

ẢNH HƯỞNG CỦA VITAMIN C LÊN MỘT SỐ YẾU TỐ MIỄN DỊCH KHÔNG ĐẶC HIỆU VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN GÂY BỆNH CỦA CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Bùi Thị Bích Hằng¹, Phạm Văn Thi¹, Nguyễn Minh Tân¹, Trương Quỳnh Như¹ và Nguyễn Thanh Phương¹

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 07/01/2015

Ngày chấp nhận: 19/08/2015

Title:

The effects of vitamin C on non-specific immune parameters and bacterial resistance of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Từ khóa:

Cá tra, Vitamin C, hệ miễn dịch, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*

Keywords:

Striped catfish, Vitamin C, immune system, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of vitamin C on non-specific immune response as well as protection of striped catfish against bacteria such as *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella ictaluri*. The experiment was set up with striped catfish (15-20g), which were supplemented with different levels of vitamin C (0, 50, 500 and 1000 mg/kg diet) for 4 weeks. Fish blood were collected after 2 and 4 weeks administration of vitamin C for analysis of haematology, lysozyme and complement activity. After 4 weeks of feeding vitamin C, challenge test were made with *E. ictaluri* and *A. hydrophila*. The results revealed that total of leucocyte, lysozyme and complement activity were slightly increased after 2 weeks administration and increased higher after 4 weeks administration. Especially, total of leucocyte, lysozyme and complement activity displayed highest value in treatment 1000 mg vitamin C/kg diet. After challenge test with bacteria, mortality of fish in vitamin C supplemented treatments (500 and 1000 mg/kg) were lower than those of control fish. These results indicated that administration vitamin C (500-1000mg/kg diet) can stimulate non-specific immune response and protect striped catfish from bacterial damage.

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm tìm hiểu sự ảnh hưởng của hàm lượng vitamin C đến khả năng đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu của cá tra cũng như khả năng bảo hộ cá giống khi cảm nhiễm với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri*. Thí nghiệm tiến hành với cá tra giống (15-20g/cá) được cho ăn với thức ăn có bổ sung nhiều mức vitamin C (0, 50, 500 và 1000mg/kg thức ăn) trong 4 tuần. Mẫu máu cá được thu sau 2 và 4 tuần bổ sung vitamin C để phân tích các chỉ tiêu huyết học, hoạt tính lysozyme và bổ thể. Sau 4 tuần tiến hành gây cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* (10^5 cfu/ml). Kết quả cho thấy số lượng tế bào bạch cầu, hoạt tính lysozyme và bổ thể tăng nhẹ sau 2 tuần bổ sung vitamin C và tăng cao hơn sau 4 tuần. Đặc biệt số lượng bạch cầu, hoạt tính lysozyme và bổ thể đạt mức cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1000 mg vitamin C/kg thức ăn. Sau khi gây cảm nhiễm với vi khuẩn, tỉ lệ chết của cá được bổ sung vitamin C (500 và 1000 mg/kg) thấp hơn so với tỉ lệ chết của cá ở nghiệm thức đối chứng. Những kết quả trên cho thấy bổ sung vitamin C ở mức 500-1000mg/kg thức ăn kích thích gia tăng một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu và tăng khả năng kháng vi khuẩn bảo vệ cá tra.

1 GIỚI THIỆU

Nuôi trồng thủy sản đang từng bước trở thành ngành kinh tế quan trọng của nước ta. Trong đó, cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) được xem là một trong những đối tượng nuôi chủ lực ở Đồng bằng sông Cửu Long. Trong những năm gần đây, nghề nuôi cá tra phát triển quá nhanh, không theo quy hoạch nên bệnh trên cá tra nuôi hiện nay xảy ra ngày càng nhiều và phức tạp. Theo nghiên cứu của Rico *et al.* (2013) cho thấy 100% hộ nuôi cá tra có sử dụng thuốc và hóa chất trong thời gian nuôi cá. Việc sử dụng thuốc và hóa chất bừa bãi sẽ gây ra nhiều trở ngại cho nghề nuôi như sự kháng thuốc của vi khuẩn ngày càng nhiều, ô nhiễm môi trường nuôi, tồn lưu thuốc trên cá thương phẩm ảnh hưởng đến sức khỏe của người tiêu dùng. Để hạn chế dịch bệnh cũng như việc sử dụng thuốc và hóa chất trong nuôi thủy sản, một số giải pháp được nhiều người quan tâm và áp dụng trong các mô hình nuôi thủy sản hiện nay như sử dụng các chất kích thích miễn dịch, sử dụng vaccine... Trong đó, sử dụng các sản phẩm nhằm kích thích hệ thống miễn dịch của cá ngày càng được ứng dụng phổ biến. Một trong những sản phẩm được người nuôi thủy sản sử dụng thường xuyên nhằm tăng sức đề kháng cho cá là vitamin C. Trong những nghiên cứu về thức ăn cho nuôi trồng thủy sản, vitamin C được ghi nhận là quan trọng trong trao đổi chất, tham gia vào quá trình sinh trưởng và phát triển của sinh vật bởi việc tạo thành collagen, giảm stress ở cá, tăng cường các đáp ứng miễn dịch và sức đề kháng của cá,... (Arup *et al.*, 2008; Ibrahim *et al.*, 2010). Theo Đỗ Thị Hoà và *ctv.* (2004) vitamin C có vai trò quan trọng trong việc phòng bệnh và tăng cường sức đề kháng của cá và được ứng dụng trong suốt quá trình nghiên cứu đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu ở nhiều loài cá khác nhau. Mặc dù, Vitamin C đã được ứng dụng nhiều trong thực tế nhưng hiện nay chưa có nhiều tài liệu khoa học công bố về khả năng kích thích của vitamin C lên các yếu tố miễn dịch cũng như hàm lượng vitamin C tối ưu để sử dụng nhằm tăng hệ miễn dịch của cá tra trong ương nuôi. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm cung cấp thêm những thông tin hữu ích về sự ảnh hưởng của vitamin C lên sự đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và tỉ lệ sống ở cá tra giống khi cảm nhiễm với vi khuẩn.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thí nghiệm bổ sung Vitamin C

Cá tra giống khỏe (15-20g) được trữ 2 tuần để thích nghi với điều kiện thí nghiệm. Trước khi bố

trí thí nghiệm, cá được kiểm tra ngẫu nhiên về hình dạng, kí sinh trùng và vi khuẩn.

– Thí nghiệm bổ sung Vitamin C được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức (0, 50, 500 và 1000 mg Vitamin C/kg thức ăn) và 3 lần lặp lại. Mỗi bể bố trí 40 cá, cho ăn 2 lần/ngày với khẩu phần 3% trọng lượng thân. Thí nghiệm được thực hiện trong 4 tuần. Tiễn hành thu mẫu máu ở 2 thời điểm: 2 tuần và 4 tuần sau khi cá được cho ăn thức ăn có bổ sung vitamin C. Mỗi lần thu 9 cá/nghiệm thức. Mẫu máu được sử dụng để phân tích các chỉ tiêu huyết học và hoạt tính lysozyme và bổ thể.

Thức ăn chứa 35% đạm được thực hiện tại Bộ môn dinh dưỡng và chế biến, Khoa Thủy sản. Trong quá trình phối trộn thức ăn, vitamin C sẽ được bổ sung với nồng độ: 50 mg, 500 mg và 1000 mg vitamin C/kg thức ăn bằng cách thay thế tỉ lệ bột mì trong công thức thức ăn. Thức ăn sau khi chế biến được trữ ở 4°C.

2.2 Thí nghiệm cảm nhiễm

Vi khuẩn cảm nhiễm là vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* thuộc bộ sưu tập của Bộ môn Bệnh học thủy sản. Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường NB, sau đó đem ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Lấy phần kết tủa và tiệt trùng bằng 10 ml nước muối sinh lý (NaCl 0,85%). Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng là 610 nm. Sau đó pha loãng vi khuẩn đến mật độ 10^5 cfu/ml để tiến hành cảm nhiễm cho cá. Nhỏ 0,1 ml dung dịch vi khuẩn vừa pha lên đĩa TSA tán đều, đem ủ ở nhiệt độ 28°C trong 48h để kiểm chứng mật độ vi khuẩn vừa pha. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 8 nghiệm thức bao gồm: NT 1 (0mg Vitamin C + NaCl); NT2 (0mg Vitamin C + vi khuẩn); NT3 (50 mg VitaminC + NaCl); NT4 (50mg Vitamin C + vi khuẩn); NT5 (500mg Vitamin C + NaCl); NT6 (500 mg Vitamin C + vi khuẩn); NT7 (1000 mg VitaminC + NaCl); NT8 (1000mg Vitamin C + vi khuẩn). Thí nghiệm bố trí 30 cá / nghiệm thức và mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Mỗi cá được tiêm 0.1ml vi khuẩn (10^5 cfu/ml) ở góc vi ngực. Ghi nhận những biểu hiện của cá, tỉ lệ chết trong suốt 10 ngày sau khi cảm nhiễm. Dấu hiệu bệnh lý được ghi nhận, mẫu thận trước được trữ trong ethanol 90% để tái định danh vi khuẩn. Thí nghiệm được bố trí trong điều kiện có sục khí, không thay nước trong suốt quá trình thí nghiệm.

Tỉ lệ sống (%) = $\frac{\text{Tổng số cá thí nghiệm} - \text{Tổng số cá chết}}{\text{Tổng số cá thí nghiệm}} \times 100$

2.3 Phân tích các chỉ tiêu miễn dịch

Mẫu máu của cá được thu và phân tích các chỉ tiêu miễn dịch sau: (i) Định lượng hồng cầu theo Natt & Herrick (1952); (ii) Định lượng tổng bạch cầu (TBC) và từng loại bạch cầu theo Hrubec *et al.* (2000); (iii) Xác định hoạt tính lysozyme theo Ellis *et al.* (1990); (iv) Xác định hoạt tính bổ thể theo Sunyer & Tort (1995).

2.4 Quy trình PCR phát hiện vi khuẩn

Vi khuẩn *E.ictaluri* được phát hiện theo phương pháp PCR được mô tả bởi Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc phương (2010). Quy trình PCR phát hiện *A. hydrophila* theo phương pháp của Nguyễn Hà Giang và *ctv.* (2010).

2.5 Xử lý số liệu

Các số liệu được nhập dữ liệu và xử lý bằng phần mềm Excel. Chương trình SPSS 13.0 được sử dụng phân tích ANOVA 1 nhân tố ở mức ý nghĩa $p < 0,05$.

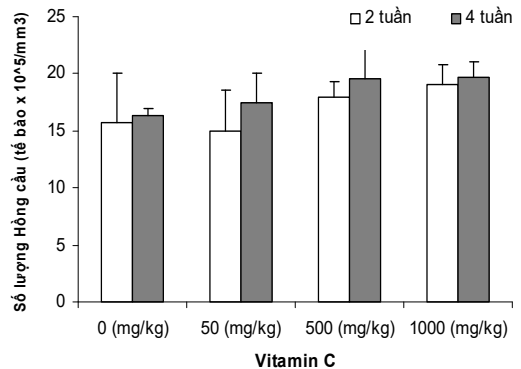
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả định loại và định lượng các tế bào máu

Hồng cầu: Kết quả định lượng hồng cầu cho thấy số lượng hồng cầu gia tăng sau 2 tuần cho ăn Vitamin C (Hình 1). Số lượng hồng cầu ở nghiệm thức 4 (1000mg/kg) là 19×10^5 tb/mm³ và nghiệm thức 3 (500 mg/kg) là $17,9 \times 10^5$ tb/mm³ so với nghiệm thức đối chứng $15,7 \times 10^5$ tb/mm³. Tuy nhiên, sự khác biệt giữa các nghiệm thức không có ý nghĩa thống kê. Sau 4 tuần bổ sung vitamin C, mặc dù kết quả hồng cầu ở các nghiệm thức có bổ

sung vitamin C đều tăng cao hơn so đối chứng nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

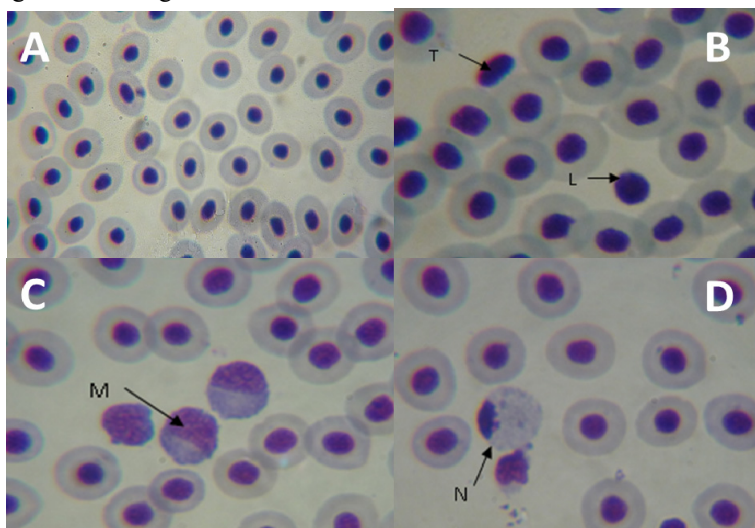
Kết quả số lượng hồng cầu của cá trong thí nghiệm cũng phù hợp theo kết quả của các nghiên cứu trước đây. Kết quả nghiên cứu số lượng hồng cầu trên cá khô của Phạm Thị Thanh Hương (2006) là $16,9 \times 10^5$ tế bào/mm³ và nghiên cứu của Nguyễn Thị Thúy Liễu (2008) mật độ hồng cầu ở cá khô là $20,5 \times 10^5$ tb/mm³.



Hình 1: Số lượng hồng cầu của cá sau 2 và 4 tuần bổ sung Vitamin C

Bạch cầu

Có 4 loại bạch cầu được quan sát gồm: lympho, bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn nhân và tiểu cầu. Hình dạng của các loại bạch cầu không có sự khác biệt giữa cá sử dụng thức ăn có và không bổ sung vitamin C (Hình 2).



Hình 2: A: tế bào hồng cầu; B: Tiểu cầu (T), tế bào lympho (L), C: tế bào bạch cầu đơn nhân (M), D: Tế bào bạch cầu trung tính (N)

Kết quả định lượng tổng bạch cầu cho thấy sau 2 tuần bổ sung vitamin C, tổng bạch cầu của cá ở nghiệm thức (500 và 1000 mg/kg) tăng cao có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng (Bảng 1). Trong khi đó, nghiệm thức 50 mg/kg không khác biệt so với đối chứng. Tương tự, sau 4 tuần bổ sung vitamin C, tổng bạch cầu của các nghiệm thức có sử dụng vitamin đều tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng là 1,2; 2 và 1.8 lần. Tuy nhiên, sự khác biệt thống kê so với đối chứng chỉ thể hiện ở nghiệm thức bổ sung 500 và 1000mg Vitamin C/kg. Thí nghiệm nghiên cứu sự ảnh hưởng của vitamin C trên cá nheo Mỹ được báo

cáo bởi Li *et al.* (1985) cho thấy tổng bạch cầu của cá tăng cao và số lượng đại thực bào gia tăng có ý nghĩa thống kê khi bổ sung vitamin C với hàm lượng 3000 mg/kg thức ăn. Theo Phuong *et al.* (2007), cá trê ăn thức ăn chứa vitamin C cho số lượng tổng bạch cầu gia tăng so với không bổ sung vitamin C. Nghiên cứu bổ sung vitamin C (500, 1000 và 1500 mg/kg thức ăn) cho cá trôi Ấn Độ (*Labeo rohita*) trong 2 tháng cho kết quả cá tăng trưởng nhanh, tổng bạch cầu và các loại bạch cầu đều gia tăng, đặc biệt tăng cao ở nghiệm thức bổ sung 1000 mg vitamin C/kg thức ăn (Arup *et al.*, 2008).

Bảng 1: Số lượng tổng bạch cầu sau 2 và 4 tuần bổ sung vitamin C

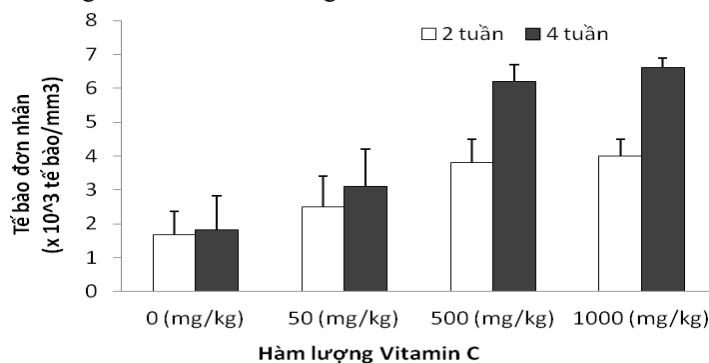
Nghiệm thức	2 tuần (x 10 ⁴ tế bào/ mm ³)	4 tuần (x 10 ⁴ tế bào/ mm ³)
0mg vitamin C/kg thức ăn	7,3 ± 2,1 ^a	7,8 ± 4,6 ^a
50mg vitamin C/kg thức ăn	6,9 ± 3,7 ^a	9,2 ± 3,5 ^a
500mg vitamin C/kg thức ăn	12,2 ± 2,4 ^b	15,9 ± 2,5 ^b
1000mg vitamin C/kg thức ăn	13 ± 3,2 ^b	16,8 ± 3,8 ^b

Giá trị thể hiện trên bảng là giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Các giá trị trong cùng 1 cột có các chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Tế bào lympho: Kết quả định lượng tổng tế bào lympho sau 2 tuần cho thấy có sự gia tăng khác biệt giữa những nghiệm thức có bổ sung vitamin C với nghiệm không bổ sung vitamin C ngoại trừ nghiệm thức 50 mg/kg. Sau 4 tuần bổ sung vitamin C, số lượng tế bào lympho tăng cao so với 2 tuần cho ăn Vitamin C trong cùng nghiệm thức. Số lượng tế bào lympho ở các nghiệm thức 0, 50, 500 và 1000 mg vitamin C/kg thức ăn đạt tương ứng 5,9; 7,7; 10.6 và 12.4 x 10⁴ tế bào/ mm³. Hầu hết các nghiệm thức cho ăn vitamin C đều cho thấy số lượng tế bào lympho tăng cao có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng lần lượt là 1,3; 1,8 và 2.1 lần.

Tế bào đơn nhân: Sau 2 tuần bổ sung vitamin C thông qua phương pháp cho ăn, số lượng tế bào đơn nhân tăng cao ở các nghiệm thức có bổ sung

vitamin C so với nghiệm thức đối chứng (Hình 3), tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Sau 4 tuần cho ăn vitamin C, tế bào đơn nhân tiếp tục tăng cao. Trong đó, nghiệm thức 500 và 1000 mg/kg tăng cao gấp 3 lần và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Bổ sung vitamin C liều cao nhằm tăng cường sức đề kháng cho cá thông qua việc kích thích một số yếu tố miễn dịch không đặc hiệu đã được nghiên cứu trên nhiều loài cá (Lall *et al.*, 1993; Waagbo *et al.*, 1994). Một số nghiên cứu đã chỉ ra vitamin C có hiệu quả kích thích khả năng thực bào của cá (Blazer, 1992; Lin & Shiau, 2005). Ở sinh vật, tế bào đơn nhân là tế bào tiền thân của đại thực bào. Do vậy, gia tăng tế bào đơn nhân cũng là một cách gián tiếp làm tăng cường hoạt động đại thực bào trên cá nuôi.



Hình 3: Số lượng tế bào đơn nhân của cá sau 2 và 4 tuần bổ sung Vitamin C

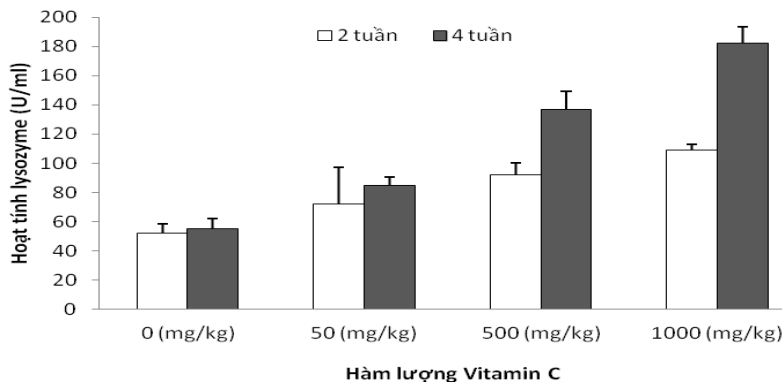
Tế bào trung tính: Số lượng tế bào trung tính của các nghiệm thức có bổ sung vitamin C gia tăng so với nghiệm thức đối chứng sau 2 và 4 tuần bổ sung vitamin C, ngoại trừ nghiệm thức 50 mg/kg. Trong đó, nghiệm thức 1000 mg/kg có số lượng tế bào trung tính tăng gấp 3 lần (6.1×10^3 tế bào/mm³) so với đối chứng (1.8×10^3 tế bào/mm³) sau 4 tuần bổ sung vitamin C.

Tiểu cầu: Kết quả định lượng tế bào tiểu cầu cho thấy sau 2 và 4 tuần bổ sung vitamin C, không có sự khác biệt thống kê về số lượng tiểu cầu giữa các nghiệm thức có và không có bổ sung vitamin C ($p > 0.05$).

3.2 Hoạt tính lysozyme

Kết quả hoạt tính lysozyme cho thấy có sự gia tăng sau 2 tuần bổ sung vitamin C, tuy nhiên nghiệm thức 50 mg/kg không có sự khác biệt so

với nghiệm thức đối chứng. Sau 4 tuần bổ sung vitamin C, tất cả nghiệm thức bổ sung vitamin C đều cho thấy hoạt tính lysozyme tăng rất cao và khác biệt có ý nghĩa thống kê với nghiệm thức đối chứng (Hình 4). Kết quả nghiên cứu phù hợp với báo cáo của Lin & Shiau (2005) khi bổ sung vitamin C cho cá *Epinephelus malabaricus*. Kết quả cho thấy hoạt tính lysozyme và bổ thể của cá tăng cao sau 21 ngày bổ sung 400 và 800 mg vitamin C/kg thức ăn. Tương tự, bổ sung 500 mg vitamin C/kg thức ăn cho cá rô phi trong 1 tháng cũng làm gia tăng tốc độ tăng trưởng, tăng chỉ số tế bào máu, hoạt tính lysozyme và một số yếu tố miễn dịch không đặc hiệu khác (Ibrahim *et al.*, 2010). Quicun *et al.* (2012) đã báo cáo bổ sung vitamin C cho *Rachycentron canadum* cũng làm tăng tỉ lệ tăng trưởng, tăng số lượng tế bào bạch cầu và hoạt tính lysozyme.

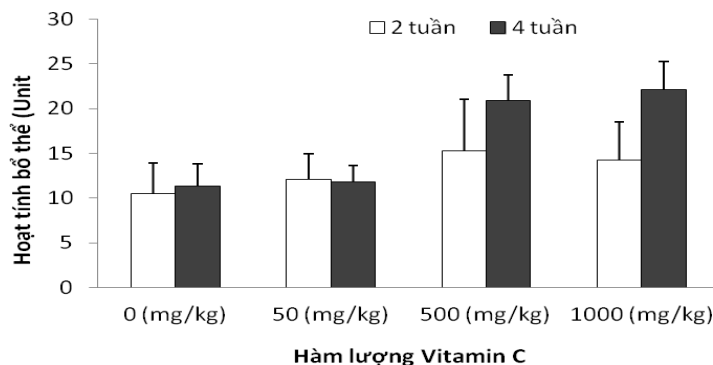


Hình 4: Hoạt tính lysozyme của cá sau 2 và 4 tuần bổ sung Vitamin C

3.3 Hoạt tính bổ thể

Sau 2 tuần bổ sung vitamin C, hoạt tính bổ thể ở các nghiệm thức không có sự khác biệt thống kê (Hình 5). Tuy nhiên, sau 4 tuần bổ sung vitamin C, hoạt tính bổ thể lần lượt tăng cao tỉ lệ thuận với liều lượng bổ sung vitamin C và thể hiện sự khác

biệt thống kê với nghiệm thức đối chứng ($p < 0.05$), ngoại trừ nghiệm thức có hàm lượng vitamin C thấp (50 mg/kg). Theo Ortuno *et al.* (2001), bổ sung 3 g vitamin C/kg thức ăn cho cá *Sparus aurata* trong 45 ngày làm gia tăng tỉ lệ tăng trưởng, hoạt tính bổ thể và khả năng thực bào của cá nuôi.

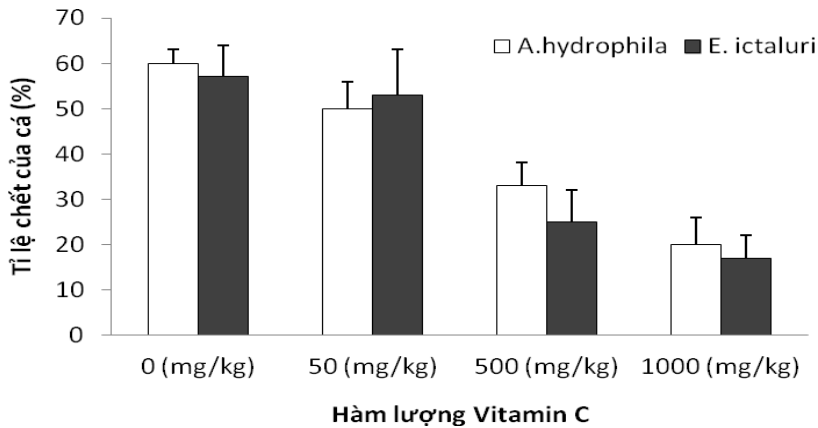


Hình 5: Hoạt tính bổ thể của cá sau 2 và 4 tuần bổ sung Vitamin C

3.4 Kết quả cảm nhiễm với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila*

Qua quá trình cảm nhiễm cho thấy tất cả các bể đối chứng (tiêm nước muối sinh lí) cá hoạt động

bình thường và không chết, trong khi đó ở các nghiệm thức cá được tiêm vi khuẩn đều xuất hiện dấu hiệu bệnh lý tương ứng với từng loại vi khuẩn và có xuất hiện cá chết trong suốt 7 ngày đầu của quá trình theo dõi.



Hình 6: Tỷ lệ chết của cá sau cảm nhiễm với vi khuẩn

Khi cảm nhiễm với vi khuẩn *A. hydrophila*, nghiệm thức đối chứng cho tỷ lệ chết là 60% cao hơn so với các nghiệm thức có bổ sung vitamin C. Tỷ lệ chết giảm dần ở các nghiệm thức có bổ sung vitamin C lần lượt là 50%, 33% và 20% tương ứng với nghiệm thức 50 mg, 500 mg và 1000 mg vitamin C/kg thức ăn.

Tương tự, cá cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* cũng có tỷ lệ chết cao nhất ở nghiệm thức đối chứng (57%). Các nghiệm thức bổ sung vitamin C có tỷ lệ chết thấp hơn (53%, 20% và 17%) tương ứng với các nghiệm thức 50, 500 và 1000 mg vitamin C/kg thức ăn (Hình 6).

Kết quả tái định danh vi khuẩn sau cảm nhiễm cho thấy tác nhân gây chết cá trong từng thí nghiệm cảm nhiễm tương ứng với vi khuẩn đã sử dụng để cảm nhiễm.

4 KẾT LUẬN

Sau 4 tuần bổ sung vitamin C thông qua phương pháp cho ăn, số lượng hồng cầu của cá tăng nhẹ nhưng không khác biệt với nghiệm thức đối chứng. Có sự gia tăng rõ rệt số lượng tế bào máu bao gồm tổng bạch cầu và các loại tế bào bạch cầu như tế bào lympho, tế bào đơn nhân và bạch cầu trung tính ở nhóm cá được bổ sung vitamin C trong 4 tuần. Bên cạnh đó, hoạt tính lysozyme và bổ thể cũng gia tăng tỷ lệ thuận với hàm lượng vitamin C bổ sung. Trong đó, nghiệm thức bổ sung 500 và 1000 mg vitamin C/kg thức ăn cho kết quả tốt nhất. Kết quả cảm nhiễm với vi khuẩn cho thấy

bổ sung vitamin C vào thức ăn có khả năng làm giảm tỷ lệ chết của cá.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arup, T. and C. Patra, 2008. Use of vitamin C as an immunostimulant. Effect on growth, nutritional quality, and immune response of *Labeo rohita* (Ham.). *Fish Physiol Biochem* 34:251–259.
2. Blazer, V.S., 1994. Nutrition and disease resistance in fish. *Ann Rev Fish Dis* 2: 309-323.
3. Chinabut, S., P. Kitsawat and C. Limsuwan, 1991. Histology of the walking catfish, *Clarias batrachus*. International development research center, Canada, 96 pages.
4. Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2010. Phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh mù gan trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng phương pháp PCR. *Tạp chí khoa học, Đại học Cần Thơ* 13:151-159.
5. Đỗ Thị Hòa, Nguyễn Hữu Dũng, Bùi Quang Tề và Đỗ Thị Muội, 2004. Giáo trình bệnh học Thủy sản. Đại học Nha Trang.
6. Ellis, A.E., 1990. Lysozyme activity. In: Stolen TC, Fletcher PD, Anderson BS, Roberson BS, Muiswinkel WB, editors. *Technique in Fish Immunology*. New York: SOS Publications; p 101-103.

7. Hrubec, T.C., J. L. Cardinale and S. A. Smith, 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). Vet Clin Pathol. 29:7-12.
8. Ibrahem, M.D., M. Fathi, S. Mesalhy and A.M. Abd El-Aty, 2010. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish & Shellfish Immunology 29: 241-246.
9. Lall, S.P. and G. Oliver, 1993. Role of micro nutrient in immune response and disease resistance in fish. Fish nutrition in Practice 61: 101-18.
10. Li, Y. and R.T. Lovell, 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increases immune response in channel catfish. Journal of Nutrition 115,:123–131.
11. Lin, M.F. and S. Shi-Yen, 2005. Dietary l-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture 244: 215– 221.
12. Natt, M. P. and C.A. Herrick, 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. Poult Sci. 31:735-738.
13. Nguyễn Hà Giang, Trương Quỳnh Như, Lê Hữu Thôi và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2010. Nghiên cứu ứng dụng qui trình PCR chẩn đoán vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* trên thận cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bệnh xuất huyết. Tạp chí khoa học, Đại học Cần Thơ 16a:136-140.
14. Nguyễn Thị Thúy Liễu, Bùi Thị Bích Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011. Tìm hiểu sự biến động của các yếu tố miễn dịch không đặc hiệu trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*. Tạp chí khoa học, Đại học Cần Thơ 17a: 20-29.
15. Ortuno, J., A. Cuesta, A. Esteban and J. Meseguer, 2001. Effect of oral administrations of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*SpParus aurata* L.) innate immune system. Veterinary Immunology and Immunopathology 79:167-180.
16. Phạm Thanh Hương, 2006. Xác định một số yếu tố huyết học trên cá tra bệnh vàng da ở tỉnh Cần Thơ. Luận văn tốt nghiệp. Khoa Thủy sản. 54 trang.
17. Phuong, N.D., M. Effendy, A. Wahid and A. Munafi, 2007. Non-specific immune responses towards ascorbic acid supplementation in hybrid catfish (*Clarias gariepinus x C. Macrocephalus*) feed. Master thesis: Universiti Malaysia Terrengganu, Malaysia.
18. Qicun, Z., L. Wang, H. Wang, F. Xie and T. Wang, 2012. Effect of dietary vitamin C on the growth performance and innate immunity of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). Fish & Shellfish Immunology 32: 969-975.
19. Rico, A., T.M. Phu, K. Satapornvanit, J. Min, A.M. Shahabuddin, P.J.G. Henriksson, F.J. Murray, D.C. Little, A. Dalsgaard and P.J. Van den Brink, 2013. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. Aquaculture 412–413, 231–243.
20. Sunyer, J.O and L. Tort, 1995. Natural haemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. Veterinary Immunology and Immunopathology 45:333-345.
21. Waagbo, R., 1994. The impact of nutrition factors on the immune system in Atlantic Salmon, *Salmo salar* L. a review. Aquaculture and Fisherise Management 25: 175-197.