

Thông tin Khoa học (short communication)

**PHÁT HIỆN MONODON BACULOVIRUS NHIỄM
TRÊN TÔM CÀNG XANH GIỐNG (*MACROBRACHIUM
ROSENBERGII*) Ở ĐỒNG THÁP**

Bùi Thị Bích Hằng¹ Trần Thị Mỹ Duyên¹ và Lê Thanh Nhã¹

ABSTRACT

*The results of fresh smear of hepatopancreatic tissue stained with 0.1% malachite green showed that 3 in total 11 samples of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) postlarvae were positive with *Monodon baculovirus* (MBV) produced occlusion bodies in hepatopancreatic cell and stained green of malachite green. Positive samples were checked by histopathological method and all samples displayed occlusion bodies in hepatopancreatic cell but normal structure in gill, hematopoietic organ, nerve cord, muscle and epithetic cell of gut. One MBV infected sample showed two early stages of disease, infected cells of first stage were enlarged nuclei and marginated chromatin, while infected cell of second stage were formed eosinophilic occlusions. The results suggested that MBV can be found in giant fresh-water prawn fingerling in Dong Thap province of the Mekong river delta; and may directly effect to structure of hepatopancreatic cell by forming one or some occlusion bodies.*

Keywords: *Baculovirus, occlusion, giant fresh-water prawn*

Title: *Detection of *Monodon baculovirus* in giant fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in Dong Thap*

TÓM TẮT

*Kết quả nhuộm nhanh phết kính tế bào gan tụy bằng 0.1% Malachite green cho thấy 3 trong tổng số 11 mẫu tôm càng xanh giống dương tính với *Monodon baculovirus* (MBV), tạo thể ẩn trong tế bào gan tụy của tôm và bắt màu xanh của thuốc nhuộm Malachite green. Các mẫu dương tính được kiểm tra bằng phương pháp mô bệnh học cho thấy tất cả đều thể hiện thể ẩn ở tế bào gan tụy, chưa phát hiện bất thường ở các cơ quan khác như mang, cơ quan tạo máu, dây thần kinh, cơ và lớp biểu bì ruột. Một mẫu bệnh còn phát hiện tế bào nhiễm MBV biểu hiện hai giai đoạn khác nhau. Tế bào thuộc giai đoạn 1 của quá trình nhiễm có nhân tế bào sưng nhẹ, các nhiễm sắc thể tan ra và di chuyển ra sát màng nhân. Tế bào ở giai đoạn 2 bắt đầu hình thành thể ẩn bắt màu hồng nhạt của eosin. Kết quả trên cho thấy MBV được tìm thấy trên tôm càng xanh giống ở Đồng Tháp; và ảnh hưởng trực tiếp lên cấu trúc mô của tế bào gan tụy tôm thông qua việc tạo một hay nhiều thể ẩn trên cùng một tế bào.*

Từ khóa: *Baculovirus, thể ẩn, tôm càng xanh*

1 GIỚI THIỆU

Đồng Bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL) với diện tích 3,9 triệu ha, là vùng có tiềm năng lớn nhất Việt Nam về nuôi trồng thủy sản cả về nuôi nước lợ ven biển và nuôi nước ngọt. Tiềm năng cho nuôi trồng thủy sản nước ngọt ước tính là 121.465ha. Tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*) là một trong hai đối

¹Bộ môn Sinh học và Bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

tượng nuôi chủ lực ở vùng nước ngọt của đồng bằng này. Theo thống kê năm 2011 của Bộ Thủy sản thì cả nước đạt khoảng 10.000 tấn tôm càng xanh, mà chủ yếu là của ĐBSCL. Nghề nuôi tôm càng xanh phổ biến ở các tỉnh An Giang, Cần Thơ, Đồng Tháp, Bến Tre, Vĩnh Long và Trà Vinh với các mô hình như nuôi tôm trong mương vườn, nuôi tôm trên ruộng lúa, nuôi tôm trong đăng quảng. Năng suất tôm nuôi đạt bình quân 184 kg/ha/vụ đối với nuôi tôm kết hợp với trồng lúa, 686 kg/ha/vụ đối với nuôi tôm luân canh, 4.120 kg/ha/vụ đối với tôm đăng quảng, 1.200 kg/ha/vụ đối với tôm nuôi ao (Nguyễn Thanh Phương *et al.*, 2003). Tuy nhiên một trong những trở ngại cơ bản để phát triển nghề nuôi tôm càng xanh ở vùng ĐBSCL là dịch bệnh. Một số bệnh thường gây ảnh hưởng trên ấu trùng tôm càng xanh như: bệnh đục thân (White tail disease) do *M.rosenbergii* nodavirus (MrNV) hoặc extra small virus (XSV), bệnh hoại tử do vi khuẩn dạng sợi *Leucothrix spp.*, cầu khuẩn, trực khuẩn trên các lông tơ, mang và phụ bộ, bệnh phát sáng (do vi khuẩn *Vibrio harveyi*), bệnh bầy lột xác, bệnh do Protozoa ký sinh (Bùi Quang Tê, 2006)... cũng là vấn đề ảnh hưởng không nhỏ đến năng suất, tỉ lệ sống và chất lượng đàn tôm nuôi. Trong thời gian gần đây, Thái Lan lại phát hiện tôm càng xanh nhiễm bệnh do *Monodon baculovirus* gây ra (Warachine *et al.*, 2010), đây là một loại virus nguy hiểm gây bệnh còi trên tôm sú với tỉ lệ rất cao. Do vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định khả năng nhiễm *Monodon baculovirus* trên tôm càng xanh giống ở trại sản xuất giống của Cần Thơ và Đồng Tháp, đồng thời tìm hiểu sự ảnh hưởng của vi-rút này lên cấu trúc mô của tôm.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Mẫu vật

Mẫu tôm càng xanh giống được tiến hành thu từ tháng 1/2011 đến tháng 6/2011 ở 7 trại sản xuất tôm càng xanh giống thuộc 2 tỉnh Cần Thơ và Đồng Tháp. Trước khi tiến hành thu mẫu những thông tin về trại giống như nguồn gốc tôm bố mẹ, cách chăm sóc, quản lý bể ương, nguồn nước cấp, giai đoạn tôm giống, ... được ghi nhận. Mỗi bể ương thu khoảng 100 con, được chứa trong bao nylon có bơm khí oxy, vận chuyển tôm sống về phòng thí nghiệm. Thực hiện nhuộm mẫu với malachite green (50 con) và quan sát dưới kính hiển vi. Khi phát hiện MBV, số tôm còn lại sẽ được cố định trong dung dịch Davison's để phân tích mẫu mô bệnh học.

2.2 Phương pháp nhuộm nhanh Malachite green

Dùng pen và kim mũi giáo nhẹ nhàng tách phần gan tụy của 1 cá thể tôm đặt trên lame. Nhỏ 1 giọt dung dịch 0,1% Malachite Green lên mẫu, đẩy lamella lại. Dùng kim mũi giáo tán nhuyễn phần gan tụy sao cho các tế bào gan tụy thấm đều malachite green. Quan sát các thể ấu dưới kính hiển vi trong vòng 5 phút. Các thể ấu MBV bắt màu xanh, hình cầu đơn lẻ hay kết thành từng chùm (Lightner *et al.*, 1983)

2.3 Phương pháp mô bệnh học

Mẫu tôm càng xanh giống được cố định trong dung dịch Davison's được tiến hành xử lý, đúc khối, cắt lát và nhuộm với Hematoxyline và Eosin theo qui trình phân tích mô học của Lightner (1996). Sau khi có được tiêu bản hoàn chỉnh, tiến hành đọc kết quả, tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi lần lượt ở các độ phóng đại 10X, 40X và 100X. Tiêu bản đẹp phải có nhân bắt màu xanh tím của

Haematoxylin, phần còn lại bắt màu hồng của Eosin. Các cơ quan tôm càng xanh giống được quan sát bao gồm gan tụy, lớp tế bào biểu bì ruột, mang, cơ và dây thần kinh.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thông tin của các trại giống tôm càng xanh được thu mẫu

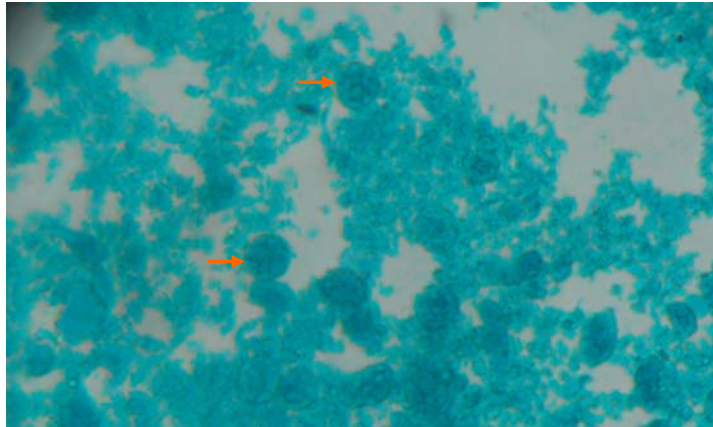
Mười một mẫu tôm càng xanh giống được thu lần lượt từ 7 trại sản xuất giống tôm càng xanh thuộc tỉnh Đồng Tháp và Thành phố Cần Thơ. Các trại được chọn thu mẫu có qui mô sản xuất từ nhỏ đến lớn và đã có kinh nghiệm nhiều năm (từ 5 – trên 10 năm). Các trại chủ yếu áp dụng qui trình ương tôm bằng nước xanh cải tiến, tuy nhiên cũng có 1 trại áp dụng qui trình nước trong. Nguồn tôm bố mẹ được các trại thu mua từ tự nhiên và từ các hộ nuôi tôm thịt, chỉ kiểm tra cảm quan và không qua qui trình kiểm tra nguồn bệnh trước khi thu mua. Nguồn thức ăn cho tôm chủ yếu là thức ăn tươi sống và tự chế. Địa điểm của các trại đều nằm gần khu vực cấp nước như sông, rạch và gần trục giao thông nên rất tiện cho việc cấp nước ngọt, nước ót và vận chuyển tôm.

Trong quá trình ương tôm, trại có gặp một số bệnh như bầy lột xác, đục thân, ... các trại đều sử dụng chế phẩm sinh học bổ sung theo định kỳ thay nước, khi có bệnh xảy ra thì sử dụng formol để xử lý. Kết thúc qui trình ương giống, 100% trại sử dụng chlorine tẩy rửa dụng cụ để chuẩn bị cho chu kỳ ương tiếp theo.

3.2 Kết quả xét nghiệm *Monodon baculovirus* bằng phương pháp nhuộm nhanh với malachite green.

Mẫu tôm giống có số ngày tuổi dao động từ 25-36 ngày tuổi. Kết quả nhuộm nhanh cho thấy có 3/11 mẫu tôm càng xanh giống có biểu hiện nhiễm MBV. Trong 3 mẫu tôm dương tính từ các trại giống thuộc tỉnh Đồng Tháp, tôm nhiễm bệnh có tỉ lệ nhiễm khá cao, dao động từ 22% - 64%. Tuy nhiên, nếu quan sát cảm quan, tôm không thể hiện bất cứ khác biệt nào về hình dạng, trạng thái hoạt động so với tôm khỏe. Theo Đỗ Thị Hoà *et al.* (2004), trong trường hợp các tôm sú mẹ có nhiễm vi-rút gây bệnh còi *Monodon baculovirus* (MBV) chắc chắn sẽ tạo ra những đàn tôm bột dương tính với MBV. Mức độ nhiễm MBV nặng hay nhẹ của tôm mẹ có quan hệ chặt chẽ với mức độ nhiễm cao hay thấp ở đàn tôm ấu trùng. Nhìn hình thức bên ngoài rất khó xác định tôm càng xanh mẹ có nhiễm MBV hay không, nên nguy cơ đưa tôm mẹ có nhiễm MBV vào tham gia sinh sản nhân tạo trong các trại giống trên là rất cao. Do vậy trong trường hợp sản xuất giống tôm càng xanh, nguồn tôm mẹ được thu gom từ nhiều địa điểm, từ tôm tự nhiên, từ tôm nuôi,... và không qua kiểm dịch trước khi đưa vào trại cũng là một yếu tố đáng quan tâm, liệu có phải MBV đã nhiễm trên tôm mẹ và truyền sang tôm giống? Ngoài ra, nguồn nước ót được cấp trong quá trình ương tôm càng xanh giống cũng có thể là một nguyên nhân dẫn đến quá trình lây nhiễm vi-rút này.

Quan sát mẫu nhuộm với malachite green cho thấy có rất nhiều thể ẩn bắt màu xanh, một dạng đặc trưng của tế bào bị nhiễm MBV (Hình 1)



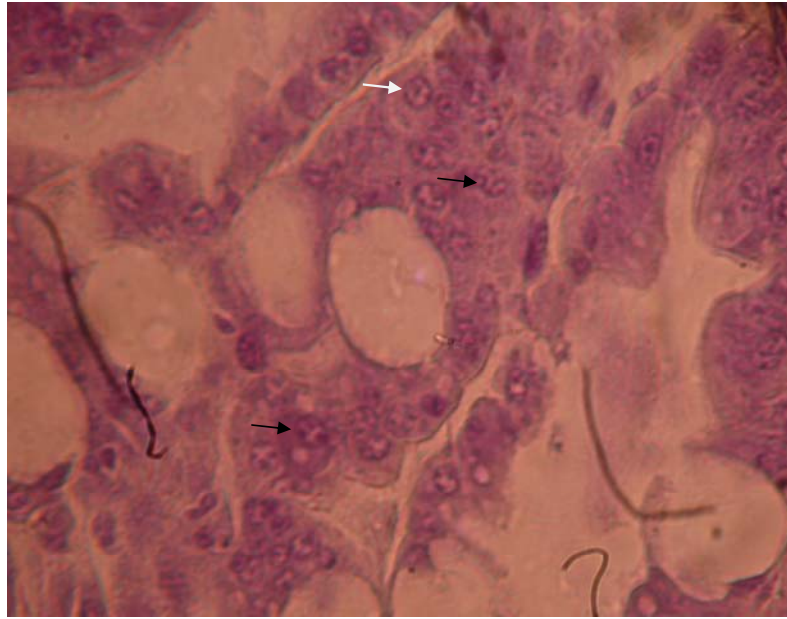
Hình 1: Tôm càng xanh giống nhiễm MBV biểu hiện thể ẩn khi nhuộm Malachite Green

→ Tế bào chứa thể ẩn do *Monodon baculovirus*.

3.3 Kết quả mô bệnh học

Mô bệnh học được xem là một trong những phương pháp cơ bản và hữu hiệu trong việc phát hiện vi-rút gây bệnh trên tôm, đồng thời cũng cho biết mức độ tổn thương trong cấu trúc tế bào do vi-rút gây ra. Do cơ quan gan tụy là cơ quan tấn công chủ yếu của MBV nên khi thực hiện phương pháp mô học, quan sát sự thay đổi ở cấu trúc tế bào gan tụy được quan tâm đặc biệt. Đồng thời, chúng tôi cũng quan sát thêm một số cơ quan khác như mang, cơ quan tạo máu, dây thần kinh và cơ để tìm hiểu thêm mức độ ảnh hưởng của MBV lên cấu trúc mô học của tôm càng xanh.

Qua hình ảnh mô bệnh học quan sát được cho thấy mô gan tụy bao gồm nhiều tế bào liên kết nằm giữa các ống tiểu quản gan tụy và có nhiệm vụ liên kết chúng lại. Khi nhuộm hematoxylin và eosin thì nhân của tế bào bình thường cũng bắt màu xanh dương, vùng tế bào chất với lưới nội chất có tím hồng. Đặc biệt, tế bào gan tụy nhiễm vi-rút thể hiện nhiều thể ẩn trong cùng một tế bào và thể ẩn bắt màu thuốc nhuộm của Eosin rất rõ (Hình 2). Kết quả này cũng phù hợp theo nhận định của Bùi Quang Tê (2003), khi tôm nhiễm MBV sẽ hình thành một hay nhiều thể ẩn ở tế bào gan tụy và bắt màu hồng eosin khi sử dụng mô nhuộm Hematoxylin và eosin.

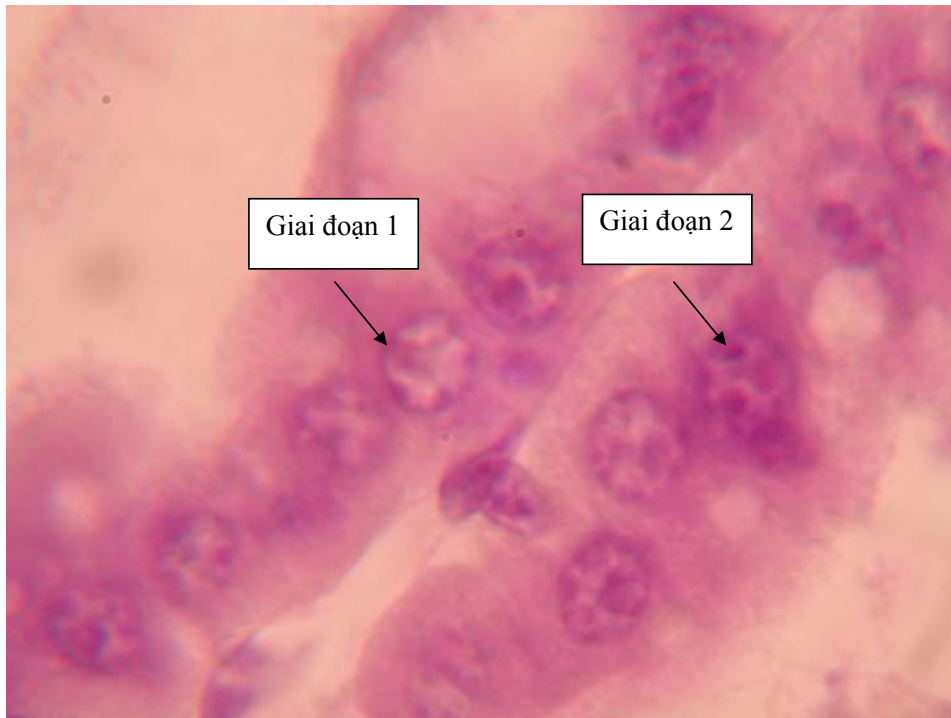


Hình 2: Thể ẩn MBV (mũi tên đen) và tế bào gan tụy khô (mũi tên trắng) của TCX giống nhuộm Hematoxylin & Eosin

Trên cùng 1 lát cắt, tế bào nhiễm MBV biểu hiện cả 2 giai đoạn khác nhau. Một tế bào thuộc giai đoạn 1 của quá trình nhiễm có nhân tế bào sưng nhẹ, các nhiễm sắc thể tan ra và di chuyển ra sát màng nhân. Một tế bào đã chuyển sang giai đoạn 2, bắt đầu hình thành thể ẩn bắt màu hồng nhạt. Kết quả này cho thấy phù hợp với mô tả của 3 giai đoạn biến đổi tế bào của tôm sú khi nhiễm MBV: giai đoạn sớm, giai đoạn phát triển và giai đoạn cuối (Lightner *et al.*, 1983; Doubrovsky *et al.*, 1988; Ramasamy *et al.*, 2000).

Kết quả mô học này cũng tương tự như kết quả của Warachin (2010) khi tác giả tìm thấy MBV nhiễm trên 6 mẫu tôm càng xanh ở Thái lan, tế bào nhiễm MBV cũng gia tăng kích thước nhân, nhiễm sắc thể di chuyển ra sát màng tế bào. Tuy nhiên, các tài liệu về ảnh hưởng của MBV lên tôm càng xanh giống còn rất hạn chế, chỉ dừng lại ở mức độ ghi nhận sự biến đổi của tế bào thông qua phương pháp mô học.

Ngoài ra, khi quan sát các cơ quan khác như mang, cơ quan tạo máu, dây thần kinh và cơ đều không cho thấy có bất cứ biểu hiện bất thường nào trong cấu trúc của tế bào.



Hình 3: Tôm càng xanh giống biểu hiện tế bào nhiễm MBV ở 2 giai đoạn

4 KẾT LUẬN

Qua khảo sát 11 mẫu tôm càng xanh bằng phương pháp nhuộm nhanh Malachite green cho thấy có 3 mẫu nhiễm MBV biểu hiện thể ẩn và bắt màu xanh của thuốc nhuộm malachite green. Cả 3 mẫu dương tính đều được thu từ trại giống ở Đồng Tháp trong khi các mẫu thu từ trại giống ở Cần Thơ đều âm tính.

Kết quả mô bệnh học cho phép nhận biết được MBV nhiễm trên tôm càng xanh giống với các biểu hiện cấu trúc tế bào thay đổi giống như ảnh hưởng trên tôm sú, tế bào nhiễm có nhân trương to, nhiễm sắc thể di chuyển ra sát màng tế bào ở giai đoạn sớm, giai đoạn tiếp theo có sự xuất hiện thể ẩn bắt màu hồng của Eosin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Quang Tề, 2003. Bệnh của tôm nuôi và biện pháp phòng trị. Nhà xuất bản Nông Nghiệp, Hà Nội.
- Bùi Quang Tề, 2006. Giáo trình bệnh học Thủy sản. Viện nghiên cứu nuôi trồng Thủy sản I.
- Đỗ Thị Hoà, Bùi Quang Tề, Nguyễn Thị Muội và Nguyễn Hữu Dũng, 2004. Bệnh học thủy sản. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
- Doubrovsky A., Paynter J. L., Sambhi S. K., Atherton J. G., and Lester R. J. G., 1988. Observations on the ultrastructure of baculovirus in Australia *Penaeus monodon* & *Penaeus merguensis*. Australia Journal of marine and freshwater resources 39: 743-749.
- Lightner D. V., Redman R. M. and Bell T. A., 1983. Observation on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture 32, 209-233.

- Lightner, D.V., 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 305 pp.
- Nguyễn Thanh Phương, Trần Ngọc Hải, Trần Thị Thanh Hiền và Marcy N. Wilder, 2003. Nguyên lý và kỹ thuật sản xuất giống tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*). Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Ramasamy P., Rajan P. R., Purushothaman V. and Brennan G. P., 2000. Ultrastructure and pathogenesis of monodon baculovirus (PmSNPV) in cultured larvae and natural brooders of *Penaeus monodon*. Aquaculture 184, 45-66.
- Warachin Gangnonngiw, Kesinee L., Siriporn S., Saengchan S., Niti C., Chalor L., Parin C., Timothy W. F., 2010. Monodon baculovirus (MBV) infects the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* cultivated in Thailand. Virus Research 148, 24–30.