd} = ((\text{tỷ lệ chết} > 50\%) - 50) / ((\text{tỷ lệ chết} > 50\%) - (\text{tỷ lệ chết} < 50\%)).$$

$$\text{LD}_{50} = 10^y.$$

Liều gây chết 50% = (nồng độ vi khuẩn trong huyền phù ban đầu) $\times 10^y$.

2.2.3. Thí nghiệm xác định các chỉ tiêu miễn dịch trên tôm

Thí nghiệm xác định các chỉ tiêu miễn dịch được bố trí ngẫu nhiên trong hệ thống bể composit 50 L (chứa 20 L nước), sục khí liên tục. Nhiệt độ nước dao động từ $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, pH 7,5 - 8,0, độ mặn 12 ± 1 g/L, độ kiềm > 80 mg/l, ammonia tổng $< 0,5$ mg/l, và nitrite $< 0,15$ mg/L. Tôm thể 2 - 3 g được bố trí vào bể với số lượng

10 con/ bể/ thời điểm thu mẫu và được lặp lại 3 lần. Tôm sau khi được bố trí vào bể tiếp tục được thuần dưỡng 2 ngày. Tôm sẽ được gây bệnh thông qua phương pháp ngâm (dựa vào kết quả LD50 của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*). Tôm ở nghiệm thức đối chứng được ngâm trong 20 L nước với lượng TSB (Trytic Soya Broth) bằng với lượng TSB chứa huyền phù vi khuẩn trong bể thí nghiệm. Sau khi gây cảm nhiễm, mẫu tôm sẽ được thu vào các thời điểm như 0, 24, 48, 72, 96 và 120 giờ để lấy mẫu xác định các chỉ tiêu miễn dịch. Mỗi bể thu ngẫu nhiên 3 con.

2.2.4. Phương pháp phân lập và định danh vi khuẩn

Vi khuẩn từ mẫu tôm bệnh sẽ được tái phân lập trên môi trường TCBS và Chromagar Vibrio (bổ sung 1% NaCl). Thu mẫu tôm bệnh, tách phần gan tụy tôm và nghiền trong dung dịch đệm SPBS (shrimp phosphate buffer saline). Hút 0,1 mL dịch nghiền cho vào môi trường TCBS (1% NaCl), trộn đều và ủ 24 giờ ở 30°C. Chọn khuẩn lạc riêng lẻ cấy thuần trên môi trường TCBS, TSA và Chromagar Vibrio (1% NaCl). Quan sát hình dạng, màu sắc khuẩn lạc và tiến hành định danh vi khuẩn bằng IDS 14 GRNS (14 phản ứng sinh hoá dùng để định danh trực khuẩn gram âm) của Công ty Nam Khoa.

2.2.5. Phương pháp phân tích các chỉ tiêu miễn dịch

Các chỉ tiêu miễn dịch như tổng tế bào máu, định loại tế bào máu (tế bào không hạt, tế bào bán hạt và tế bào hạt), khả năng tạo ra các hợp chất kháng khuẩn dựa vào tài liệu nghiên cứu của Song & Hsieh, 1994; Hernández-López & ctv., 1996; Dantas - Lima & ctv., 2013; Vo & ctv., 2015.

Tổng tế bào máu: mẫu tôm được thu bằng cách dùng ống tiêm vô trùng 1mL có chứa dung dịch chống đông (marine anticoagulant: 450 mM NaCl, 100 mM glucose, 30 mM trisodium citrate, 26 mM citric acid, 10 mM EDTA, pH 5,4) với tỷ lệ 1:1 (200 μ L dung dịch chống đông: 200 μ L máu tôm). Mật độ tế bào máu được xác định bằng buồng đếm hồng cầu và quan sát dưới kính hiển vi (40X).

Tổng tế bào máu (tb/mL) = tổng tế bào đếm được trong 4 ô lớn $\times$ 2500 $\times$ hệ số pha loãng (Hansen, 2000).

Định loại tế bào máu: qui trình thực hiện tiêu bản, nhuộm và định loại tế bào được thực

hiện theo phương pháp của Dantas-Lima & ctv. (2013). Máu tôm được thu bằng ống tiêm vô trùng (1 mL) có chứa dung dịch chống đông, sau đó đem ly tâm với lực ly tâm 500 xg trong 10 phút ở 4°C. Phần dịch phía trên được loại bỏ và phần viên được cố định trong dung dịch marine fixative (2% glutaraldehyde + 2% saccharose) trong 30 phút ở 4°C. Mẫu máu được trải lên lam thủy tinh, làm khô, cố định 5 phút trong ethanol, rửa bằng nước cất và nhuộm với haematoxylin và eosin. Quan sát tiêu bản dưới vật kính hiển vi (100X) và đếm tổng 200 tế bào (Hrubec & ctv., 2000).

Định loại tế bào (tb/mL) = (số lượng mỗi loại tế bào $\times$ tổng tế bào máu)/200.

2.2.6. Phương pháp xác định hoạt tính phenoloxidase (PO)

Hoạt tính phenoloxidase được xác định dựa theo phương pháp của Hernández-López & ctv. (1996) với một số hiệu chỉnh. Mẫu máu sau khi thu được ly tâm với lực ly tâm 500 xg trong 10 phút ở 4°C, sau đó loại bỏ phần dịch phía trên. Phần viên được hòa tan trong 1 mL dung dịch đệm cacodylate-citrate (0,01 M sodium cacodylate, 0,45 M sodium chloride và 0,1 M trisodium citrate, pH 7,0). Ly tâm một lần nữa ở 500 xg trong 10 phút ở 4°C, loại bỏ phần dịch, phần viên lại được hòa tan với 200 μ L dung dịch đệm cacodylate (0,01M sodium cacodylate, 0,45M sodium chloride, 0,01 M calcium chloride và 0,26 M magnesiumchloride, pH 7,0). 100 μ L mẫu được cho vào đĩa 96 giếng (96-cell culture plates), cho tiếp 50 μ L trypsin (1 mg/mL) vào và ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, 50 μ L L-DOPA (3 mg/mL) được cho vào và ủ 10 phút. Tiếp theo, cho 800 μ L dung dịch đệm cacodylate vào. Đọc kết quả bằng máy so màu quang phổ (microplate reader) ở bước sóng 490 nm. Mẫu đối chứng gồm có 100 μ L mẫu, 50 μ L đệm cacodylate (thay thế trypsin) và 50 μ L L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine).

2.2.7. Phương pháp xác định hoạt tính gốc oxy hoá tự do (respiratory burst)

Hoạt tính respiratory burst được xác định theo phương pháp của Song & Hsieh (1994) với một vài hiệu chỉnh. Mẫu máu sau khi thu được ly tâm ở 500 xg trong 10 phút ở 4°C, loại bỏ phần dịch phía trên, sau đó phần viên được hòa tan trong 1 mL môi trường nuôi cấy tế bào (L-15 medium).

100 μL mẫu máu được cho vào đĩa 96 giếng và được ủ ở nhiệt độ 27-28 $^{\circ}\text{C}$ trong 30 phút. Loại bỏ phần dịch, sau đó cho vào 100 μL zymosan (0,1% zymosan trong Hanks' solution minus phenol red, Sigma). Ủ 30 phút ở nhiệt độ 27-28 $^{\circ}\text{C}$, loại bỏ zymosan, tế bào máu được rửa 3 lần với 100 μL dung dịch SPBS (shrimp phosphate buffered saline). Mẫu được nhuộm với 100 μL dung dịch nitroblue tetrazolium chloride (NBT) (0,3%) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, rồi loại bỏ dung dịch NBT. Tế bào máu sau đó được rửa 3 lần với 100 μL methanol 70%, để khô, rồi hòa tan bằng cách thêm vào 120 μL KOH 2M và 140 μL dimethyl sulphoxide. Mẫu được đo bằng máy microplate reader ở bước sóng 630 nm.

2.2.8. Phương pháp phân tích thống kê

Tất cả các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel thông qua trắc nghiệm T-test với mức ý nghĩa 0,05%.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Liều LD₅₀ của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* là một trong những tác nhân vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm đã xuất hiện trong thời gian qua và gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành công nghiệp nuôi tôm toàn cầu (Tran & ctv., 2013; Lee & ctv., 2015). Từ kết quả thí nghiệm, chúng tôi nhận thấy rằng, tôm được gây nhiễm bởi chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* xuất hiện các triệu chứng bệnh như lơ dờ, phản xạ chậm và một vài con có dấu hiệu bỏ ăn sau 1 ngày gây nhiễm. Tôm bắt đầu chết sau 2 ngày gây nhiễm và số lượng tôm chết tăng dần đến ngày thứ 10. Phần gan tụy tôm bệnh nhạt màu, mềm và dễ vỡ khi ấn nhẹ. Kết quả phân lập những con tôm có biểu hiện bệnh cho thấy, vi khuẩn cho khuẩn lạc màu xanh trên môi trường TCBS và màu tím hoa cà trên môi trường Chromagar Vibrio (Hình 1). Kết quả định danh đã chứng minh được, vi khuẩn có các đặc điểm sinh hoá phù hợp với chủng *V. parahaemolyticus*.

Số lượng và tỷ lệ tôm chết trung bình ở các nghiệm thức trong thí nghiệm xác định liều gây chết 50% động vật thí nghiệm (LD₅₀) được trình bày qua Bảng 1. Kết quả kiểm tra mật độ vi khuẩn bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 610 nm (OD_{610 nm}) và quy đổi dựa trên công thức đường chuẩn CFU/mL = (11,92 $\times$ OD_{610 nm} -

Hình 1. Hình thái khuẩn lạc *Vibrio parahaemolyticus* trên môi trường TCBS và Chromagar Vibrio.

$1,13) \times 10^8$ cho thấy, mật độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trong bình tăng sinh gốc đạt $7,5 \times 10^8$ CFU/ml. Như vậy, liều gây nhiễm ở các nghiệm thức NT 10⁻¹, NT 10⁻², NT 10⁻³, NT 10⁻⁴, tương ứng với liều vi khuẩn gây nhiễm lần lượt là $7,5 \times 10^7$ CFU/mL, $7,5 \times 10^6$ CFU/mL, $7,5 \times 10^5$ CFU/mL, $7,5 \times 10^4$ CFU/mL. Từ kết quả này, chúng tôi tính toán được liều LD₅₀ (theo phương pháp của Reed & Muench, 1938) của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* là $4,7 \times 10^6$ CFU/mL.

Các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy rằng, liều LD₅₀ của chủng *Vibrio* cao hay thấp còn tùy thuộc vào chủng vi khuẩn, phương pháp gây nhiễm và kích cỡ tôm. Theo Robertson & ctv. (1998), liều LD₅₀ của vi khuẩn *V. harveyi* trên tôm thẻ post-larvae khi gây nhiễm bằng phương pháp ngâm trong 2 giờ là $5,0 \times 10^6$ CFU/mL. Trong khi liều LD₅₀ của vi khuẩn *V. alginolyticus* trên tôm sú post-larvae là $2,5 \times 10^6$ CFU/mL (Thakur & ctv., 2003). Nghiên cứu gần đây của Lopez-Leon & ctv. (2016) cho thấy, liều LD₅₀ của chủng vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ *Penaeus vannamei* (0,1 - 0,5 g) bằng phương pháp ngâm (trong 72 giờ) là $6,0 \times 10^4$ CFU/mL đến $3,0 \times 10^5$ CFU/mL. Trong thí nghiệm này, tôm với kích cỡ 2 - 3 g được gây nhiễm bằng phương pháp ngâm trong 2 giờ với giá trị LD₅₀ đạt $4,7 \times 10^6$ CFU/mL. Kết quả chúng tôi thu được không có sự khác biệt đáng kể so với các nghiên cứu của Robertson & ctv. (1998) và Thakur & ctv. (2003), tuy nhiên cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Lopez-Leon & ctv. (2016). Sự khác biệt này có thể là do sự khác biệt về kích cỡ tôm, thời gian gây nhiễm và độc tính của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Kết quả cho thấy, khả năng đề kháng của tôm nhỏ đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* kém hơn so với tôm lớn.

Bảng 1. Số lượng và tỷ lệ tôm chết ở thí nghiệm xác định LD₅₀

Nghiệm thức (NT)	Lần lặp lại	Số tôm bố trí/lần lặp lại	Số tôm chết cộng dồn	Số tôm sống cộng dồn	Tỷ lệ chết cộng dồn (%)
NT 10 ⁻¹	3	20	35	0	100,00
NT 10 ⁻²	3	20	15	9,3	61,64
NT 10 ⁻³	3	20	4,3	26,3	14,13
NT 10 ⁻⁴	3	20	1,3	45,0	2,88

3.2. Đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thể cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

3.2.1. Tổng tế bào máu và từng loại tế bào

Kết quả thực hiện tiêu bản máu và nhuộm với hematoxylin và eosin cho thấy, có 3 loại tế bào được ghi nhận: tế bào không hạt (hyaline cells), tế bào bán hạt (semi-granular cells), và tế bào hạt (granular cells). Kết quả này phù hợp với kết quả của các nghiên cứu trước đó về phân loại tế bào máu giáp xác (Söderhäll & Smith, 1983; van de Braak & ctv., 1996; Dantas-Lima & ctv., 2013)(Hình 2).

Hình 2. Hình thái tế bào máu tôm thể chân trắng (A: tế bào được cố định trong dung dịch marine fixative; B: tế bào được nhuộm với hematoxylin và eosin).

Kết quả định lượng cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) về tổng tế bào máu giữa nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức gây nhiễm bởi vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* ở thời điểm 0 giờ. Tổng tế bào máu ở nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức gây nhiễm lần lượt là $43,9 \pm 6,8 \times 10^5$ tế bào/mL và $41,2 \pm 8,2 \times 10^5$ tế bào/mL. Tổng tế bào máu ở nghiệm thức gây nhiễm giảm 19% ($33,4 \pm 6,1 \times 10^5$ tế bào/mL) và 24% ($31,4 \pm 5,9 \times 10^5$ tế bào/mL) sau 24 và 48 giờ gây nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($P < 0,05$). Ở các thời điểm thu mẫu tiếp theo (72, 96 và 120 giờ) thì không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tổng tế bào máu giữa nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức gây

nhiễm (Bảng 2). Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Hsieh & ctv. (2008) trên tôm thể cảm nhiễm bởi vi khuẩn *Vibrio alginolyticus*. Kết quả định loại tế bào cho thấy, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ tế bào không hạt, tế bào bán hạt và tế bào hạt ở nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức gây nhiễm ở hầu hết các thời điểm thu mẫu. Tuy nhiên, ở thời điểm 24 giờ, chúng tôi ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ tế bào không hạt, tế bào bán hạt và tế bào hạt giữa nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức gây nhiễm ($P < 0,05$). Tế bào không hạt ở nhóm đối chứng chiếm tỷ lệ thấp hơn nhóm gây nhiễm bởi vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (đối chứng: 65,6% và nghiệm thức: 78,9%), trong khi tế bào bán hạt và tế bào hạt lại chiếm tỷ lệ cao hơn (tế bào bán hạt ở nhóm đối chứng là 22,2% và nghiệm thức là 13,3%; tế bào hạt ở nhóm đối chứng là 14,0% và nghiệm thức là 7,7%). Riêng tế bào hạt thì sự khác biệt có ý nghĩa thống kê còn được ghi nhận ở thời điểm 48 giờ (Bảng 2). Tế bào hạt ở nghiệm thức gây nhiễm có khuynh hướng giảm dần nhưng sau đó tăng và ổn định trở lại. Sự biến động này có thể là do cơ chế đáp ứng miễn dịch tự nhiên của giáp xác, và đây cũng là một trong các chỉ tiêu để đánh giá đáp ứng miễn dịch tự nhiên ở tôm. Theo Johansson & ctv. (2000), tế bào máu của giáp xác giữ vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch, thực hiện các chức năng như thực bào, đóng gói, lưu trữ và phóng thích prophenoloxidase. Sau khi cảm nhiễm bởi vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, hệ miễn dịch của tôm bị suy yếu. Điều đó cũng đồng nghĩa với sự biến động tế bào máu theo chiều hướng giảm, đây cũng là triệu chứng bình thường trong quá trình đáp ứng miễn dịch tự nhiên của giáp xác trong trường hợp nhiễm bệnh. Kết quả nghiên cứu của Hsieh & ctv. (2008) đã chứng minh rằng, tổng tế bào máu của tôm thể giảm đáng kể sau khi bị cảm nhiễm bởi vi khuẩn *V. alginolyticus* và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng. Song & ctv. (2003) cũng cho thấy rằng, tổng tế bào máu (bao gồm tế bào hạt) giảm đáng kể sau khi

tôm bị nhiễm Taura syndrome virus. Ở các thời điểm thu mẫu như 72, 96 và 120 giờ, không có sự khác biệt về tổng tế bào máu và tỷ lệ phần trăm tế bào không hạt, tế bào bán hạt và tế bào hạt giữa hai nghiệm thức. Lý giải cho hiện tượng này có thể là do hệ miễn dịch của tôm đã dần phục hồi trở lại. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng gần giống như kết quả nghiên cứu của Hsu & Chen (2007) trên *Penaeus vannamei* cảm nhiễm bởi vi khuẩn *Vibrio alginolyticus*.

3.2.2. Hoạt tính của Phenoloxidase

Phenoloxidase là một enzyme quan trọng trong hệ thống miễn dịch tự nhiên của giáp xác. Enzyme này được kích hoạt bởi một lượng nhỏ các thành phần trong vách tế bào vi khuẩn như lipopolysaccharides (LPS) và β -1,3-glucans từ nấm (Perazzolo & ctv., 1997; Sritunyaluck-sana & ctv., 2000). Khi giáp xác bị mầm bệnh tấn công, enzyme này sẽ được kích hoạt nhằm bất hoạt và ngăn chặn sự lan truyền của tác nhân gây bệnh. Do đó, dựa vào hoạt tính của phenoloxidase, chúng ta có thể đánh giá được quá trình đáp ứng miễn dịch tự nhiên ở giáp xác.

Trong nghiên cứu này, hoạt tính của phenoloxidase ở nghiệm thức gây nhiễm bởi vi khuẩn *V. parahaemolyticus* giảm đáng kể sau 24 và 48 h gây nhiễm và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng ($P < 0,05$), nhưng sau đó ổn định đến hết thời gian thí nghiệm (Hình 3). Nguyên nhân của sự thay đổi này có thể là do hệ thống đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm bị suy yếu. Theo Wang & Chen (2005), hoạt tính phenoloxidase ở tôm thẻ sẽ tăng khi có sự tăng lên của tổng tế bào máu, bao gồm tế bào không hạt và tế bào hạt. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Hsieh & ctv. (2008). Ngoài ra, nghiên cứu của Le Moullac & Haffner (2000) cũng cho thấy rằng, lượng mã hoá enzyme prophenoloxidase giảm đến 60% khi tôm *Litopenaeus stylirostris* bị gây stress bởi yếu tố môi trường (NH_3). Do đó, chúng tôi thiết nghĩ, sự suy giảm hoạt tính phenoloxidase trong nghiên cứu này có thể là kết quả của sự suy giảm lượng mã hoá enzyme prophenoloxidase ở tôm bị nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

3.2.3. Hoạt tính Respiratory burst

Hoạt tính của gốc oxy hoá tự do (respiratory burst) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) giữa nghiệm thức đối chứng và

Bảng 2. Số lượng và tỷ lệ tôm chết ở thí nghiệm xác định LD₅₀

Thời gian thu mẫu (giờ)	Tế bào không hạt ($\times 10^5$ tb/mL)		Tế bào bán hạt ($\times 10^5$ tb/mL)		Tế bào hạt ($\times 10^5$ tb/mL)		Tổng tế bào máu ($\times 10^5$ tb/mL)	
	ĐC	NT	ĐC	NT	ĐC	NT	ĐC	NT
0	30,6 $\pm$ 5,7	28,4 $\pm$ 6,1	7,4 $\pm$ 1,0	8,3 $\pm$ 0,8	5,9 $\pm$ 2,4	4,5 $\pm$ 2,5	43,9 $\pm$ 6,8	41,2 $\pm$ 8,2
24	31,7 $\pm$ 3,5*	26,2 $\pm$ 3,1*	11,0 $\pm$ 0,9*	4,5 $\pm$ 1,6*	6,9 $\pm$ 1,3*	2,7 $\pm$ 1,5*	49,6 $\pm$ 2,9*	33,4 $\pm$ 6,1*
48	30,5 $\pm$ 3,8	24,6 $\pm$ 5,5	10,2 $\pm$ 4,2	4,7 $\pm$ 0,5	6,1 $\pm$ 2,4*	2,1 $\pm$ 0,8*	46,8 $\pm$ 7,4*	31,4 $\pm$ 5,9*
72	40,0 $\pm$ 10,9	33,0 $\pm$ 5,8	5,9 $\pm$ 2,1	7,8 $\pm$ 2,7	5,6 $\pm$ 0,7	4,0 $\pm$ 1,5	51,5 $\pm$ 12,4	44,8 $\pm$ 9,5
96	41,0 $\pm$ 12,3	39,5 $\pm$ 2,3	9,6 $\pm$ 3,1	10,6 $\pm$ 4,1	6,9 $\pm$ 1,7	5,6 $\pm$ 1,4	57,5 $\pm$ 9,5	55,7 $\pm$ 5,5
120	41,0 $\pm$ 9,7	35,5 $\pm$ 4,2	8,4 $\pm$ 4,2	8,3 $\pm$ 3,5	3,5 $\pm$ 0,7	4,1 $\pm$ 0,8	52,9 $\pm$ 12,2	47,9 $\pm$ 7,8

Các giá trị thể hiện trên bảng là số trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Ký hiệu (*) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nghiệm thức ($P < 0,05$).

Hình 3. Sự thay đổi hoạt tính phenoloxidase sau khi tôm bị cảm nhiễm bởi vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

nghiệm thức gây nhiễm bởi vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* ở thời điểm 0 h. Tuy nhiên, sau 24 và 48 giờ gây nhiễm, hoạt tính respiratory burst giảm đáng kể và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng ($P < 0,05$). Ở những thời điểm thu mẫu tiếp theo, không có sự khác biệt về hoạt tính respiratory burst giữa 2 nghiệm thức (Hình 4). Sự khác biệt này có thể là do chức năng miễn dịch tự nhiên của tôm bị suy yếu sau khi tôm bị cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Wang & Chen (2005) đã chứng minh rằng, sự gia tăng hoạt tính respiratory burst là kết quả của sự gia tăng tổng thể bào máu, bao gồm tế bào không hạt và tế bào hạt. Tuy nhiên, hoạt tính của enzyme NADPH-oxidase (giữ vai trò quan trọng trong quá trình giải phóng oxy hoạt hoá superoxide anion) giảm ở tôm bị nhiễm bệnh, kết quả là hoạt tính của respiratory burst cũng giảm.

Hình 4. Sự thay đổi hoạt tính respiratory burst sau khi tôm bị cảm nhiễm bởi vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

4. Kết Luận

Tổng tế bào máu, hoạt tính phenoloxidase và hoạt tính respiratory burst của tôm ở nhóm gây nhiễm bởi vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* được ghi nhận ở thời điểm 24 và 48 giờ có xu hướng giảm và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng. Ở những thời điểm thu mẫu tiếp theo (72, 96 và 120 giờ) thì không có sự khác biệt giữa hai nghiệm thức. Như vậy, khả năng đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thẻ *Penaeus vannamei* bị suy yếu sau khi tôm bị vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* tấn công.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Bachere, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., De Lorgeril, J., Garnier, J., & Romestand, B. (2004). Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews* 198, 149-168.
- Dang, O. T. H., Le, T. H., & Nguyen, P. T. (2012). Optimization and application of protocols for immune response analysis in *Macrobrachium rosenbergii*. *Can Tho University Journal of Science* 21b, 10-18.
- Dantas-Lima, J. J., Vo, T. V., Corteel, M., Grauwet, K., An, N. T. T., Sorgeloos, P., & Nauwynck, H. J. (2013). Separation of *Penaeus vannamei* haemocyte subpopulations by iodixanol density gradient centrifugation. *Aquaculture* 408-409, 128-135.
- Hansen (2000). *Use of a hemacytometer*. Laboratory procedures, Department of Animal Sciences, University of Florida, Florida, USA.
- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., & Vargas-Albores, F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comparative Biochemical Physiology* 113C (1), 61-66.
- Hrubec, C. T., Cardinale, J. L., & Smith, S. A. (2000). Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Veterinary Clinical Pathology* 29(1), 7-12.
- Hsieh, S. L., Ruan, Y. H., Li, Y. C., Hsieh, P. S., Hu, C. H., & Kuo, C. M. (2008). Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture* 275(1-4), 335-341.
- Hsu, S. W., & Chen, J. C. (2007). The immune response of white shrimp *Penaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under sulfide stress. *Aquaculture* 271(1-4), 61-69.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191(1-3), 45-52.
- Jose, S., Mohandas, A., Philip, R., & Bright Singh, I. S. (2010). Primary hemocyte culture of *Penaeus monodon* as an *in vitro* model for white spot syndrome

- virus titration, viral and immune related gene expression and cytotoxicity assays. *Journal of Invertebrate Pathology* 105(3), 312-321.
- Le Moullac, G., & Haffner, P. (2000). Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191(1-3), 121-131.
- Lee, C. T., Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., Huang, J. Y., Huang, M. F., Lin, S. J., Chen, C. Y., Lin, S. S., Lightner, D. V., Wang, H. C., Wang, A. H., Wang, H. C., Hor, L. I., & Lo, C. F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A* 112(34), 10798-10803.
- Lightner, D. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology* 106(1), 110-130.
- Liu, C. H., Yeh, S. T., Cheng, S. Y., & Chen, J. C. (2004). The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio* infection in relation with the moult cycle. *Fish & Shellfish Immunology* 16(2), 151-161.
- Lopez-Leon, P., Luna-Gonzalez, A., Escamilla-Montes, R., Flores-Miranda, M. C., Fierro-Coronado, J. A., Alvarez-Ruiz, P., & Diarte-Plata, G. (2016). Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Latin American Journal of Aquatic Research* 44(3), 470-479.
- Matozzo, V., & Marin, M. G. (2010). The role of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda) in immune responses: A first survey. *Fish & Shellfish Immunology* 28(4), 534-541.
- Menz, A., & Blake, B. F. (1980). Experiments on the growth of *Penaeus vannamei* Boone. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 48(2), 99-111.
- Perazzolo, L. M., & Barracco, M. A. (1997). The phenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Developmental Comparative Immunology* 21, 385-395.
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Hygiene* 27(3), 493-497.
- Robertson, P. A. W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J. R., Zherdmant, M., & Austin, B. (1998). Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organism* 32(2), 151-155.
- Söderhäll, K., & Smith, V. J. (1983). Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and phenoloxidase distribution. *Developmental & Comparative Immunology* 7(2), 229-239.
- Song Y. L., & Hsieh Y. T. (1994). Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology* 18(3), 201-209.
- Song, Y. L., Yu, C. I., Lien, T. W., Huang, C. C., & Lin, M. N. (2003). Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology* 14(4), 317-331.
- Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. (2000). The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191, 53-69.
- Thakur, A. B., Vaidya, R. B., & Suryawanshi S. A. (2003). Pathogenicity and antibiotic susceptibility of *Vibrio* species isolated from moribund shrimps. *Indian Journal of Marine Sciences* 32(1), 71-75.
- Tran, L. H., Nunan, L., Redman, R.M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organism* 105(1), 45-55.
- Tseng, I. T., & Chen, J. C. (2004). The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish & Shellfish Immunology* 17(4), 325-333.
- Van de Braak, C., Faber, R., & Boon, J. H. (1996). Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) haemolymph. *Comparative Haematology International* 6(4), 194-203.
- Vo, T. V., Dantas-Lima, J. J., Khuong, T. V., Li, W., Grauwet, K., Bossier, P., & Nauwynck, H. J. (2015). Differences in uptake and killing of pathogenic and non-pathogenic bacteria by haemocyte subpopulations of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei*, (Boone). *Journal of Fish Diseases* 39(2), 163-174.
- Wang, L. U., & Chen, J. C. (2005). The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. *Fish & Shellfish Immunology* 18(4), 269-278.
- Zorriezhahra, M., & Banaederakhshan, R. (2015). Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. *Advances in Animal Veterinary Sciences* 3(2s), 64-72.