

Assessment of the immune responses of macrophages in selective breeding pangasius families (*Pangasianodon hypophthalmus*) resistant to enteric septicemia of catfish (ESC)

Dung T. P. Tran^{1,3*}, Sang V. Nguyen², Phuong H. Vo², Phuc H. Tran²,
Quan T. T. Huynh³, & Thinh H. Nguyen³

¹Faculty of Biology, Ho Chi Minh City University of Education, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Research Institute for Aquaculture No. 2, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Faculty of Fisheries, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: July 09, 2021

Revised: August 23, 2021

Accepted: August 30, 2021

Keywords

Edwardsiella ictaluri

Enteric Septicemia of Catfish (ESC) resistance

Melano-macrophages

Pangasius

*Corresponding author

Tran Thi Phuong Dung

Email: dungttp@hcmue.edu.vn

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the non-specific immune responses of macrophages in two selective breeding pangasius family groups: high disease-resistant (A) and low disease-resistant (B) to Enteric Septicemia of Catfish (ESC) caused by *Edwardsiella ictaluri*. Fish were sampled at five different time points after infection with the bacteria *E. ictaluri* including before the infection process, 24 hpi, 48 hpi, 264 hpi and 312 hpi. There were 372 samples including 192 samples of fish in group A and 180 samples in group B. All of them were used to analyze the amount of melano-macrophage centers in the tissues of liver, kidney and spleen; phagocytosis activity (PA) and phagocytosis index (PI) of the anterior kidney macrophages. Results showed that (1) the number of melano-macrophages of group A fish was higher than that of group B at survey points during the challenge and the difference was significant at 48 hpi; (2) PA and PI of group A were higher than those of group B in the period from 48 to 264 hpi, specifically, the PI of group A was higher than that of group B, which was statistically significant at 48 hpi. The results of this study showed that the differences in non-specific immune responses through melano-macrophages can improve the survival rate and life span of the high disease-resistant family compared to the low disease-resistant family after the challenge with *Edwardsiella ictaluri*.

Cited as: Tran, D. T. P., Nguyen, S. V., Vo, P. H., Tran, P. H., Huynh, Q. T. T., & Nguyen, T. H. (2021). Assessment of the immune responses of macrophages in selective breeding pangasius families (*Pangasianodon hypophthalmus*) resistant to enteric septicemia of catfish (ESC). *The Journal of Agriculture and Development* 20(5), 28-38.

Đánh giá đáp ứng miễn dịch của đại thực bào trong các gia đình cá tra chọn giống (*Pangasianodon hypophthalmus*) kháng bệnh gan thận mủ

Trần Thị Phương Dung^{1,3*}, Nguyễn Văn Sáng², Võ Hồng Phương², Trần Hữu Phúc²,
Huỳnh Thị Trúc Quân³ & Nguyễn Hữu Thịnh³

¹Khoa Sinh Học, Trường Đại Học Sư Phạm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

²Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản II, TP. Hồ Chí Minh

³Khoa Thủy Sản, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 09/07/2021

Ngày chỉnh sửa: 23/08/2021

Ngày chấp nhận: 30/08/2021

Từ khóa

Cá tra

Đại thực bào

Edwardsiella ictaluri

Kháng bệnh gan thận mủ

*Tác giả liên hệ

Trần Thị Phương Dung

Email: dungttp@hcmue.edu.vn

TÓM TẮT

Đáp ứng miễn dịch không đặc của đại thực bào của hai nhóm gia đình cá tra chọn giống kháng bệnh gan thận mủ do *Edwardsiella ictaluri* cao (A) và thấp (B) được đánh giá trong nghiên cứu này. Cá được thu mẫu tại năm thời điểm sau cảm nhiễm với *Edwardsiella ictaluri* gồm ngay trước cảm nhiễm, 24, 48, 264 và 312 giờ sau cảm nhiễm (hpi). Tổng số mẫu phân tích số lượng trung tâm đại thực bào tại mô gan, thận và lách, hoạt lực và chỉ số thực bào của đại thực bào của thận trước là 372 bao gồm 192 mẫu của cá thuộc nhóm A và 180 mẫu thuộc nhóm B. Kết quả cho thấy: (1) số lượng trung tâm đại thực bào của cá nhóm A cao hơn nhóm B qua các giai đoạn cảm nhiễm và sự khác biệt có ý nghĩa tại 48 hpi; (2) hoạt lực thực bào PA và chỉ số thực bào PI của cá nhóm A cao hơn nhóm B từ giai đoạn 48 đến 264 hpi, riêng chỉ số thực bào PI nhóm A cao hơn nhóm B có ý nghĩa thống kê tại thời điểm 48 hpi. Các kết quả của nghiên cứu này cho thấy sự khác biệt về đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu thông qua đại thực bào đã giúp nâng cao tỉ lệ sống và thời gian sống của gia đình kháng bệnh cao so với các gia đình kháng bệnh thấp sau khi cảm nhiễm với *Edwardsiella ictaluri*.

1. Đặt Vấn Đề

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là loài cá nuôi nước ngọt quan trọng (Phan & ctv., 2009), chiếm đến 52% tổng sản lượng thủy sản xuất khẩu của Việt Nam. Cá tra được Thủ tướng Chính phủ phê duyệt tại Quyết định số 439/QĐ-TTg là đối tượng chủ lực chỉ sau cây lúa để tái cơ cấu nền nông nghiệp của Việt Nam (LDSC, 2019). Trong năm 2019, các sản phẩm từ cá tra đã được xuất khẩu đến 127 quốc gia trên thế giới và đạt kim ngạch hơn 1,9 tỉ USD (DOF, 2020). Tuy nhiên, một trong những khó khăn của nghề nuôi cá tra hiện nay là thiệt hại do dịch bệnh gan thận mủ (GTM). Bệnh xuất hiện hầu như ở mọi kích cỡ cá nhưng nhiều nhất ở cá nuôi dưới 4 tháng tuổi (Ly, 2008). Các phương pháp phòng và trị bệnh có thể hiệu quả hơn trên cơ sở khả năng kháng bệnh tự nhiên ở cá được cải thiện. Hiện

nay có nhiều phương pháp phòng và trị bệnh do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* (*E. ictaluri*) như sử dụng kháng sinh để chữa bệnh cho cá bị nhiễm vi khuẩn, tăng sức đề kháng cho cá tra thông qua bổ sung chất kích thích miễn dịch vào thức ăn. Tuy nhiên, việc sử dụng nhiều kháng sinh trong nghề nuôi thủy sản ở Việt Nam đã và đang làm tăng chi phí sản xuất, giảm khả năng cạnh tranh ở những thị trường nhập khẩu khó tính và ảnh hưởng tới vấn đề quan tâm toàn cầu là an toàn vệ sinh thực phẩm. Tăng sức đề kháng cho cá bằng chất kích thích miễn dịch phải tiến hành lâu dài và mang lại hiệu quả chưa cao. Do đó, chọn giống kháng bệnh vẫn là giải pháp tối ưu cho hướng phát triển bền vững các đối tượng cá nuôi. Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II đã chọn lọc và thành lập quần thể cá tra bố mẹ G0 kháng bệnh GTM có hiệu quả chọn lọc kháng bệnh ước tính là 8,3% (Trình & ctv., 2016). Từ

đó, thể hệ G1 đã được tiếp tục chọn lọc cho mục tiêu sản xuất cá tra kháng bệnh.

Chọn giống kháng bệnh có thể cải thiện được khả năng đáp ứng miễn dịch qua các kết quả trong nghiên cứu của Camp & ctv. (2000). Nghiên cứu này cho thấy số lượng trung tâm đại thực bào, tế bào lympho T có sự khác biệt giữa hai nhóm gia đình chọn giống miễn cảm và kháng bệnh trên cá nhéo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) trong quá trình cảm nhiễm *E. ictaluri*. Trong đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu, khả năng thực bào của đại thực bào được đánh giá cao hơn rất nhiều so với bạch cầu trung tính hay bạch cầu đơn nhân. Đại thực bào có khả năng thực bào tế bào đã chết, mô hoại tử, vi khuẩn và ký sinh trùng (Shoemaker & ctv., 1997; Ferguson, 2006; Jeney, 2017). Tran & ctv. (2020) đã công bố về hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh GTM ở quần thể cá tra chọn giống thể hệ thứ nhất (G1) trong quá trình cảm nhiễm đối với *E. ictaluri*. Tuy nhiên, sự khác biệt trong cơ chế miễn dịch không đặc hiệu thể hiện qua số lượng và khả năng thực bào của các đại thực bào giữa các gia đình cá tra kháng bệnh cao và thấp chưa được đề cập. Nghiên cứu này có mục đích làm sáng tỏ sự khác biệt về đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu thông qua so sánh về số lượng trung tâm đại thực bào và khả năng thực bào của hai nhóm gia đình cá tra chọn giống G1 kháng bệnh GTM.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Cá và chủng vi khuẩn thí nghiệm

Cá tra bố mẹ là quần thể ban đầu cho chọn giống kháng bệnh gan thận mủ G0 được thành lập trong đề tài nghiên cứu giai đoạn 2012 – 2015 tại Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II với hệ số di truyền và hiệu quả chọn lọc ước tính là 0,37 và 8,3%. Cá hương và cá giống quần thể thể G1 (trọng lượng trung bình theo thứ tự $0,16 \pm 0,10$ và $21,17 \pm 8,39$ g/con) được sử dụng trong nghiên cứu này.

Chủng vi khuẩn dùng cho các thí nghiệm cảm nhiễm là *E. ictaluri* Gly09M phân lập từ cá tra bệnh GTM nuôi tại An Giang năm 2009. Độc lực của chủng vi khuẩn được hồi phục bằng cách gây nhiễm và tái phân lập từ cá tra khỏe mạnh ba lần trước khi sử dụng cho thí nghiệm. Vi khuẩn gây cảm nhiễm được phục hồi trên môi trường thạch máu cừu ở trong tủ ẩm 48 giờ ở 28°C, sau đó chọn một đến hai khuẩn lạc nuôi tăng sinh trong môi trường BHIB (BHI Broth), lắc 85 rpm

trong 24 giờ. Xác định mật độ vi khuẩn bằng máy so màu quang phổ DNA SmartSpec Plus ở bước sóng 550 nm ($OD = 1$ tương ứng với mật độ vi khuẩn là $1,2 \times 10^9$ CFU/mL) kết hợp với phương pháp đếm số khuẩn lạc phát triển trên môi trường TSA (CFU/mL).

2.2. Ước tính giá trị chọn giống của cá G1 nhằm xác định nhóm gia đình cá kháng bệnh cao và thấp

2.2.1. Thí nghiệm cảm nhiễm cá hương và cá giống G1

Cá hương: 1.650 cá thuộc 33 gia đình cá hương được gây nhiễm *E. ictaluri* bằng phương pháp ngâm đến hết thời gian thí nghiệm, phù hợp với các kích thước nhỏ (Jeney, 2017). Cá trong từng gia đình được cảm nhiễm trong bể riêng 30 L với 50 cá/bể (mật độ cá trong bể là 1 cá/0,4 lít nước) và nhiệt độ nước 26 - 28°C. Liều gây nhiễm 10^5 CFU/mL từ thí nghiệm thăm dò. Các chỉ tiêu pH, NH_3 , nhiệt, oxy hòa tan trong nước được kiểm tra 24 giờ một lần vào lúc 7 giờ sáng. Ghi nhận biểu hiện lâm sàng, bệnh tích, số lượng cá chết 3 giờ/lần trong suốt 504 giờ sau khi gây nhiễm.

Cá giống: 1.361 cá (đã được đánh dấu PIT) thuộc 33 gia đình cá giống được gây nhiễm theo phương pháp của Trinh & ctv. (2016). Tất cả cá thí nghiệm được nuôi trong cùng một bể lót bạt có sục khí, diện tích mỗi bể là 16 m² với mật độ 1 cá/3,9 lít nước và nhiệt độ 26 - 28°C. Cá thí nghiệm được nuôi chung với cá đã được gây nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* bằng phương pháp tiêm xoang bụng với liều 2×10^5 CFU/cá. Tỷ lệ cá thí nghiệm: cá được gây nhiễm trong bể là 65% và 35% từ thí nghiệm thăm dò. Ngày thứ hai sau khi nuôi chung cá thí nghiệm và cá nhiễm bệnh GTM, vi khuẩn *E. ictaluri* được cho vào nước 1 lần duy nhất để bể thí nghiệm đạt mật độ 10^5 CFU/mL. Thí nghiệm không thay nước và không cho cá ăn. Việc quản lý chất lượng nước và ghi nhận biểu hiện bệnh, số lượng cá chết được thực hiện tương tự như trong thí nghiệm với cá hương.

2.2.2. Ước tính giá trị chọn giống của cá G1

Tính trạng kháng bệnh cao và thấp (biến nhị phân) của các cá thể trong thí nghiệm cảm nhiễm được mã hóa: cá thể thuộc gia đình kháng bệnh cao là 1 và thuộc gia đình kháng bệnh thấp là 0. Dựa vào tình trạng sống/chết của các cá thể trong mỗi gia đình, thông tin phả hệ G0, nghiên cứu

này sử dụng mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể tính toán giá trị chọn giống ước tính (Estimated breeding value - EBV) của từng gia đình. Mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể ước tính giá trị chọn giống của các gia đình cá hương và cá giống được thực hiện bằng phần mềm ASReml v3 (Gilmour & ctv., 2014). Giá trị chọn giống của các gia đình cá được ước tính tại giai đoạn tổng số cá sống còn 50% trong giai đoạn cảm nhiễm (Gjøen & ctv., 1997).

Đối với cá hương: Mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể được dùng để ước tính các thành phần phương sai (bao gồm σ_A^2 = phương sai di truyền cộng gộp, σ_E^2 là phương sai số dư và phương sai kiểu hình $\sigma_P^2 = \sigma_A^2 + \sigma_E^2$ là: $y_{ij} = \mu + \beta_1 \times \text{tuổi cảm nhiễm}_i + \text{cá thể}_j + e_{ij}$. Trong đó: y_{ij} là tình trạng (sống hoặc chết) của cá thể j khi kết thúc thí nghiệm cảm nhiễm, μ là trung bình tỉ lệ sống của quần thể cá thí nghiệm, β_1 là hệ số hồi quy của hiệp biến “tuổi cảm nhiễm = 27 ngày”, cá thể j là ảnh hưởng ngẫu nhiên của cá thể j và e_{ij} là ảnh hưởng của số dư.

Đối với cá giống: Mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể được dùng để ước tính các thành phần phương sai (bao gồm σ_A^2 = phương sai di truyền cộng gộp, σ_E^2 là phương sai số dư và phương sai kiểu hình $\sigma_P^2 = \sigma_A^2 + \sigma_E^2$ là: $y_{ijk} = \mu + \beta_1 \times \text{tuổi đánh dấu}_i + \text{bể}_j + \text{cá thể}_k + e_{ijk}$. Trong đó: y_{ijk} là tình trạng (sống hoặc chết) của cá thể k khi kết thúc thí nghiệm cảm nhiễm, μ là trung bình tỉ lệ sống của quần thể cá thí nghiệm, β_1 là hệ số hồi quy của hiệp biến “tuổi đánh dấu (từ 145 - 209 ngày tùy gia đình)”, bể j là ảnh hưởng cố định hai bể thí nghiệm (bể 1 hoặc bể 2), cá thể k là ảnh hưởng ngẫu nhiên của cá thể k và e_{ijk} là ảnh hưởng của số dư.

Đường biểu diễn Kaplan-Meier thể hiện nguy cơ tử vong giữa hai nhóm cá kháng bệnh cao và thấp (Trinh & ctv., 2016) được thực hiện bằng phần mềm STATA v.14.0.

2.3. Thí nghiệm cảm nhiễm hai nhóm gia đình cá kháng bệnh đánh giá khả năng thực bào của đại thực bào

2.3.1. Thí nghiệm cảm nhiễm trên 6 gia đình cá giống G1

Sáu gia đình cá giống G1 (3 gia đình có EBV cao và 3 gia đình có EBV thấp ở hai giai đoạn cá hương và cá giống) được cảm nhiễm *E. ictaluri* với cách thức cảm nhiễm tương tự như thí nghiệm cảm nhiễm trên cá giống được đề cập ở mục 2.2.1.

Mỗi gia đình 30 cá trong bể 90 L. Cá được thu mẫu để phân tích tại các thời điểm ngay trước khi cảm nhiễm, 24, 48, 264 và 312 giờ sau cảm nhiễm (hpi). Tổng số mẫu phân tích số lượng trung tâm đại thực bào, hoạt lực và chỉ số thực bào của đại thực bào là 372 bao gồm 192 mẫu của cá thuộc nhóm gia đình kháng bệnh cao và 180 mẫu cá thuộc nhóm gia đình kháng bệnh thấp.

2.3.2. Xác định số lượng trung tâm đại thực bào ở mô gan, thận, lách

Phương pháp xác định tổng số lượng trung tâm đại thực bào ở ba mô gan, thận, lách được tiến hành theo Camp & ctv. (2000) như sau: (1) nhuộm HE lát cắt mô; (2) quan sát mẫu trên kính hiển vi quang học với vật kính 40X tại 5 vùng thị kính (4 góc và chính giữa lát cắt mô); (3) tính số lượng trung tâm đại thực bào ở mỗi mô (gan; thận; lách) bằng tổng số lượng đại thực bào trong 5 vùng thị kính; (4) tính số lượng trung tâm đại thực bào ở mỗi mô gan, thận, lách; (5) Tổng trung tâm đại thực bào ở ba mô = trung tâm đại thực bào ở gan + trung tâm đại thực bào ở thận + trung tâm đại thực bào ở lách.

2.3.3. Khả năng thực bào của đại thực bào

Phương pháp xác định khả năng thực bào của đại thực bào được thực hiện theo Paredes & ctv. (2013) có hiệu chỉnh như sau: thu mẫu thận trước, nghiền nát thận trước và rửa qua dung dịch RPMI+Heparin. Sau đó hút dung dịch chứa đại thực bào cho vào vòng tròn được vẽ sẵn bằng bút pap có đường kính bằng chiều rộng lam kính. Ủ ấm 28°C trong 60 phút cho đại thực bào bám vào lam kính. Sau khi rửa nhẹ nhàng lame kính bằng dung dịch Hank, hút 150 μ L dung dịch chứa nấm men (đã được nhuộm bằng thuốc nhuộm congo red) nhỏ vào trong mỗi vòng. Ủ trong 2 giờ để hoạt động thực bào diễn ra. Rửa lame kính với dung dịch PBS (Phosphate Buffer Saline) gồm 13,8g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 17,82 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và 8,5g/L NaCl trong 1 lít nước sao cho pH 7,2 sau đó cố định mẫu lần lượt bằng methanol 100% và 70%. Sau cùng nhuộm lam kính bằng thuốc nhuộm Giemsa. Quan sát dưới kính hiển vi vật kính 100X. Công thức tính hoạt lực thực bào theo Paredes & ctv. (2013) và chỉ số thực bào theo Park & ctv. (2020):

$$PA = \frac{\text{Số tế bào thực bào đã thực bào nấm men}}{\text{Số tế bào thực bào}} \times 100$$

Bảng 1. Chất lượng môi trường nước của bể thí nghiệm trong quá trình cảm nhiễm

STT	Chỉ tiêu	Cá hương	Cá giống
1	pH	7,56 ± 0,17	7,90 ± 0,83
2	NH ₃ (mg/L)	0,06 ± 0,03	0,80 ± 0,21
3	Oxy hòa tan (mg/L)	4,71 ± 0,48	4,08 ± 1,52
4	Nhiệt độ (°C)	26,08 ± 0,80	26,80 ± 1,60

Chất lượng môi trường nước về các chỉ tiêu như pH, NH₃, oxy hòa tan và nhiệt độ trong các bể thí nghiệm cảm nhiễm ở giai đoạn cá hương và cá giống đều được duy trì trong khoảng phát triển bình thường của cá tra.

$$PI = \frac{\text{Số tế bào nấm men đã bị thực bào}}{\text{Số tế bào thực bào nấm men}} \times \frac{PA}{100}$$

PA (Phagocytic activity, %): hoạt lực thực bào

PI (Phagocytic index, nấm men/tế bào đại thực bào): chỉ số thực bào

2.3.4. Xử lý số liệu

Kiểm định Logrank được dùng để chỉ ra khác biệt nguy cơ tử vong giữa hai nhóm cá kháng bệnh. Số liệu về khả năng thực bào của đại thực bào của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp tại mỗi thời điểm được kiểm tra xác suất của phân phối chuẩn bằng thử nghiệm Skewness và Kurtosis. Kiểm định trung bình t - test hai nhóm độc lập được sử dụng để so sánh giá trị trung bình của các biến tại mỗi thời điểm giữa hai nhóm gia đình. Phân tích sự khác biệt giữa hai nhóm gia đình kháng bệnh được thực hiện trên phần mềm SPSS v.20.0 với mức ý nghĩa được sử dụng để kiểm định sai khác có ý nghĩa là 0,05.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Ước tính giá trị chọn giống của cá G1 nhằm xác định nhóm gia đình cá kháng bệnh cao và thấp

3.1.1. Chất lượng môi trường nước trong quá trình cảm nhiễm

Chất lượng môi trường nước của bể thí nghiệm trong quá trình cảm nhiễm thể hiện ở Bảng 1.

3.1.2. Tỷ lệ chết của các gia đình cá chọn giống giai đoạn cá hương và cá giống

Qua Hình 1 cho thấy các gia đình cá hương bắt đầu chết vào 144 giờ (ngoại trừ gia đình số 1 chết từ giai đoạn 24 giờ) và chết nhiều nhất từ 168 - 264 giờ sau cảm nhiễm. Kết thúc thí nghiệm, tỷ lệ chết trung bình của 33 gia đình cá hương là 93%. Các gia đình cá giống bắt đầu chết vào 24 giờ và chết nhiều nhất từ 48 - 192 giờ sau

cảm nhiễm. Một số gia đình vẫn tiếp tục chết nhiều đến thời điểm 432 giờ sau cảm nhiễm. Kết thúc thí nghiệm, tỷ lệ chết trung bình của 33 gia đình cá giống là 100%. Thời gian sống trung bình trong quá trình thí nghiệm của 33 gia đình cá hương là 247,14 ± 50,62 giờ và của 33 gia đình cá giống là 137,62 ± 34,02 giờ.

3.1.3. Ước tính giá trị chọn giống của 33 gia đình cá hương và cá giống G1

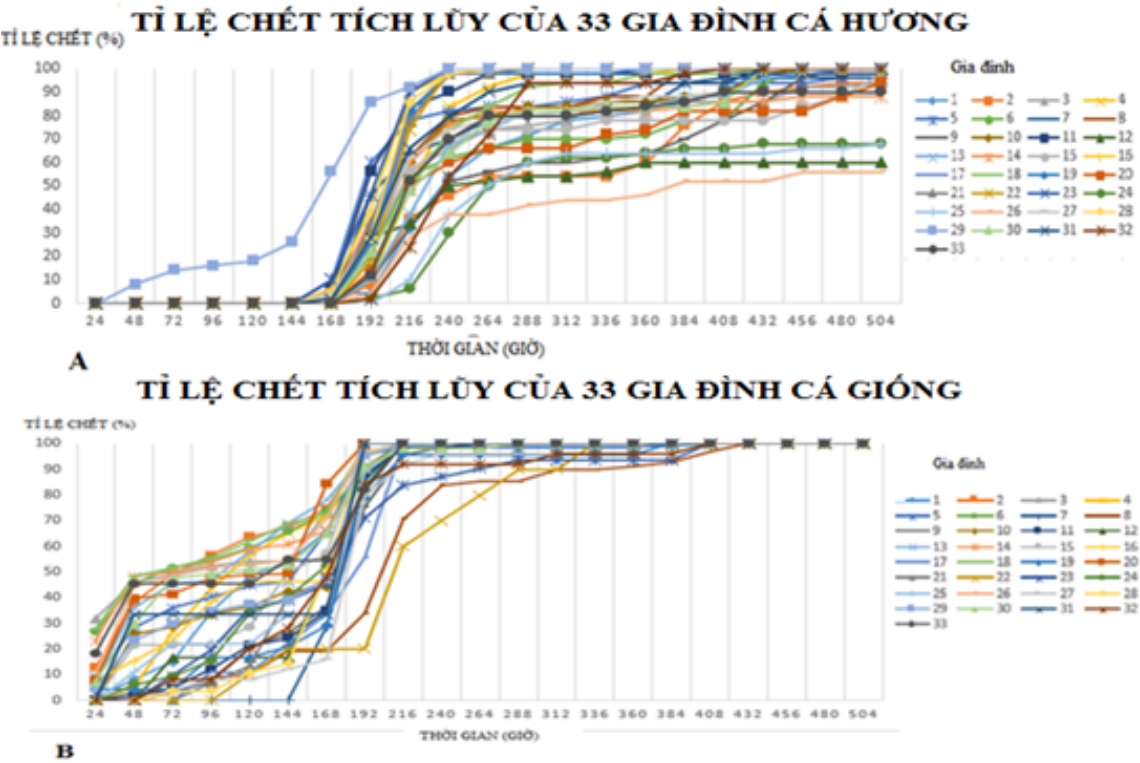
Kết quả ước tính EBV của 33 gia đình cá hương và cá giống được trình bày tại Bảng 2.

Theo nghiên cứu Gjøsøen & ctv. (1997), giai đoạn tỷ lệ cá chết 50% sau cảm nhiễm thường được lựa chọn để tính toán thông số di truyền vì một số ít gia đình không còn cá thể sống đến giai đoạn tỷ lệ chết 75% hay cuối thí nghiệm dẫn đến làm sai lệch kết quả trong việc ước tính thông số di truyền. Ngoài ra, giai đoạn chết 50% còn tối đa hóa phương sai kiểu hình tính trạng kháng bệnh (nhị phân) giúp việc ước tính chính xác hơn (Pham & ctv., 2020). Nghiên cứu của Trinh & ctv. (2019) cho thấy việc ước tính các thông số di truyền kháng bệnh trong giai đoạn đầu của quá trình cảm nhiễm sẽ cho kết quả khả quan hơn. Vì vậy, nghiên cứu này dựa vào giá trị chọn giống ước tính tại giai đoạn cắt ngang 50% tỷ lệ cá chết để xác định những gia đình kháng bệnh cao hay thấp. Kết quả dựa vào xếp hạng trung bình EBV của các gia đình tại hai giai đoạn chọn hai nhóm cá kháng bệnh cao và thấp (nhóm kháng bệnh cao: EBV các gia đình đều cao ở hai giai đoạn và chủ yếu là giai đoạn cá giống và nhóm kháng bệnh thấp tương tự EBV thấp ở hai giai đoạn). Trong 33 gia đình, nghiên cứu đã chọn được 3 gia đình kháng bệnh cao (giá trị EBV tại giai đoạn cá hương, cá giống lần lượt là 0,18, 0,03, -0,05; 0,07, 0,05, 0,06) và 3 gia đình kháng bệnh thấp (giá trị EBV tại giai đoạn cá hương, cá giống lần lượt là -0,24, -0,26, 0,04 và -0,05, 0,03, -0,03) để so sánh đáp ứng miễn dịch. Các gia đình này có thứ tự xếp hạng giá trị chọn giống ước tính sắp

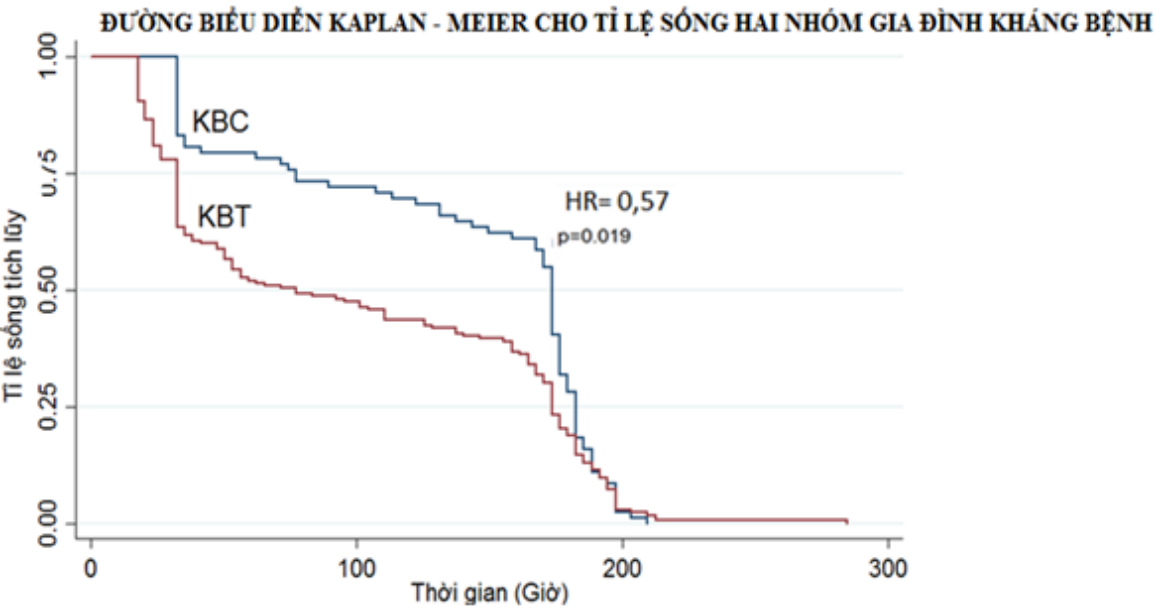
Bảng 2. Giá trị EBV trung bình của 33 gia đình cá hương và cá giống¹

STT*	Cá hương	Cá giống	Trung bình	STT*	Cá hương	Cá giống	Trung bình
1	-0,26	-0,05	-0,16	18	0,02	-0,05	-0,02
2	-0,09	-0,06	-0,08	19	-0,29	0,09	-0,10
3	-0,01	-0,03	-0,02	20	-0,11	-0,09	-0,10
4	-0,33	-0,12	-0,23	21	0,06	0,00	0,03
5	0,43	-0,06	0,19	22	-0,26	0,07	-0,09
6	-0,24	-0,05	-0,15	23	-0,09	0,02	-0,04
7	0,18	0,07	0,13	24	-0,10	-0,03	-0,07
8	0,25	0,07	0,16	25	0,45	0,05	0,25
9	0,05	0,03	0,04	26	0,28	-0,08	0,10
10	0,03	0,05	0,04	27	-0,09	0,10	0,01
11	0,24	0,08	0,16	28	-0,21	0,01	-0,10
12	-0,07	0,04	-0,02	29	-0,37	0,05	-0,16
13	0,08	-0,11	-0,02	30	0,04	-0,03	0,00
14	-0,26	0,03	-0,12	31	-0,12	0,03	-0,05
15	0,16	0,01	0,09	32	0,31	0,01	0,16
16	0,13	0,04	0,09	33	0,08	0,01	0,05
17	-0,05	0,06	0,01				

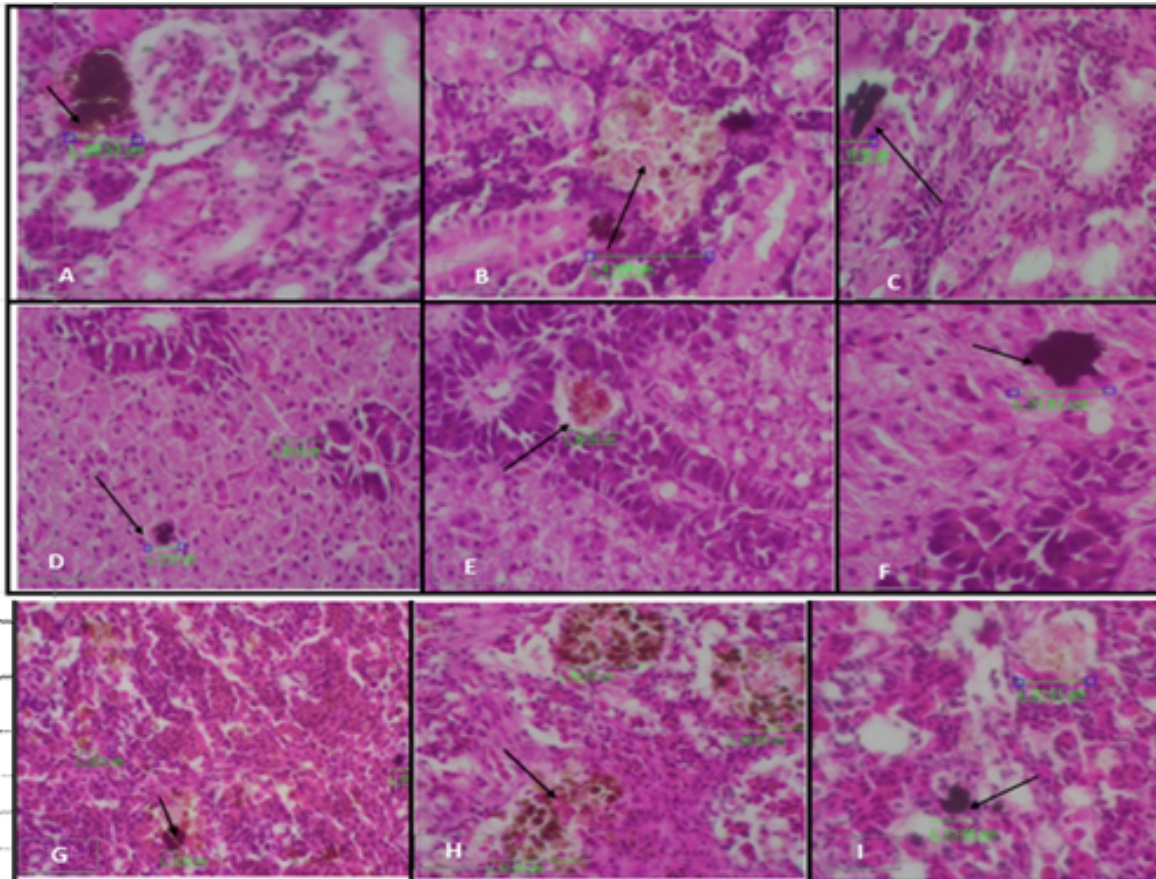
*: Số thứ tự các gia đình trong 33 gia đình cá chọn giống; ¹EBV: Estimated breeding value.



Hình 1. Tỉ lệ chết tích lũy (%) của cá hương (A) và cá giống (B) trong thí nghiệm cảm nhiễm.



Hình 2. Đường biểu diễn Kaplan-Meier cho tỉ lệ sống hai nhóm gia đình kháng bệnh.

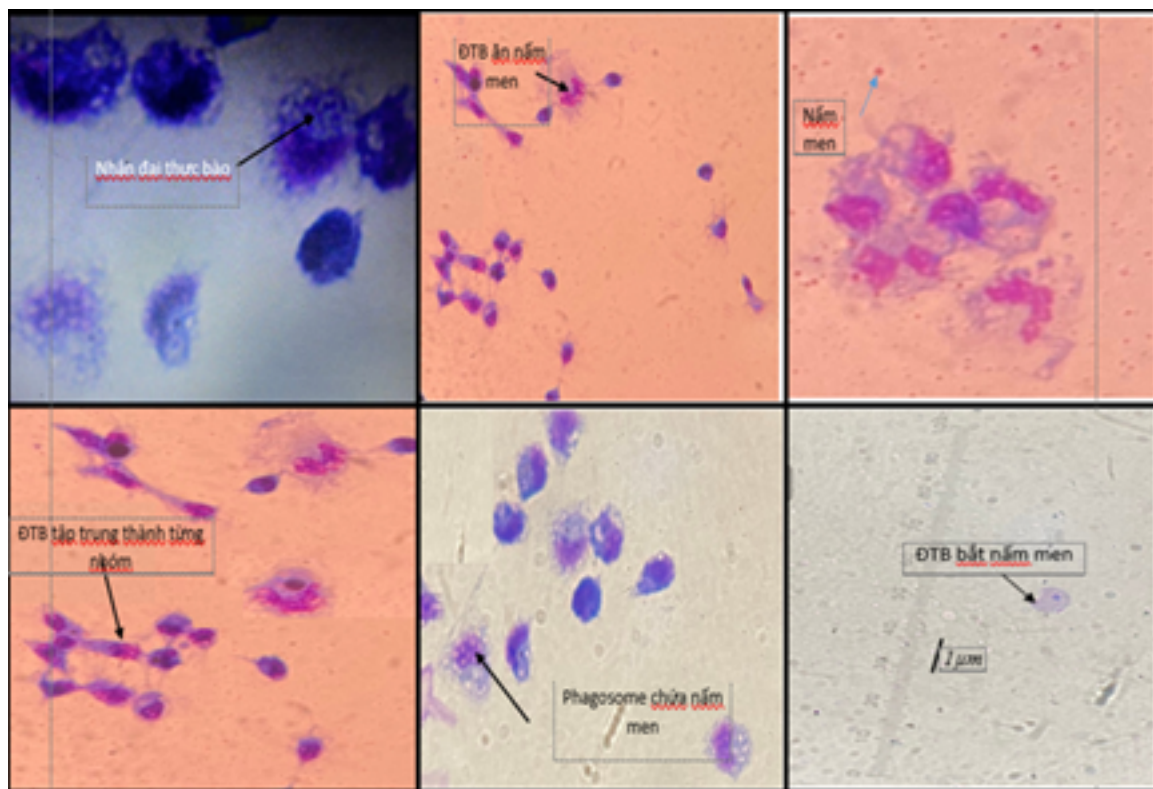


Hình 3. Trung tâm đại thực bào ở mô.

Bảng 3. Giá trị EBV của 6 gia đình kháng bệnh cao và thấp tại hai giai đoạn cá hương và cá giống

Gia đình	STT	Giá trị EBV ¹	Thứ tự EBV ¹	Giá trị EBV ²	Thứ tự EBV ²	EBV TB ^{1,2}	Thứ tự TB EBV ^{1,2}
Kháng bệnh cao	1	0,18	7	0,07	6	0,13	6,5
	2	0,03	15	0,05	9	0,04	12
	3	-0,05	18	0,06	7	0,01	12,5
	4	-0,24	27	-0,05	27	-0,15	27
Kháng bệnh thấp	5	-0,26	29	0,03	15	-0,12	22
	6	0,04	14	-0,03	22	0,00	18

¹: Giai đoạn cá hương; ²: Giai đoạn cá giống; TB: Trung bình; EBV: Estimated breeding value.
Thứ tự xếp hạng theo số thứ tự theo mức kháng bệnh từ cao đến thấp.

**Hình 4.** Đại thực bào nấm men dưới kính vi (100X, 40X, 20X).

xếp theo thứ tự được trình bày tại Bảng 3.

Trung bình thời gian sống trong quá trình cảm nhiễm của nhóm kháng bệnh cao là $153,47 \pm 79,49$ giờ và của nhóm kháng bệnh thấp là $99,95 \pm 72,35$ giờ. Sự khác biệt về thời gian sống hai nhóm kháng bệnh có ý nghĩa thống kê ($P = 0,00$). Tỷ lệ sống tích lũy đến khi kết thúc thí nghiệm của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp đều là 0,0%. Tuy nhiên, qua đường biểu diễn Kaplan - Meier (Hình 2) cho thấy tỷ lệ sống tích lũy của các gia đình kháng bệnh thấp bằng 0,57 của các gia

đình kháng bệnh cao. Nguy cơ tử vong của nhóm kháng bệnh cao thấp hơn nhóm kháng bệnh thấp là khoảng 43% ($HR = 0,57$, $P = 0,019$). Kiểm định Logrank cho thấy sự khác biệt nguy cơ tử vong giữa hai nhóm cá kháng bệnh có ý nghĩa thống kê (giá trị $P = 0,013$). Tóm lại, qua quá trình cảm nhiễm các gia đình kháng bệnh cao có tỷ lệ sống và thời gian sống cao hơn so với các gia đình kháng bệnh thấp. Tuy nhiên, sự khác biệt tỷ lệ sống tích lũy của hai nhóm kháng bệnh cao và thấp chủ yếu thể hiện trong giai đoạn 24 - 200 hpi (Hình 2).

3.2. Khả năng thực bào của đại thực bào của cá thuộc các gia đình kháng bệnh cao và thấp

Trung tâm đại thực bào ở mô gan (A, B, C), thận (D, E, F), lách (G, H, I) và đại thực bào nấm men dưới kính hiển vi (100X, 40X, 20X) thể hiện ở Hình 3 và 4.

Sau khi vượt qua lớp hàng rào phòng vệ bên ngoài cơ thể cá như lớp chất nhầy và biểu mô che phủ mang và da, vi khuẩn sẽ bị thực bào bởi đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính và tế bào giết tự nhiên (Frøystad & ctv, 1998; Evans & ctv, 2001). Sự biến động số lượng trung tâm đại thực bào và khả năng thực bào của đại thực bào trong quá trình cảm nhiễm của cá thuộc hai nhóm gia đình kháng bệnh được trình bày trong Bảng 4. Các kết quả này phản ánh chức năng diệt khuẩn của đại thực bào trong phản ứng viêm hệ thống và đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu (Shoemaker & ctv., 1997). Ngoài việc tăng số lượng trung tâm đại thực bào thì khả năng thực bào (hoạt lực thực bào và chỉ số thực bào) của các loại tế bào bạch cầu cũng đóng vai trò quan trọng trong việc đáp ứng miễn dịch của cá.

Số lượng trung tâm đại thực bào của nhóm kháng bệnh cao (A) tăng từ trước cảm nhiễm (18,79 trung tâm đại thực bào/mô) đến giai đoạn 48 hpi (47,46 trung tâm đại thực bào/mô) sau đó giảm đến giai đoạn 264 hpi (20,16 trung tâm đại thực bào/mô). Đối với nhóm khám bệnh thấp (B), số lượng trung tâm đại thực bào tăng từ trước cảm nhiễm (22,21 trung tâm đại thực bào/mô) đến giai đoạn 24 hpi (54,38 trung tâm đại thực bào/mô) và sau đó giảm đến giai đoạn 312hpi (16,10 trung tâm đại thực bào/mô). Số lượng trung tâm đại thực bào của nhóm A tăng đến 48 hpi trong khi số lượng trung tâm đại thực bào của nhóm B chỉ tăng đến 24 hpi. Nguyên nhân có thể giải thích do đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu với sự tham gia của đại thực bào nhóm A kéo dài hơn đến giai đoạn 48 hpi giúp tăng khả năng sống sót trong giai đoạn đầu của quá trình cảm nhiễm 24 - 48 hpi. Kết quả này tương tự với kết quả trong nghiên cứu của Camp & ctv. (2000) trên cá da trơn kháng *E. ictaluri*. Nhóm cá chọn lọc kháng bệnh tạo ra nhiều trung tâm đại thực bào ở lá lách và thận hơn nhóm cá chưa qua chọn lọc trong quá trình cảm nhiễm.

Hoạt lực thực bào PA của hai nhóm A và B đều tăng từ trước cảm nhiễm đến giai đoạn 312

Bảng 4. Tổng trung tâm đại thực bào ở ba mô (gan, thận, lách) và khả năng thực bào của đại thực bào ở mô thận trước cá thuộc các gia đình kháng bệnh cao và thấp

Chỉ số khảo sát	Nhóm kháng bệnh	Số mẫu	Trước cảm nhiễm	24 hpi	48 hpi	264 hpi	312 hpi
Số lượng trung tâm đại thực bào/mô	Cao	122	18,79 ^{aw} ± 1,34	38,62 ^{by} ± 2,17	47,46 ^{bx} ± 2,14	20,16 ^{azw} ± 1,85	26,08 ^{az} ± 4,38
	Thấp	116	22,21 ^{av} ± 1,69	54,38 ^{ax} ± 2,90	15,50 ^{av} ± 2,6	19,25 ^{av} ± 1,35	16,10 ^{av} ± 2,09
Hoạt lực thực bào PA (%)	Cao	35	51,69 ^{az} ± 10,68	77,11 ^{av} ± 5,45	88,02 ^{ax} ± 6,47	93,33 ^{ax} ± 3,99	93,94 ^{ax} ± 4,12
	Thấp	32	52,36 ^{az} ± 6,34	80,64 ^{av} ± 12,07	85,36 ^{axv} ± 6,63	92,86 ^{axy} ± 4,37	94,45 ^{ax} ± 2,14
Chỉ số thực bào PI (nấm men/tế bào đại thực bào)	Cao	35	1,40 ^{az} ± 0,40	2,55 ^{av} ± 0,79	5,06 ^{ax} ± 0,85	5,55 ^{ax} ± 1,30	5,11 ^{ax} ± 0,84
	Thấp	32	1,54 ^{aw} ± 0,38	3,21 ^{az} ± 1,43	4,00 ^{bxz} ± 0,59	4,76 ^{axv} ± 1,23	5,66 ^{ax} ± 0,61

Các chữ cái a, b trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$ (theo nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp). Các chữ cái x, y, z, w trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.

giờ sau cảm nhiễm (hpi) (nhóm A tăng từ 51,69% lên 93,94% và nhóm B tăng từ 51,69% tăng lên 94,45%). Từ giai đoạn 48 hpi đến 312 hpi, nhóm A có PA cao hơn nhóm B.

Chỉ số thực bào PI của nhóm A tăng từ trước cảm nhiễm (1,40) đến giai đoạn 264 hpi (5,55) sau đó giảm đến giai đoạn 312 hpi (5,11). Đối với nhóm B, chỉ số thực bào PI tăng từ trước cảm nhiễm (1,54) đến giai đoạn 312 hpi (5,66). Chỉ số thực bào PI nhóm A cao hơn nhóm B có ý kiến thống kê tại giai đoạn 48 hpi ($P < 0,05$).

Sự khác biệt về hoạt lực thực bào và chỉ số thực bào giữa hai nhóm A và B thể hiện chủ yếu từ giai đoạn 48 hpi. Điều này có thể giải thích cho khả năng sống sót của cá trong nhóm kháng bệnh cao cao hơn cá trong nhóm kháng bệnh thấp trong giai đoạn đầu cảm nhiễm *E. ictaluri*. Camp & ctv. (2000) đã chỉ ra có sự khác biệt về khả năng thực bào của đại thực bào và sự miễn cảm với vi khuẩn *E. ictaluri* của cá da trơn thuộc các nhóm gia đình kháng bệnh trong giai đoạn từ 3 - 14 ngày sau cảm nhiễm. Trong nghiên cứu này, sự khác biệt về số lượng đại thực bào, hoạt động thực bào, chỉ số thực bào của hai nhóm gia đình cá kháng bệnh thể hiện chủ yếu tại giai đoạn 48 giờ sau cảm nhiễm.

4. Kết Luận

Nghiên cứu này làm rõ sự khác biệt của yếu tố miễn dịch không đặc hiệu là đại thực bào trên hai nhóm gia đình cá tra chọn giống cao và thấp thể hệ G1 trong quá trình cảm nhiễm. Số lượng tổng trung tâm đại thực bào ở ba mô gan, thận, lách, hoạt lực thực bào PA, chỉ số thực bào PI của đại thực bào mô thận trước nhóm kháng bệnh cao lớn hơn nhóm kháng bệnh thấp trong giai đoạn cảm nhiễm, đặc biệt có ý nghĩa thống kê ở giai đoạn 48 giờ sau cảm nhiễm góp phần giúp tăng khả năng kháng bệnh của nhóm kháng bệnh cao hơn so với nhóm kháng bệnh thấp trong giai đoạn đầu của quá trình cảm nhiễm.

Lời Cam Đoan

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

Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu được thực hiện trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu chọn giống cá tra kháng bệnh gan

thận mủ, 2019 – 2020” thuộc chương trình CNSH - Bộ Nông Nghiệp và Phát triển Nông thôn. Chân thành cảm ơn các anh chị tại Trại Nghiên cứu Thực nghiệm Thủy sản Gò Vấp, Trung tâm quan trắc môi trường và bệnh Nam Bộ, Trung tâm Quốc gia Giống Thủy sản Nước ngọt Nam Bộ (thuộc Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II) đã tạo điều kiện cho nhóm nghiên cứu thực hiện thí nghiệm cảm nhiễm.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Camp, K. L., Wolters, W. R., & Rice, C. D. (2000). Survivability and immune responses after challenge with *Edwardsiella ictaluri* in susceptible and resistant families of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Fish & Shellfish Immunology* 10(6), 475–487.
- DOF (Directorate of Fisheries). (2020). Production results of the aquaculture sector in 2019. Retrieved December 23, 2020, from <https://tongcucthuysan.gov.vn/Tin-t%E1%BB%A9c/-Tin-v%E1%BA%AFn/doc-tin/014196?2020-01-15=Banner+002>.
- Evans, D. L., Leary III, J. H., & Jaso-Friedmann, L. (2001). Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity: Regulation by programmed cell death. *Developmental & Comparative Immunology* 25(8-9), 791-805.
- Ferguson, H. W. (2006). *Systemic pathology of fish: A text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease* (2nd ed.). London, UK: Scotian Press Publisher.
- Frøystad, M. K., Rode, M., Berg, T., & Gjøs, T. (1998). A role for scavenger receptors in phagocytosis of protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages. *Developmental & Comparative Immunology* 22(5-6), 533-549.
- Gilmour, A. R., Gogel, B. J., Cullis, B. R., Welham, S. J., Thompson, R., Butler, D., Cherry, M., Collins, D., Dutkowski, G., Harding, S. A., Haskard, K., Kelly, A., Nielsen, S. G., Smith, A., Verbyla, A. P., & White, I. M. S. (2015). *ASReml user guide. Release 4.1 Structural specification*. Hemel Hempstead, UK: VSN International Ltd.
- Gjøs, H. M., Refstie, T., Ulla, O., & Gjerde, B. (1997). Genetic correlations between survival of Atlantic 382 salmon in challenge and field tests. *Aquaculture* 158(3-4), 277-288.
- Jeney, G. (2017). *Fish diseases: Prevention and control strategies* (1st ed.). Massachusetts, USA: Academic Press Publisher.
- LDSC (Lao Cai Department of Science and Technology). (2019). *Application of molecular genetics and quantitative genetics in selective breeding to improve the growth rate of striped catfish (Pangasianodon hypophthalmus)*. Retrieved May 15, 2021, from <https://www.laocai.gov.vn/1241/27929/45172/377382/khoa-hoc-va-doi-song/-ung-dung-di-truyen-phan-tu-va-di-truyen-so-luong-chon-giong-nang-cao-toc-do-sinh-truong-ca-tra->.

- Ly, L. T. T. (2008). *Environmental monitoring and precautions and aquatic diseases in some aquaculture areas in the Mekong River and Southeast region* (research report). Research Institute for Aquaculture No. 2, Ho Chi Minh City, Vietnam.
- Paredes, M., Gonzalez, K., Figueroa, J., & Montiel-Eulefi, E. (2013). Immunomodulatory effect of prolactin on Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage function. *Fish Physiology and Biochemistry* 39(5), 1215-1221.
- Park, Y., Abihssira-García, I. S., Thalmann, S., Wiegertjes, G. F., Barreda, D. R., Olsvik, P. A., & Kiron, V. (2020). Imaging flow cytometry protocols for examining phagocytosis of microplastics and bioparticles by immune cells of aquatic animals. *Frontiers in immunology, research topic: The Function of phagocytes in non-mammals*. Retrieved February 18, 2020, from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00203/full>.
- Pham, K. D., Ødegård, J., Nguyen, S. V., Gjøen, H. M., & Klemetsdal, G. (2020). Genetic analysis of resistance in Mekong striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) to bacillary necrosis caused by *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Fish Diseases* 44(2), 201-210.
- Phan, L. T., Bui, T. M., Nguyen, T. T. T., Gooley, G. J., Ingram, B. A., Nguyen, H. V., Nguyen, P. T., & De Silva, S. S. (2009). Current status of farming practices of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong Delta, Vietnam. *Aquaculture* 296(3-4), 227-236.
- Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., & Plumb, J. A. (1997). Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58(2), 181-190.
- Tran, D. T. P. (2020). Estimation of genetic parameters of enteric septicemia of catfish (ESC) resistance trait of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) at fingerling stage. *Journal of Mekong Fisheries* 18, 3-13.
- Trinh, T. Q., Nguyen, V. T., Ngo, N. H., Nguyen, D. H., Nguyen, D. T., Tran, P. H., & Pham, K. D. (2016). *Breeding striped catfish resisting the bacillary necrosis* (research report). Ministry of Science and Technology, Ha Noi, Vietnam.
- Trinh, T. T., Nguyen, H. H., Nguyen, N. H., Knibb, W., & Nguyen, N. H. (2019). *Genetic Variation in disease resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in Liptopenaeus vannamei*. *Frontiers in genetics. Research Topic: Applications of modern genetics and genomic technologies to enhance aquaculture breeding*. Retrieved March 28, 2019, from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00264/full>.