



DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.119

ẢNH HƯỞNG OXYTETRACYCLIN LÊN ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH TỰ NHIÊN CỦA TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*) CẢM NHIỄM *Vibrio parahaemolyticus*

Trần Việt Tiên và Đặng Thị Hoàng Oanh*

Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đặng Thị Hoàng Oanh (email: dthoanh@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 01/01/2019

Ngày nhận bài sửa: 09/03/2019

Ngày duyệt đăng: 30/08/2019

Title:

Effect of oxytetracycline on immune responses of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with *Vibrio parahaemolyticus*

Từ khóa:

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, Oxytetracycline, tôm thẻ chân trắng, *Vibrio parahaemolyticus*

Keywords:

Acute hepatopancreatic necrosis disease, *Litopenaeus vannamei*, Oxytetracycline, *Vibrio parahaemolyticus*

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate effects of oxytetracycline on immune parameters and susceptibility of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Shrimp (2.8 ± 0.48 g/shrimp) were randomly distributed (30 shrimp/tank) with four treatments (TM) (in triplicate): (TM1) unchallenged control; (TM2) challenged control; (TM3) unchallenged and fed diet coated with oxytetracycline (2 g/kg for 5 days); and (TM4) challenged and fed diet coated with oxytetracycline (for 5 days after challenge). After 14 days challenge, cumulative mortality in TM2 ($48.9 \pm 1.9\%$) was significantly higher ($P < 0.05$) than TM1, TM3 and TM4. Cumulative mortalities of TM3 and TM4 were higher than TM1 ($P < 0.05$) and lower than TM2 ($P < 0.05$). Histological analysis showed typical pathological signs of AHPND in hepatopancreas of challenged shrimp. Total hemocyte count, respiratory bursts, phenoloxidase and superoxide dimutase activities were significant decreased in TM2, TM3 and TM4 after 36 h challenge.

TÓM TẮT

Thí nghiệm được tiến hành để đánh giá ảnh hưởng của oxytetracyclin lên các chỉ tiêu miễn dịch và tính mẫn cảm của tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) với bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND). Tôm ($2,8 \pm 0,48$ g/con) được bố trí ngẫu nhiên (30 con/bể) với bốn nghiệm thức (NT) (lặp lại 3 lần), gồm: (NT1) đối chứng không cảm nhiễm; (NT2) đối chứng cảm nhiễm; (NT3) không cảm nhiễm và thức ăn trộn oxytetracycline (2 g/kg trong 5 ngày) và (NT4) cảm nhiễm và thức ăn trộn oxytetracycline (trong 5 ngày sau cảm nhiễm). Sau 14 ngày cảm nhiễm, tỷ lệ chết tích lũy ở NT2 cao hơn đáng kể ($48,9 \pm 1,9\%$) ($P < 0,05$) so với NT1, NT3 và NT4. Tỷ lệ chết tích lũy ở NT3 và NT4 cao hơn NT1 ($P < 0,05$) và thấp hơn NT2 ($P < 0,05$). Phân tích mô bệnh học gan tụy tôm cảm nhiễm ghi nhận có các dấu hiệu bệnh lý điển hình của AHPND. Tổng tế bào máu, hoạt động của phenoloxidase (PO), superoxide dimutase (SOD) và phóng thích các gốc oxy tự do (RBs) giảm ở NT2, NT3 và NT4 sau 36 giờ cảm nhiễm.

Trích dẫn: Trần Việt Tiên và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2019. Ảnh hưởng oxytetracyclin lên đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) cảm nhiễm *Vibrio parahaemolyticus*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(4B): 148-154.

1 GIỚI THIỆU

Cùng với xu hướng phát triển mạnh của nghề nuôi tôm nước lợ là sự ô nhiễm môi trường và dịch bệnh bùng phát gây tổn thất nặng nề. Trong số các bệnh nguy hiểm, bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* đã gây nhiều thiệt hại cho người nuôi tôm. Bệnh lây lan nhanh và tôm nhiễm bệnh tỷ lệ chết cao. Các biện pháp phòng và trị AHPND ở tôm nuôi được áp dụng hiện nay chủ yếu là kháng sinh, trong đó phổ biến là oxytetracyclin nhưng thường không có hiệu quả.

Không giống ở động vật có xương sống, khả năng đáp ứng miễn dịch là gồm có đáp ứng miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu (miễn dịch tự nhiên), động vật không xương sống (trong đó có tôm) chủ yếu dựa vào miễn dịch không đặc hiệu bao gồm những cơ chế miễn dịch tế bào và miễn dịch thể dịch góp phần vào những phản ứng bảo vệ tôm bằng cách hạn chế sự xâm nhập hoặc làm sạch và giết những mầm bệnh vi sinh xâm nhập vào mô và máu (Yodmuang *et al.*, 2006). Tuy tôm có khả năng đề kháng mầm bệnh vi sinh vật thông qua hệ miễn dịch tự nhiên, nhưng tác nhân gây bệnh vẫn có thể xâm nhiễm và gây ra tỉ lệ chết cao khi hệ miễn dịch bị suy giảm dưới sự tác động của các yếu tố môi trường (Takahasi *et al.*, 1995), trong đó kháng sinh là những nhân tố góp phần làm suy giảm hệ miễn dịch và tăng sự mẫn cảm của tôm với mầm bệnh (Ren *et al.*, 2014).

Trong nghiên cứu này, kết quả về ảnh hưởng của oxytetracyclin lên đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) cảm nhiễm *Vibrio parahaemolyticus* được trình bày nhằm bổ sung thông tin làm cơ sở khoa học cho việc sử dụng kháng sinh hợp lý trong nuôi tôm thẻ chân trắng.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Hệ thống thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện tại trại thực nghiệm, Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy Sản, Trường Đại học Cần Thơ. Tôm được bố trí trong bể nhựa có thể tích 150 L. Các bể nhựa được rửa sạch và khử trùng bằng chlorine rồi phơi khô trước khi sử dụng. Nước dùng trong thí nghiệm có độ mặn 25‰ được khử trùng bằng chlorine (30 ppm) và sục khí liên tục để loại bỏ chlorine trước khi bố trí thí nghiệm và trong suốt thời gian thí nghiệm.

2.2 Tôm thí nghiệm

Tôm thẻ chân trắng PL15 được ương trong hệ thống tuần hoàn tại Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Đền khi tôm đạt kích cỡ trung bình khoảng $2,8 \pm 0,48$ g/con

thì bố trí thí nghiệm. Trước khi bố trí, tôm được kiểm tra bằng phương pháp PCR xác định âm tính với WSSV, MBV và *V. parahaemolyticus*. Sau khi bố trí vào các bể thí nghiệm, tôm được thuần dưỡng 3 ngày rồi mới tiến hành thí nghiệm.

2.3 Chuẩn bị vi khuẩn và gây cảm nhiễm

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp từ bộ sưu tập vi khuẩn của Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ sau khi lấy ra từ tủ -80°C được nuôi trong môi trường nutrient broth (NB, Merck) có bổ sung 1,5% NaCl (NB⁺), ủ ở 28°C trong 18 giờ, sau đó vi khuẩn được cấy sang đĩa tryptic soy agar (TSA, Merck) có bổ sung 1,5% NaCl (TSA⁺) và tiếp tục ủ ở 28°C trong 18 giờ. Ghi nhận màu sắc và hình dạng khuẩn lạc, nhuộm Gram để kiểm tra tính thuần của vi khuẩn. Khuẩn lạc vi khuẩn thuần được nuôi tăng sinh trong môi trường NB⁺ ở 28°C . Sau đó, đo và xác định mật độ vi khuẩn bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 610 nm để xác định mật độ vi khuẩn (CFU/ml). Tôm được gây cảm nhiễm bằng cách ngâm trong dung dịch vi khuẩn (mật độ 10^8 CFU/ml) trong 15 phút. Sau đó cho tôm và dung dịch vi khuẩn vào bể thí nghiệm. Sau 2 ngày cảm nhiễm, siphon đáy bể và thay 50% lượng nước trong bể, sau đó siphon đáy bể 2 ngày/lần, mỗi lần 30% lượng nước trong bể cho đến khi kết thúc thí nghiệm.

2.4 Bố trí và theo dõi thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức (NT), mỗi NT lặp lại 3 lần (mật độ bố trí 30 tôm/bể), gồm có: (NT1) Đối chứng không cảm nhiễm; (NT2) Đối chứng cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*; (NT3) không cảm nhiễm, cho ăn thức ăn trộn oxytetracyclin (2 g/kg thức ăn) liên tục trong 5 ngày; và (NT4) cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, cho ăn thức ăn trộn oxytetracyclin (2 g/kg thức ăn) sau 1 ngày cảm nhiễm.

Thí nghiệm được theo dõi trong thời gian 14 ngày sau cảm nhiễm. Tôm được cho ăn thức ăn Grobest với lượng thức ăn bằng 2% trọng lượng thân (do sau khi cảm nhiễm tôm thường giảm ăn) và cho ăn 4 lần/ngày trong suốt thời gian thí nghiệm 14 ngày. Kháng sinh oxytetracyclin (99%) do công ty TNHH UV Việt Nam cung cấp. Kháng sinh được trộn vào thức ăn rồi áo bằng dầu mực (20 ml dầu mực/kg thức ăn).

Các chỉ tiêu môi trường được đo hàng ngày trong suốt 14 ngày thí nghiệm gồm pH, $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, hàm lượng oxy hòa tan (DO) (đo bằng các bộ test SERA, Đức) và nhiệt độ (đo bằng nhiệt kế). Biểu hiện bệnh lý của tôm và số tôm chết được ghi nhận hàng ngày.

2.5 Phương pháp mô học

Mẫu tôm thí nghiệm (3 tôm/bể) được thu sau 3 ngày sau cảm nhiễm (số tôm thu mẫu phân tích các chỉ tiêu miễn dịch không tính vào tỉ lệ tôm chết tích lũy) để cố định khối gan tụy trong dung dịch Davidson's AFA trong khoảng 48 giờ, sau đó chuyển sang cồn 70° (Lightner, 1996). Mẫu sau khi được cắt tia định hướng thì được xử lý qua các giai đoạn khử nước với các nồng độ cồn tăng dần, làm trong bằng xylen, sau đó tẩm trong paraffin và sáp ong nóng chảy. Mẫu được đem đúc khối, cắt lát, dán lên lame và nhuộm với thuốc nhuộm haematocylene và eosin (H&E). Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi với các vật kính khác nhau và chụp hình tiêu bản đặc trưng.

2.6 Phương pháp xác định các chỉ tiêu miễn dịch

Mẫu tôm (3 tôm/bể/lần thu mẫu) được thu trước khi gây cảm nhiễm và vào ngày 3, 6 và 9 sau khi cảm nhiễm để lấy mẫu phân tích các chỉ tiêu miễn dịch. Số tôm thu mẫu phân tích các chỉ tiêu miễn dịch không tính vào tỉ lệ tôm chết tích lũy.

Tổng tế bào máu (THC) được xác định theo phương pháp của Le Moullac *et al.* (1997). 100 µL máu tôm được thu bằng kim tiêm vô trùng có chứa 900 µl dung dịch chống đông. Số lượng tế bào máu được đếm (lặp lại 2 lần) bằng buồng đếm hồng cầu và quan sát dưới kính hiển vi (40X) và tính bằng công thức: $THC = C * 10 * 5 * 10^3$ (tb/mm³) (C là tổng số tế bào máu trên 5 vùng đếm).

Hoạt tính của phenoloxidase (PO) được xác định theo phương pháp của Herández-López *et al.* (1996). 100 µL mẫu máu pha loãng trong dung dịch chống đông sau khi được ly tâm, loại bỏ phần dịch phía trên, phần tế bào máu được hòa tan trong dung dịch đệm cacodylate-citrate, rồi ủ với 50 µL trypsin (1 mg/ml) trong 10 phút ở 26°C trước khi thêm 50 µL L-DOPA (3 mg/ml) và 800 µl cacodylate buffer. Đo mẫu bằng máy đọc khay vi thể ở bước sóng 490 nm. Mẫu đối chứng gồm 50 µL mẫu, 50 µl cacodylate buffer (thay thế trypsin) và 50 µl L-DOPA và đọc kết quả sau 1 phút.

Hoạt tính phóng thích các gốc oxy tự do (RBs) được xác định theo phương pháp của Song and Hsieh (1994). 50 µL mẫu máu được và 50 µl dung dịch chống đông được làm lắng xuống trong ống eppendorf 200 µL có chứa 100 µL dung dịch poly-

L-lysine (0,2%) để tăng sự kết dính của tế bào. Sau khi ly tâm, loại bỏ phần dịch phía trên, 100 µL zymosan (0,1% trong dung dịch Hanks) được cho vào và để 30 phút ở nhiệt độ phòng thì loại bỏ zymosan. Tế bào máu được rửa 3 lần với 100 µL dung dịch Hanks, nhuộm với 100 µl NBT solution (0,3%) trong 30 phút, loại bỏ NBT solution, sau đó rửa 3 lần với 100 µL methanol (70%) và để khô. Sau đó, mẫu được hòa tan với 120 µL KOH 2M và 140 µL dimethyl sulphoxide và đo bằng máy đọc khay vi thể (Multiskan Ascent 354, USA) ở bước sóng 630 nm. Mỗi mẫu máu được phân tích lặp lại 3 lần.

Hoạt tính của superoxide dismutase (SOD) được xác định theo phương pháp của Beauchamp and Fridovich (1971). 50 µl mẫu máu và 50 µl dung dịch chống đông được cho vào 1 ống eppendorf lạnh có chứa 0,5 ml phosphate buffer (50 mM, pH 7,8). Sau khi ly tâm, phần dịch phía trên được chuyển sang 1 eppendorf mới và ủ 5 phút ở 65°C, tiếp tục ly tâm rồi lấy và chuyển phần dịch phía trên sang 1 eppendorf mới. 0,5 ml dung dịch SOD (0,1 mM EDTA, 13 µM methionine, 0,75 mM Nitro Blue Tetrazolium (NBT) và 20 µM riboflavin trong 50 mM đệm phosphate, pH 7,8) và 100 µl dịch tách chiết thô được được ủ 1 phút dưới ánh sáng huỳnh quang trong máy so màu quang phổ và so màu bằng ở bước sóng 560 nm.

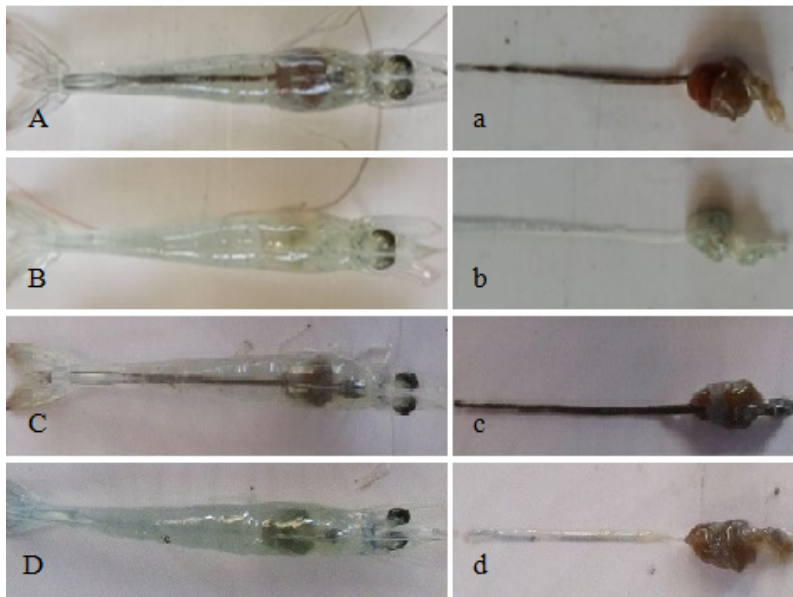
2.7 Xử lý số liệu

Sự khác biệt về tỉ lệ tôm chết tích lũy và các chỉ tiêu miễn dịch giữa các nghiệm thức thí nghiệm được xử lý thống kê ANOVA 1 nhân tố (ở mức ý nghĩa $P < 0,05$) bằng phần mềm SPSS 16.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Dấu hiệu bệnh lý

Ở hai nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (NT2 và NT4), tôm có biểu hiện bệnh sau 24 giờ với dấu hiệu bơi lơ đờ, hoạt động kém, ruột rỗng hoặc chứa thức ăn không liên tục, khối gan tụy của tôm nhạt màu và teo (Hình 1B/b và 1D/d). Các dấu hiệu ghi nhận được tương tự như mô tả của Lightner *et al.* (2012) and Flegel *et al.* (2012) về các dấu hiệu bệnh lý của tôm khi mắc bệnh hoại tử gan tụy cấp tính do *V. parahaemolyticus*. Tôm ở hai nghiệm thức không cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (NT1 và NT3) có màu sắc tươi sáng, khối gan tụy bình thường, ruột đầy thức ăn, phản ứng nhạy với tiếng động (Hình 1A/a và 1C/c).

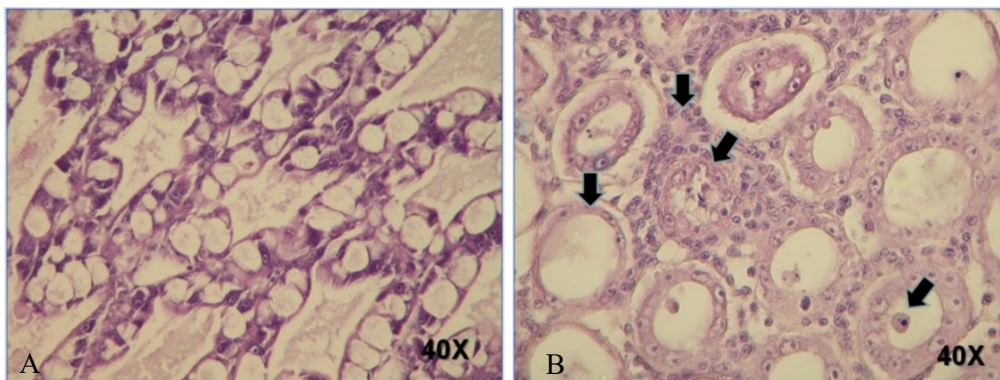


Hình 1: (A/a và C/c): Dấu hiệu bên ngoài và gan tụy của tôm ở các NT1 và NT3, gan tụy và tôm bình thường; (B/b và D/d): Dấu hiệu bên ngoài và gan tụy của tôm ở các NT2 và NT4, gan tụy nhạt màu, ruột rỗng

3.2 Mô bệnh học

Kết quả phân tích mô bệnh học cho thấy ở NT1 và NT3 (không cảm nhiễm), gan tụy với các ống gan tụy bình thường (Hình 2A). Tuy nhiên, ở NT2 và NT4 (cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*) gan tụy tôm có những biến đổi mô bệnh học, đặc trưng là ống gan tụy teo, giảm số lượng B, R và F (Hình 2B), tế bào gan tụy thoái hóa bong tróc rơi vào lòng ống và tế bào máu xuất hiện quanh các cụm vi khuẩn

trong vùng bị hoại tử (Hình 2B). Lightner *et al.* (2012) and Flegel (2012) mô tả chi tiết đặc điểm mô bệnh học đặc trưng của bệnh hoại tử gan tụy cấp tính là sự thoái hóa cấp tính của gan tụy, kèm theo sự giảm hoạt động của tế bào E, rối loạn chức năng của các tế bào B, F và R, dễ thấy những tế bào có nhân trương to, các tế bào bị bong tróc và rơi vào lòng ống gan tụy và giai đoạn cuối là sự tập trung của các tế bào máu ở giữa ống gan tụy và nhiễm khuẩn thứ cấp kèm theo hiện tượng melanin hóa.

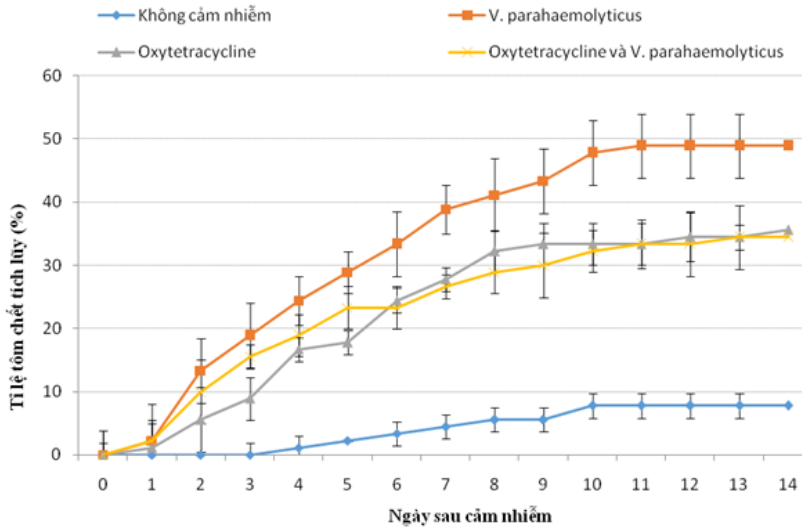


Hình 2: Mô gan tụy trên tôm sau khi cảm nhiễm. (A) Nghiệm thức không cảm nhiễm; (B) Nghiệm thức cảm nhiễm AHPND. Mũi tên chỉ các tế bào gan thoái hóa và rơi vào lòng ống, các tế bào máu tập trung quanh các cụm vi khuẩn trong vùng bị hoại tử

3.3 Tỷ lệ tôm chết tích lũy

Kết quả thí nghiệm cho thấy, tỷ lệ tôm chết cao nhất ở NT2 với tỷ lệ tôm chết tích lũy sau 14 ngày cảm nhiễm là $48,9 \pm 5,1$ khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với 3 nghiệm thức còn lại là NT1, NT3 và NT4 lần lượt là $7,8 \pm 1,92\%$; $5,6 \pm 1,92\%$

và $34,4 \pm 5,1\%$. Tuy nhiên, tỉ lệ tôm chết tích lũy giữa NT3 (không cảm nhiễm, cho tôm ăn oxytetracylin) và NT4 (cảm nhiễm, cho tôm ăn oxytetracylin) lại không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), nhưng lại cao hơn nghiệm thức không cảm nhiễm (NT1) và thấp hơn nghiệm thức cảm nhiễm (NT2) ($P < 0,05$) (Hình 3).



Hình 3: Tỷ lệ tôm chết tích lũy ở các nghiệm thức sau 14 ngày thí nghiệm

3.4 Các chỉ tiêu miễn dịch

3.4.1 Tổng tế bào máu

Trước khi cảm nhiễm vi khuẩn, tổng tế bào máu ở tôm thí nghiệm ở tất cả các nghiệm thức không có sự khác biệt. Ở nghiệm thức đối chứng không cảm nhiễm (NT1), THC vẫn không đổi giữa các lần thu mẫu trước và sau cảm nhiễm (Bảng 1). Sau 3 ngày cảm nhiễm, THC ở các NT2, NT3 và NT4 đều giảm so với NT1 và vẫn duy trì

không đổi đến kết thúc thí nghiệm đối với NT3 và NT4. Riêng NT2, THC có xu hướng phục hồi và tăng lại ở ngày thứ 6 sau cảm nhiễm. THC giảm ở các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn và sử dụng kháng sinh phù hợp với nghiên cứu của Hsieh *et al.* (2008) and Ren *et al.* (2014). Nghiên cứu của Hsieh *et al.* (2008) còn ghi nhận THC tăng sau 3 ngày cảm nhiễm gần bằng với giá trị trước cảm nhiễm.

Bảng 1: Sự biến động các chỉ tiêu miễn dịch ở tôm thí nghiệm trước và sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Nghiệm thức	trước cảm nhiễm	3 ngày sau cảm nhiễm	6 ngày sau cảm nhiễm	9 ngày sau cảm nhiễm
Tổng tế bào máu (10^2 tb/mm³)				
NT1	214±7,8 ^{Aa}	210±10,6 ^{aA}	208±3,7 ^{aA}	216±1,5 ^{aA}
NT2	212±4,9 ^{Aa}	163±4,7 ^{Bb}	204±8,3 ^{Aa}	215±3,2 ^{Aa}
NT3	208±6,1 ^{Aa}	169±4,9 ^{Bb}	156±10,8 ^{Bb}	156±2,4 ^{Bb}
NT4	216±9,1 ^{Aa}	155±2,2 ^{Bb}	151±3,7 ^{Bb}	153±2,7 ^{Bb}
PO (OD. 490 nm)				
NT1	0,133±0,007 ^{Aa}	0,130±0,007 ^{Aa}	0,131±0,007 ^{Aa}	0,134±0,005 ^{Aa}
NT2	0,138±0,08 ^{Aa}	0,086±0,005 ^{Bb}	0,087±0,005 ^{Bb}	0,110±0,006 ^{Bc}
NT3	0,130±0,04 ^{Aa}	0,085±0,003 ^{Bb}	0,069±0,003 ^{Cc}	0,083±0,002 ^{Bbc}
NT4	0,129±0,06 ^{Ab}	0,071±0,005 ^{Bb}	0,060±0,005 ^{Cb}	0,069±0,003 ^{Bb}
RBs (OD. 630 nm)				
NT1	0,170±0,003 ^{Aa}	0,173±0,003 ^{Aa}	0,171±0,004 ^{Aa}	0,172±0,005 ^{Aa}
NT2	0,167±0,18 ^{Aa}	0,157±0,003 ^{Bb}	0,163±0,003 ^{ABa}	0,165±0,003 ^{Aa}
NT3	0,169±0,10 ^{Aa}	0,153±0,003 ^{Bb}	0,159±0,001 ^{Ba}	0,159±0,004 ^{Aa}
NT4	0,166±0,04 ^{Aa}	0,149±0,001 ^{Bb}	0,153±0,004 ^{Bb}	0,157±0,004 ^{Aab}
SOD (OD. 560 nm)				
NT1	1,216±0,012 ^{Aa}	1,257±0,068 ^{Aa}	1,214±0,041 ^{Aa}	1,206±0,090 ^{Aa}
NT2	1,210±0,013 ^{Aa}	1,095±0,023 ^{Bb}	1,098±0,006 ^{ABa}	1,177±0,024 ^{Aa}
NT3	1,246±0,075 ^{Aa}	1,043±0,043 ^{Bb}	1,069±0,035 ^{Ba}	1,075±0,068 ^{Aa}
NT4	1,206±0,060 ^{Aa}	1,057±0,045 ^{Bb}	1,037±0,021 ^{Bb}	1,066±0,035 ^{Aab}

Các giá trị có ký tự khác nhau trong cùng một hàng (a, b) hoặc một cột (A, B, AB) thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

3.4.2 Hoạt tính của phenoloxidase

Trừ nghiệm thức 1 (không cảm nhiễm), hoạt tính của phenoloxidase ở các thời điểm thu mẫu khác nhau của cùng nghiệm thức khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) so với lần thu mẫu trước khi cảm nhiễm (Bảng 1). Sau cảm nhiễm, hoạt tính của PO ở NT2, NT3 và NT4 giảm rồi tăng dần. Ở NT2 (cảm nhiễm), hoạt tính của PO duy trì không đổi đến ngày thứ 6 sau cảm nhiễm và tăng vào ngày thứ 9. Hoạt tính của PO ở NT3 và NT 4, giảm đến ngày thứ 6 và tăng trở lại vào ngày thứ 9 nhưng vẫn thấp hơn so với trước cảm nhiễm (Bảng 1).

Nghiên cứu của Ren *et al.* (2014) chỉ ra rằng hoạt tính của PO giảm dần khi cho tôm ăn thức ăn trộn florfenicol và chỉ tăng trở lại khi ngưng sử dụng kháng sinh. Trong nghiên cứu này, tôm được cho ăn oxytetracylin trong 5 ngày (NT3 và NT4) và hoạt tính PO giảm trong thời gian ăn kháng sinh và tăng khi ngưng cho ăn oxytetracylin.

3.4.3 Respiratory burst

Hoạt tính của respiratory burst không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức trước khi cảm nhiễm và giữa các lần thu mẫu. Tuy nhiên, ngày thứ 3 sau cảm nhiễm, hoạt tính RBs giảm có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) ở NT2 (cảm nhiễm), NT3 (cho ăn oxytetracylin) và NT4 (cảm nhiễm và cho ăn oxytetracylin) so với nghiệm thức 1 (không cảm nhiễm). Đến ngày thứ 6 sau cảm nhiễm, RBs ở NT2 và NT3 tăng và không có sự khác biệt so với NT1. Riêng ở NT4, hoạt tính RBs tăng chậm và vẫn thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với NT1, NT2 và NT3 (Bảng 1).

Theo nghiên cứu của Song and Hsieh (1994), superoxide anion và hydrogen peroxide (H_2O_2) được giải phóng ra từ các tế bào máu có vai trò quan trọng trong quá trình tiêu diệt mầm bệnh ở tôm. Sự gia tăng hoạt tính RBs chứng tỏ các gốc oxy tự do được tế bào máu tôm giải phóng ra để diệt khuẩn (Sarathi *et al.*, 2008). Tuy nhiên trong nghiên cứu này, hoạt tính của RBs giảm sau khi cảm nhiễm chứng tỏ, khả năng phóng thích các gốc oxy tự do của tôm giảm gây ảnh hưởng đến sự đề kháng chống lại vi khuẩn cảm nhiễm.

3.4.4 Hoạt tính của superoxide dismutase

Hoạt tính của superoxide dismutase (SOD) ở NT1 không có sự khác biệt giữa các lần thu mẫu trước và sau cảm nhiễm. Tuy nhiên sau 3 ngày cảm nhiễm, hoạt tính của SOD ở NT3 và NT4 giảm mạnh hơn so với NT2 và tăng trở lại sau 6 ngày cảm nhiễm (nhau nhất ở NT 2 và chậm nhất ở NT4).

Hoạt động của SOD là một trong những cơ chế bảo vệ chính, giúp cơ thể chống stress oxy hóa gây ra bởi ô nhiễm, bệnh truyền nhiễm, tình trạng thiếu oxy (hypoxia), quá nhiều oxy (hyperoxia), nhiệt độ và các chất kích thích miễn dịch (Neves *et al.*, 2000). Hoạt tính của SOD ở tôm giảm trong thí nghiệm này phù hợp với kết quả của Li *et al.* (2008) khi ghi nhận sự giảm hoạt tính của chỉ tiêu miễn dịch khi tôm cảm nhiễm vi khuẩn *V. alginolyticus*. Ren *et al.* (2014) sử dụng flofenicol để tìm hiểu ảnh hưởng của kháng sinh này trên hệ miễn dịch của tôm thẻ chân trắng cũng ghi nhận hoạt tính SOD giảm nhanh so với các chỉ tiêu khác và tăng lại sau 4 ngày cảm nhiễm.

Kết quả phân tích các chỉ tiêu miễn dịch cho thấy, cho tôm ăn OTC (liều 2 g/kg thức ăn) liên tục trong 5 ngày (trong trường hợp tôm không cảm nhiễm vi khuẩn) sẽ làm suy giảm các chỉ tiêu miễn dịch THC, PO, RBs và SOD gây ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe tôm. Mặc dù chưa có nhiều minh chứng về tác dụng phụ của OTC lên đáp ứng miễn dịch của tôm, nhưng tác dụng phụ của OTC lên đáp ứng miễn dịch của cá đã được nhiều tác giả công bố. OTC ức chế hệ miễn dịch cá chép (Grondel *et al.*, 1985), làm khả năng thực bào của đại thực bào và làm giảm hoạt tính RBs ở cá hồi, cá bơn và cá chép (Wishkovsky *et al.*, 1987; Tafalla *et al.*, 2002).

4 KẾT LUẬN

Các chỉ tiêu miễn dịch THC, PO, RBs và SOD giảm khi cho tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn có bổ sung oxytetracylin khi cảm nhiễm và không cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây hoại tử gan tụy cấp tính. Kết quả trên cho thấy sử dụng oxytetracylin để phòng bệnh hay trị bệnh đều làm suy giảm miễn dịch và có thể gây chết tôm.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài được tài trợ bởi Dự án Hợp tác Kỹ thuật “Tăng cường năng lực trường Đại học Cần Thơ thành trường xuất sắc về đào tạo, nghiên cứu khoa học và chuyên giao công nghệ” của Cơ quan Hợp tác Quốc tế Nhật Bản (JICA).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Beauchamp, C. and Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 44(1): 276-287.
- Flegel, T.W., 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 110(2): 166-173.
- Grondel, J.L. Gloudemans, A.G. and van Muiswinkel, W. B., 1985. The influence of antibiotics on the immune system. II. Modulation of fish leukocyte responses in culture. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 6(3): 251-260.

- Hsieh, S.L., Ruan, Y.H., Li, Y.C., Hsieh, P.S., Hu, C.H. and Kuo, C.M., 2008. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture* 275(1-4): 335-341.
- Herández-López, J., Gollas-Galván, T. and Vargas-Albores, F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 113(1): 61-66.
- Moullac, G., Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P. and Aquacop, 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: Protection against vibriosis. *Fish and Shellfish Immunology*. 7(4): 227-234.
- Li, C.C., Yeh, S.T. and Chen, J.C., 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection. *Fish and Shellfish Immunology*. 25(6): 853-860.
- Lightner, D.V., 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedure for disease of shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. pp. 1-72.
- .Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C.R., Noble, B.L. and Tran, L., 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, January/February, 40.
- Neves, C.A., Santos, E.A. and Bainy, A.C.D., 2000. Reduced superoxide dismutase activity in *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Palaemonidae), infected by *Probopyrus ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). *Disseases of Aquatic Organisms*. 39(2): 155-158.
- Ren, X., Pan, L. and Wang, L., 2014. Effect of florfenicol on selected parameters of immune and antioxidant systems, and damage indexes of juvenile *Litopenaeus vannamei* following oral administration. *Aquaculture*. 432: 200-202.
- Sarathi, M., Nazeer B.A., Ravi, M., Venkatesan, C., Kumar, S.B. and Hameed., A.S., 2008. Clearance of white spot syndrome virus (WSSV) and immunological changes in experimentally WSSV-injected *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology*. 25(3): 222-230.
- Song Y.L. and Hsieh, Y.T., 1994. Immunostimulation of tiger shrimp *Penaeus monodon* haemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology*. 18(3): 201-209
- Tafalla, C., Novoa, B., Alvarez, J.M. and Figueras, A., 2002. In vivo and in vitro effect of oxytetracycline treatment on the immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*. 22(4): 271-276.
- Takahashi, Y., Itami, T. and Kondo, M., 1995. Immunodefense System of Crustacea. *Fish Pathology*. 30(2): 141-150.
- Yodmuang, S., Tirasophon, W., Roshorm, Y., Chinnirunvong, W. and Panyim, S., 2006. YHV-protease dsRNA inhibits YHV replication in *Penaeus monodon* and prevents mortality. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 341: 351-356.
- Wishkovsky, A., Roberson, B. and Hetrick, F. M., 1987. In vitro suppression of the phagocytic response of fish macrophages by tetracyclines. *Journal of fish biology*. 31(sA): 61-65.