

# ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH TỰ NHIÊN CỦA TÔM CÀNG XANH (*MACROBRACHIUM ROSENBERGII*) CẢM NHIỄM VI-RÚT GÂY BỆNH ĐÓM TRẮNG

Đặng Thị Hoàng Oanh<sup>1</sup>, Lê Hữu Thôi<sup>1</sup> và Nguyễn Thanh Phương<sup>1</sup>

## ABSTRACT

*Study on natural immune response of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) which were experimental infected with white spot syndrome virus was performed. Prawns were injected into second abdominal segment. WSSV with three concentrations as LD<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub>.10<sup>-2</sup>, LD<sub>50</sub>.10<sup>-4</sup> and a control treatment (PBS injection). Haemolymph samples were collected at day 0, 1, 3, 5, 10, 15 after injection for analyzing total haemocyte count, haemocyte identification, phenoloxidase, respiratory burst and superoxide dismutase activities. Results of immunological analysis revealed no difference in total haemocyte count of all the treatments as well as sampling times. Granular cell reduced until 5 day after injection. Phenoloxidase and respiratory burst activities were found to be significantly higher in infected prawns compared to non-infected ones, but superoxide dismutase activity was lower than those of the first sampling time and control treatment.*

**Keywords:** *Macrobrachium rosenbergii*, WSSV, natural immune, total hemocyte, granular cell, hyaline cell, phenoloxidase, respiratory burst, superoxide dismutase

**Title:** *Study the natural immune response of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) with white spot syndrome virus*

## TÓM TẮT

*Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm càng xanh cảm nhiễm với vi-rút gây bệnh đốm trắng (WSSV) trong điều kiện phòng thí nghiệm được thực hiện. Tôm thí nghiệm được tiêm WSSV tương ứng với 3 nồng độ LD<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub>.10<sup>-2</sup>, LD<sub>50</sub>.10<sup>-4</sup> và một nghiệm thức đối chứng tiêm PBS. Tôm khỏe được tiêm WSSV vào đốt bụng thứ hai và mẫu máu được thu vào các ngày 0, 1, 3, 5, 10, 15 để phân tích tổng tế bào máu, định loại bạch cầu, hoạt tính của phenoloxidase, superoxide dismutase và khả năng tạo ra hợp chất kháng khuẩn superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Kết quả cho thấy tổng tế bào máu ở tất cả các nghiệm thức cũng như các lần thu mẫu không có sự khác biệt. Bạch cầu có hạt giảm dần đến ngày thứ 5 sau khi tiêm, sau đó tăng trở lại và bạch cầu không hạt thì tăng, sau ngày thứ 5 thì giảm. Hoạt tính của phenoloxidase và khả năng tạo superoxide anion cao hơn có ý nghĩa, nhưng hoạt tính của superoxide dismutase thấp hơn so với trước khi tiêm và so với đối chứng.*

**Từ khóa:** *Tôm càng xanh, WSSV, tổng bạch cầu, bạch cầu có hạt, bạch cầu không hạt, phenoloxidase, respiratory burst, superoxide dismutase*

## 1 GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây, nghề nuôi tôm ở nước ta phát triển nhanh với mức độ thâm canh hóa ngày càng cao. Tuy nhiên, dịch bệnh nhất là bệnh do vi-rút đang là mối nguy hiểm, gây thiệt hại nghiêm trọng cho nghề nuôi tôm. Những bệnh do vi-rút như: vi-rút gây bệnh đốm trắng (White spot syndrome virus - WSSV), vi-rút

<sup>1</sup> Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

gây bệnh đầu vàng (Yellow head virus - YHV), vi-rút gây bệnh còi (Monodon baculovirus – MBV) trên tôm sú hay vi-rút gây bệnh trắng đuôi/đục cơ (white tail/white muscle) trên tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*) đã gây nhiều thiệt hại cho người nuôi. Khả năng gây bệnh của vi-rút trên tôm có sự khác biệt theo loài tôm. WSSV là vi-rút có khả năng gây chết rất nghiêm trọng ở những loài tôm biển nhất là tôm thẻ, là một trong những nguyên nhân gây thiệt hại chính cho nghề nuôi tôm từ khi nó xuất hiện ở Đông Á năm 1992 (Wang *et al.*, 1996; Chou *et al.*, 1995) và đến nay vẫn chưa có biện pháp phòng ngừa hiệu quả. Tuy nhiên, WSSV lại không gây chết tôm càng xanh (Hameed *et al.*, 2000; Sarathi *et al.*, 2008). Cho đến nay cơ chế bảo vệ của tôm càng xanh kháng lại với WSSV vẫn chưa được xác định.

Hệ thống miễn dịch của giáp xác nói chung và của tôm nói riêng chủ yếu vẫn dựa vào đáp ứng miễn dịch tự nhiên, do tôm chưa có hệ thống miễn dịch đặc hiệu phát triển. Việc đề kháng với các mầm bệnh ở tôm chủ yếu nhờ vào các đáp ứng miễn dịch tự nhiên như: hoạt tính của phenoloxidase, khả năng tạo ra hợp chất kháng khuẩn superoxide anion ( $O_2^-$ ) (hay hoạt tính respiratory burst) và superoxide dismutase (Ourth và Renis, 1993; Munoz *et al.*, 2000; Sarathi *et al.*, 2008). Những biện pháp có thể hạn chế ảnh hưởng của dịch bệnh do vi-rút trên tôm nuôi hiện nay là tăng cường đề kháng cho tôm dựa trên những cơ chế đáp ứng miễn dịch của chúng. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả nghiên cứu về đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm càng xanh được gây cảm nhiễm với dịch chiết WSSV được chuẩn bị từ mẫu tôm sú nuôi. Kết quả nghiên cứu góp phần cung cấp thông tin khoa học làm cơ sở cho các nghiên cứu miễn dịch ở tôm phục vụ cho công tác quản lý dịch bệnh ở tôm nuôi.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Tôm càng xanh có trọng lượng từ 15-25g được chọn từ trại nuôi tôm ở Cần Thơ được chuyển về thuần dưỡng trong bể nước ngọt (thể tích 1m<sup>3</sup>) tại phòng thí nghiệm ươm, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Nhiệt độ nước trong bể được duy trì trong khoảng 28-32°. Tôm được cho ăn mỗi ngày 2 lần bằng thức ăn viên theo nhu cầu. Trước khi được sử dụng để thực hiện nghiên cứu, 3 mẫu tôm được thu ngẫu nhiên để kiểm tra xác định tôm không bị nhiễm các mầm bệnh ký sinh trùng, vi khuẩn và vi-rút.

Nguồn tôm sú bệnh đốm trắng (trữ ở -80°C) của Khoa thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ được sử dụng để chuẩn bị dịch chiết WSSV.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Chuẩn bị vi-rút gây cảm nhiễm

Nguồn vi-rút gây bệnh đốm trắng (WSSV) sử dụng để gây cảm nhiễm được chuẩn bị theo phương pháp của Oseko *et al.* (2006) bằng cách nghiền mang tôm nhiễm WSSV trong dung dịch PBS (theo tỷ lệ 1:10). Sau khi ly tâm 10000 vòng/ phút trong 10 phút ở 4°C, phần dịch chiết được lọc qua màng lọc (0,45 µm). Phần dịch

qua lọc được trữ ở -80°C đến khi sử dụng. Dịch chiết được xác định dương tính với WSSV bằng phương pháp PCR (OIE, 2006).

#### 2.2.2 Phương pháp xác định tổng số bạch cầu và định loại bạch cầu

Tổng số bạch cầu được đếm theo phương pháp của Le Moullac *et al.* (1997). Máu tôm (100µl) được thu bằng cách dùng ống tiêm 1ml vô trùng có chứa 900 µl dung dịch chống đông (AS- trisodium citrate 30 mM, NaCl 338 mM, glucose 115 mM, EDTA 10 mM). Mật độ tế bào máu được xác định bằng buồng đếm hồng cầu và quan sát dưới kính hiển vi (40X). Tiêu bản, nhuộm và định loại bạch cầu được thực hiện theo phương pháp của Cornick và Stewart (1978) có điều chỉnh bằng cách dùng ống tiêm (có chứa 200 µl formalin-AS pH 4.6) rút 200 µl máu tôm cho vào ống eppendorf 1.5ml, trộn đều và ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút. Phần dịch phía trên được loại bỏ rồi cho 200 µl dung dịch formalin-AS vào phần tế bào máu còn lại, hòa tan, ly tâm và loại bỏ dung dịch phía trên. Cuối cùng hòa tan phần tế bào máu bằng 50 µl dung dịch formalin-AS. Một giọt mẫu máu được nhỏ lên lam thủy tinh, tán đều, làm khô, cố định 5 phút trong ethanol, rửa bằng nước cất và ngâm trong thuốc nhuộm Giemsa trong 30 phút, rửa lam bằng acetone và xylen và quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi (100X) theo hình z-z.

#### 2.2.3 Phương pháp xác định hoạt tính của Phenoloxidase (PO)

Hoạt tính của Phenoloxidase được xác định theo phương pháp của Herández-López *et al.* (1996). Mẫu máu (200 µl) sau khi thu (như ở mục 2.2.2) được ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, loại bỏ phần dịch phía trên. Phần viên được hòa tan nhẹ nhàng trong 1 ml cacodylate-citrate buffer (0.01M sodium cacodylate, 0.45M sodium chloride và 0.10M trisodium citrate, pH 7.0), sau đó ly tâm 2000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Phần viên lại được hòa tan với 200 µl cacodylate buffer (0.01M sodium cacodylate, 0.45M sodium chloride, 0.01M calcium chloride và 0.26 M magnesiumchloride, pH 7.0) rồi ủ 100 µl mẫu với 50 µl trypsin (1 mg/ml) trong 10 phút ở 25-26°C. Tiếp đến, 50 µl L-DOPA (3 mg/ml) được cho vào dung dịch vừa ủ xong, để 5 phút ở nhiệt độ phòng, cho thêm 800 µl cacodylate buffer vào rồi đo mẫu bằng Microplate reader ở bước sóng 490 nm. Mẫu đối chứng gồm 100 µl mẫu, 50 µl cacodylate đệm (thay thế trypsin) và 50 µl L-DOPA.

#### 2.2.4 Phương pháp xác định hoạt tính Respiratory burst

Hoạt tính Respiratory burst (RES) được thực hiện theo Song và Hsieh (1994). 100 µl máu trong thuốc chống đông được làm lắng xuống trong microplate đã được phủ với 100 µl dung dịch poly-L-lysine (0,2%) để tăng sự kết dính của tế bào. Microplate được ly tâm 5000 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ huyết tương. Thêm vào 100 µl zymosan (0,1% in Hanks' solution minus phenol red). Để 30 phút ở nhiệt độ phòng, loại bỏ zymosan, tế bào máu được rửa 3 lần với 100 µl Hanks' solution. Nhuộm với 100 µl dung dịch 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% và để khô. Sau đó, hòa tan tế bào máu trong 120 µl KOH 2M và 140 µl dimethyl sulphoxide. Đo 3 lần ở bước sóng 630 nm bằng Microplate reader.

### 2.2.5 Hoạt tính của superoxide dismutase

Hoạt tính của superoxide dismutase (SOD) được xác định dựa theo phương pháp của Beauchamp và Fridovich (1971) có điều chỉnh bằng cách cho 50  $\mu$ l máu (rút bằng ống tiêm có chứa 50  $\mu$ l dung dịch AS; pH 7.0) vào 1 ống eppendorf lạnh có chứa 500  $\mu$ l phosphate buffer (50 mM, pH 7,8), lắc đều rồi ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Sau đó 500  $\mu$ l phần dịch phía trên được chuyển sang 1 ống eppendorf mới, ủ 5 phút ở 65°C rồi ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Phần dịch phía trên lại được chuyển sang 1 ống eppendorf mới và trữ ở -20°C. 2 ml dung dịch SOD (0.1 mM EDTA, 13  $\mu$ M methionine, 0.75 mM Nitro Blue Tetrazolium (NBT) và 20  $\mu$ M riboflavin trong 50 mM phosphate buffer, pH 7.8) và từ 0-100  $\mu$ L dịch tách chiết thô được so màu bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 560nm. Đọc kết quả sau 1 phút hoặc đến khi độ hấp thụ trong mẫu đối chứng khoảng 0.2-0.25.

### 2.2.6 Bố trí thí nghiệm xác định các chỉ tiêu miễn dịch tự nhiên của tôm

Thí nghiệm xác định giá trị LD<sub>50</sub> được thực hiện theo phương pháp của Reed và Muench (1938). Dịch chiết WSSV được pha loãng 2 lần với dung dịch đệm 1X PBS thành 8 nồng độ khác nhau để tìm giá trị LD<sub>50</sub>. Tôm được bố trí vào 8 bể (mật độ 6 con/bể 80L) tương ứng với 8 độ pha loãng và một bể đối chứng. Mỗi con tôm được tiêm 50 $\mu$ l dịch chiết vi-rút đã pha loãng vào cơ ở đốt bụng thứ hai của tôm, bể đối chứng được tiêm dung dịch đệm 1X PBS. Giá trị LD<sub>50</sub> được tính theo công thức:  $I = \frac{[(\text{tỷ lệ nhiễm/chết} > 50\%) - 50\%]}{[(\text{tỷ lệ nhiễm/chết} > 50\%) - (\text{tỷ lệ nhiễm/chết} < 50\%)]}$ . Chỉ số I được áp dụng cho nồng độ có tỷ lệ gây nhiễm/chết trên 50%, từ đó tìm ra độ pha loãng mà tại đó lượng vi-rút trong dung dịch có thể đủ để gây nhiễm/chết 50% tôm được cảm nhiễm.

Thí nghiệm xác định các chỉ tiêu miễn dịch được bố trí trong hệ thống bể nhựa bể nhựa 150 L được cấp nước vào 2/3 bể, sục khí liên tục. Nhiệt độ nước dao động từ 28-32°C. Tôm càng xanh được bố trí 20 con/ bể, với 3 nghiệm thức 1, 2, 3 tương ứng với 3 liều lượng là LD<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub>.10<sup>-2</sup>, LD<sub>50</sub>.10<sup>-4</sup> và 1 nghiệm thức đối chứng tiêm PBS 1X. Mỗi nghiệm thức được bố trí lặp lại 3 lần. Tôm sau khi được bố trí vào bể tiếp tục được thuần dưỡng 2 ngày. Sau đó thu ngẫu nhiên 2 con/bể để lấy máu phân tích các chỉ tiêu miễn dịch. Tôm còn lại trong bể được tiêm 50  $\mu$ l dịch chiết WSSV/tôm (PBS 1X đối với nghiệm thức đối chứng) vào đốt bụng thứ 2. Sau khi gây cảm nhiễm 1, 3, 5, 10, 15 ngày thu mỗi bể 2 con tôm để lấy máu xác định các chỉ tiêu miễn dịch.

### 2.2.7 Phương pháp phân tích thống kê

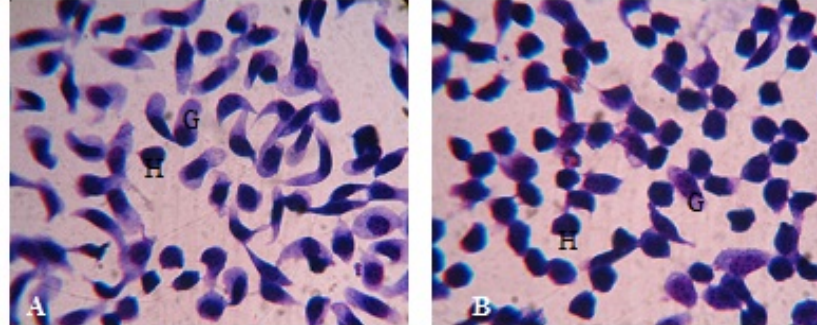
Số liệu thu được được phân tích bằng thống kê ANOVA một nhân tố (P < 0,05) sử dụng chương trình SPSS 16.0.

## 3 KẾT QUẢ

### 3.1 Tổng tế bào máu và từng loại bạch cầu

Ở tất cả các nghiệm thức thí nghiệm, tổng số lượng bạch cầu ở tôm càng xanh sau khi tiêm WSSV không có sự khác biệt so với tôm trước khi tiêm (0 ngày). Khi so

sánh giữa các nghiệm trong cùng thời điểm thu mẫu cũng không có sự khác biệt so với nghiệm thức đối chứng (Bảng 1). Tuy nhiên, thành phần từng loại bạch cầu của các nghiệm thức 2 và 3 khác biệt có ý nghĩa ( $P < 0.05$ ). Bạch cầu có hạt có xu hướng giảm dần đến ngày thứ 5 sau khi tiêm WSSV và sau đó tăng trở lại (Bảng 2) trong khi đó bạch cầu không hạt thì tăng, sau ngày 5 thì giảm (Bảng 3), đặc biệt là ở nghiệm thức 2 bạch cầu không hạt tăng rất đáng kể, từ 16% (trước khi tiêm) đến 80.5% (vào ngày thứ 5) (Hình 1).



Hình 1: Tế bào bạch cầu tôm càng xanh nhuộm bằng Giemsa (G: bạch cầu có hạt, H: bạch cầu không hạt). A: Trước khi tiêm; B: 5 ngày sau khi tiêm. (100X)

Bảng 1: Sự thay đổi tổng tế bào máu ở tôm càng xanh khi tiêm WSSV ( $10^5$  tế bào/ml)

Ngày thu mẫu	0 ngày	1 ngày	3 ngày	5 ngày	10 ngày	15 ngày
Đối chứng	40.8 <sup>Aa</sup> ± 1.1	37.9 <sup>Aa</sup> ± 2.3	41.0 <sup>Aa</sup> ± 9.2	48.1 <sup>Aa</sup> ± 0.9	48.4 <sup>Aa</sup> ± 4.4	46.5 <sup>Aa</sup> ± 0.7
Nghiệm thức 1	40.0 <sup>Aa</sup> ± 2.1	39.4 <sup>Aa</sup> ± 0.9	38.9 <sup>Aa</sup> ± 6.9	36.3 <sup>Aa</sup> ± 4.6	48.8 <sup>Aa</sup> ± 3.9	45.4 <sup>Aa</sup> ± 6.5
Nghiệm thức 2	38.8 <sup>Aa</sup> ± 1.8	37.4 <sup>Aa</sup> ± 3.4	44.0 <sup>Aa</sup> ± 6.0	35.9 <sup>Aa</sup> ± 3.7	39.0 <sup>Aa</sup> ± 0.4	46.4 <sup>Aa</sup> ± 4.8
Nghiệm thức 3	42.0 <sup>Aa</sup> ± 1.4	39.1 <sup>Aa</sup> ± 0.9	43.9 <sup>Aa</sup> ± 2.7	40.6 <sup>Aa</sup> ± 3.0	39.5 <sup>Aa</sup> ± 1.4	37.5 <sup>Aa</sup> ± 1.4

Bảng 2: Sự thay đổi tỷ lệ bạch cầu có hạt ở Tôm càng xanh khi tiêm WSSV (%)

Ngày thu mẫu	0 ngày	1 ngày	3 ngày	5 ngày	10 ngày	15 ngày
Đối chứng	84.0 <sup>Aa</sup> ± 4.2	82.5 <sup>Aa</sup> ± 2.1	82.0 <sup>Aa</sup> ± 1.4	84.5 <sup>Aa</sup> ± 0.7	84.0 <sup>Aa</sup> ± 2.8	83.5 <sup>Aa</sup> ± 2.1
Nghiệm thức 1	86.5 <sup>Aa</sup> ± 2.1	86.0 <sup>Aa</sup> ± 2.8	85.0 <sup>Aa</sup> ± 4.2	83.0 <sup>Aa</sup> ± 4.2	84.0 <sup>Aa</sup> ± 1.4	93.5 <sup>Aa</sup> ± 3.5
Nghiệm thức 2	84.0 <sup>Aa</sup> ± 2.8	84.0 <sup>Aa</sup> ± 1.4	86.0 <sup>Aa</sup> ± 4.2	19.5 <sup>Bb</sup> ± 2.1	46.0 <sup>Cb</sup> ± 4.2	87.0 <sup>Aa</sup> ± 2.8
Nghiệm thức 3	83.0 <sup>Aa</sup> ± 1.4	86.5 <sup>Ba</sup> ± 2.1	87.5 <sup>Bc</sup> ± 0.7	72.5 <sup>Dc</sup> ± 0.7	69.0 <sup>Ec</sup> ± 0.0	90.0 <sup>Ca</sup> ± 1.4

Bảng 3: Sự thay đổi tỷ lệ bạch cầu không hạt ở tôm càng xanh khi tiêm WSSV (%)

Ngày thu mẫu	0 ngày	1 ngày	3 ngày	5 ngày	10 ngày	15 ngày
Đối chứng	16.0 <sup>Aa</sup> ± 4.2	17.5 <sup>Aa</sup> ± 2.1	18.0 <sup>Aa</sup> ± 1.4	15.5 <sup>Aa</sup> ± 0.7	16.0 <sup>Aa</sup> ± 2.8	16.5 <sup>Aa</sup> ± 2.1
Nghiệm thức 1	13.5 <sup>Aa</sup> ± 2.1	14.0 <sup>Aa</sup> ± 2.8	15.0 <sup>Aa</sup> ± 4.2	17.0 <sup>Aa</sup> ± 4.2	16.0 <sup>Aa</sup> ± 1.4	6.5 <sup>Aa</sup> ± 3.5
Nghiệm thức 2	16.0 <sup>Aa</sup> ± 2.8	16.0 <sup>Aa</sup> ± 1.4	14.0 <sup>Aa</sup> ± 4.2	80.5 <sup>Bb</sup> ± 2.1	54.0 <sup>Cb</sup> ± 4.2	13.0 <sup>Aa</sup> ± 2.8
Nghiệm thức 3	17.0 <sup>Aa</sup> ± 1.4	13.5 <sup>Ba</sup> ± 2.1	12.5 <sup>Bc</sup> ± 0.7	27.5 <sup>Dc</sup> ± 0.7	31.0 <sup>Ec</sup> ± 0.0	10.0 <sup>Ca</sup> ± 1.4

A, B, C, D, E: so sánh sự khác biệt trong cùng nghiệm thức; a, b, c, d, e: so sánh sự khác biệt trong cùng thời gian

### 3.2 Hoạt tính của Phenoloxidase

Nồng độ 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 tiêm WSSV (trừ

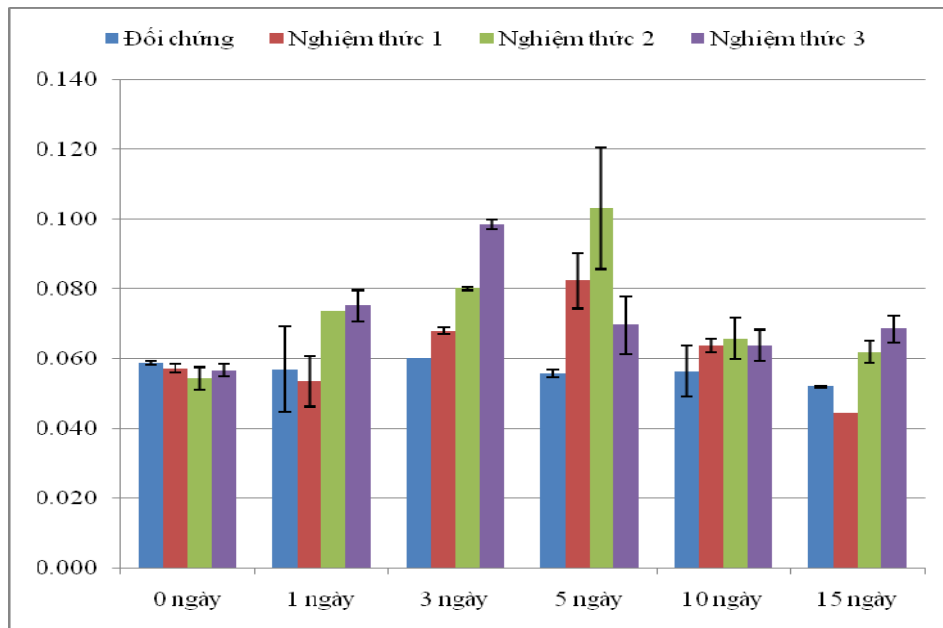
nghiệm thức đối chứng không có sự khác biệt) (Hình 2). Hoạt tính của phenoloxidase tăng dần ở cả 3 nghiệm thức. Nghiệm thức 1 và 2 bắt đầu tăng ở ngày thứ 3 đến ngày thứ 5. Riêng nghiệm thức 3 tăng chỉ sau 1 ngày tiêm và tăng đến ngày thứ 3 sau đó giảm dần. Hoạt động của phenoloxidase sau khi giảm thì không có sự khác biệt so với trước khi tiêm WSSV.

### 3.3 Hoạt tính của Respiratory burst

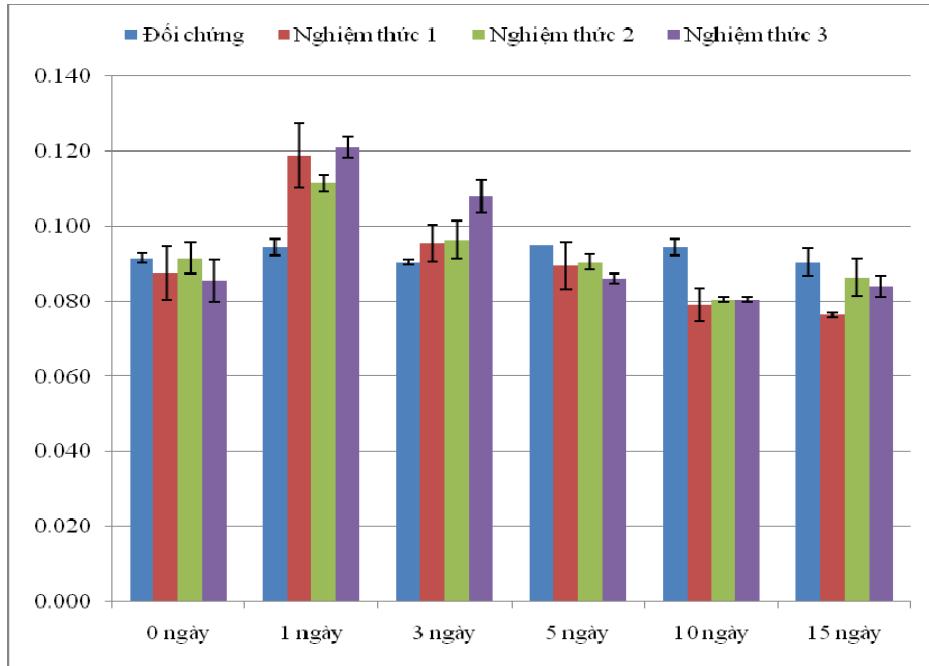
Nồng độ respiratory burst ở nghiệm thức đối chứng không có sự khác biệt giữa các lần thu mẫu. Tuy nhiên, ở cả 3 nghiệm thức tiêm WSSV đều cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa ( $P < 0.05$ ) từ ngày đầu tiên so với trước khi tiêm. Sau khi tiêm hoạt tính của respiratory burst tăng cao sau đó giảm dần và đến ngày thứ 10 thì trở nên thấp hơn có ý nghĩa so với trước khi tiêm WSSV. Tương tự, ở các lần thu mẫu khác nhau hoạt tính của respiratory burst ở 3 nghiệm thức tiêm WSSV khác biệt có ý nghĩa ( $P < 0.05$ ) so với nghiệm thức đối chứng. Cụ thể là trước khi tiêm thì không có sự khác biệt, nhưng ở ngày 1 thì cả 3 nghiệm thức đều cao hơn đối chứng, các ngày 5, 10, 15 lại thấp hơn đối chứng (Hình 3).

### 3.4 Hoạt tính của Superoxide dismutase

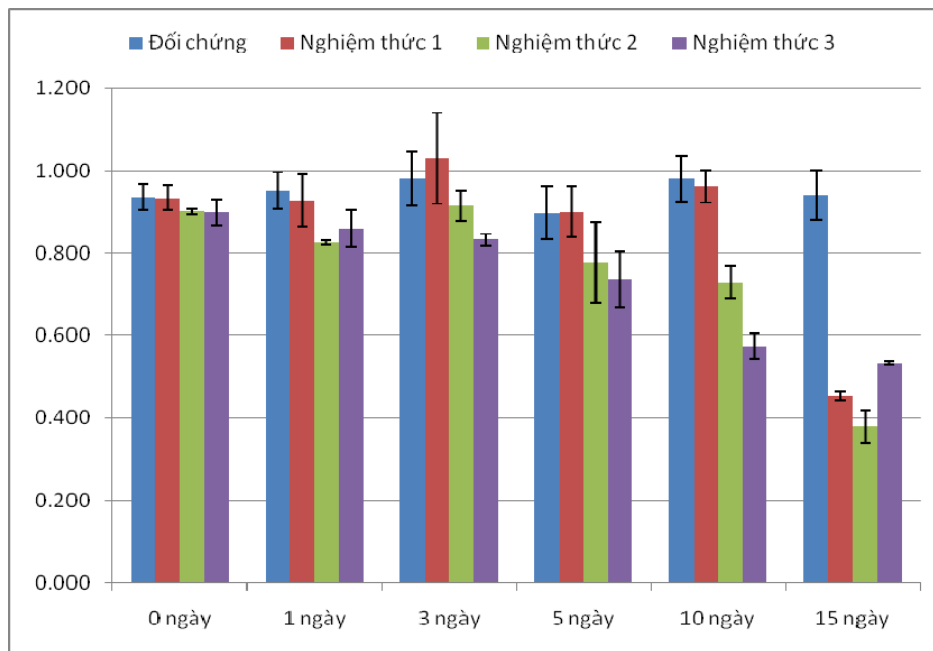
Nếu như phenoloxidase và respiratory burst hoạt động mạnh ngay sau khi tiêm WSSV thì hoạt động của thì superoxide dismutase lại không có sự khác biệt so với lần thu mẫu trước khi tiêm. Hoạt động của superoxide dismutase chỉ thay đổi có ý nghĩa ( $P < 0.05$ ) bắt đầu từ ngày thứ 10 nhưng lại giảm dần (Hình 4). Khi so sánh giữa các nghiệm thức cũng cho thấy khi tiêm WSSV thì hoạt động của superoxide dismutase cũng chỉ thay đổi giảm có ý nghĩa so với đối chứng tiêm PBS sau 10 ngày tiêm.



Hình 2: Sự thay đổi hoạt tính theo thời gian của phenoloxidase của Tôm càng xanh cảm nhiễm WSSV



Hình 3: Sự thay đổi hoạt tính của respiratory burst của Tôm càng xanh cảm nhiễm WSSV



Hình 4: Sự thay đổi hoạt tính theo thời gian của superoxide dismutase của Tôm càng xanh cảm nhiễm WSSV

#### 4 THẢO LUẬN

Bệnh đốm trắng do WSSV gây ra là bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng cho nghề nuôi tôm biển trên thế giới (Chou *et al.*, 1995). Không có loài tôm he nào được có thể đề kháng WSSV (Lotz, 1997). Theo báo cáo của Hameed *et al.* (2000) và Sarathi *et al.* (2008) thì WSSV cũng nhiễm trên tôm càng xanh nhưng nó không gây chết tôm mà nhiễm một thời gian, sau đó không còn phát hiện WSSV trên tôm càng xanh nữa. Trên cơ sở đó nghiên cứu này được thực hiện để tìm hiểu sự thay đổi các chỉ tiêu liên quan đến đáp ứng miễn dịch của tôm càng xanh khi cảm nhiễm với WSSV với những liều cảm nhiễm vi-rút khác nhau.

Theo Sarathi *et al.* (2008) thì tổng tế bào máu tôm càng xanh sau khi tiêm WSSV 1 và 3 ngày khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng không tiêm WSSV và các ngày sau đó. Tuy nhiên, theo tác giả này thì tổng tế bào máu giảm đột ngột chỉ sau 1 ngày tiêm, sau đó tăng trở lại bình thường. Sự khác biệt này so với kết quả trong nghiên cứu này có thể là do ảnh hưởng của liều lượng dịch chiết tiêm vào tôm thí nghiệm. Liều tiêm cao có thể gây sốc tôm, từ đó ảnh hưởng đến hệ miễn dịch của tôm.

Theo Söderhäll và Cerenius (1992) thì chức năng của bạch cầu có hạt là hoạt hóa hệ thống phenoloxidase. Từ đó cho thấy bạch cầu có hạt tăng dần đến ngày 3 và hoạt tính của phenoloxidase cũng tăng dần là hoàn toàn phù hợp. Kết quả phân tích hoạt tính của phenoloxidase cũng giống với báo cáo của Sarathi *et al.* (2008) với nồng độ phenoloxidase tăng dần đến ngày thứ 5 và sau đó giảm, sự khác biệt có ý nghĩa ( $P < 0.05$ ) ở ngày 3 và 5 so với đối chứng. Theo Johanson *et al.* (2000) thì ngoài vai trò trong melanin hóa của PO, các thành phần của hệ thống hoạt hóa proPO còn kích thích các phản ứng bảo vệ tế bào bao gồm cả thực bào, hình thành hạch, phong tỏa và vận động bạch cầu. Kết quả trên cho thấy rằng ban đầu PO gia tăng sau 1 ngày tiêm là do bạch cầu giải phóng prophenoloxidase để đáp ứng lại với WSSV nhằm bảo vệ tế bào. Sau 5 ngày khi tôm trở lại bình thường thì PO giảm và trở lại bình thường là do bạch cầu ngưng giải phóng ProPO.

Sự thay đổi nồng độ respiratory burst và superoxide dismutase trong nghiên cứu của chúng tôi có khác so với Sarathi *et al.* (2008). Theo tác giả này thì nồng độ respiratory burst tăng đến ngày thứ 10, sau đó bắt đầu giảm còn nồng độ superoxide dismutase giảm các ngày thứ 1, 3, 5 và sau đó tăng.

#### 5 KẾT LUẬN

Ở tôm càng xanh cảm nhiễm WSSV không có sự khác biệt về tổng tế bào máu so với tôm không cảm nhiễm và giữa các nhóm tôm cảm nhiễm WSSV với mức độ khác nhau. Tuy nhiên, tỷ lệ các loại bạch, hoạt tính của phenoloxidase, respiratory burst, superoxide dismutase cũng có những sự thay đổi nhất định có ý nghĩa. Như vậy, tôm càng xanh có biểu hiện đáp ứng miễn dịch tự nhiên khi nhiễm WSSV.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Beauchamp, C. and I. Fridovich, 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 44, 276–286.
- Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. H. Wang, H. C. Chiang and C.F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing White Spot Syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms* 23, 165-173.
- Cornick, J. W. and J. E. Stewart, 1978 . Lobster (*Hommarus americanus*) hemocytes: classification, differential counts and associated agglutinin activity. *Journal of Invertebrate Pathology* 31, 194–203
- Hameed, A. S., M. X. Charles and M. Anilkumar, 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 183, 207–213.
- Herández-López J., T. S. Gollas-Galván, F. Vargas-Albores, 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemical Physiology* 113C, 61-66.
- Le Moullac G., M. Le Groumellec, D. Ansquer, S. Froissard and P. L. Aquacop, 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology* 7, 227-234.
- Lotz, J. K. 1997. Viruses, biosecurity, and specific pathogen-free stock in shrimp aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol* 13, 405-413.
- Oseko, N., T. T. Chuah, Y. Maeno, B. C. Kua and V. Palanisamy, 2006. Examination for Viral Inactivation of WSSV (White Spot Syndrome Virus) Isolated in Malaysia Using Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*). *JARQ* 40 (1), 93 – 97.
- Sarathi, M., A. Nazeer Basha, M. Ravi, C. Venkatesan, B. Senthil Kumar and A.S. Hameed, 2008. Clearance of white spot syndrome virus (WSSV) and immunological changes in experimentally WSSV-injected *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 222-230.
- Söderhäll, K., L. Cerenius, 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, pp. 3-23.
- Song, Y. L. and Y. T. Hsieh, 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology* 18, 201-209.
- Sung, H. H., H. J. Chang, C. H. Her, J. C. Chang and Y. L. Song, 1998. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of intertebrate pathology* 71, 26-33.