

DOI:10.22144/ctu.jsi.2018.044

## TÁC ĐỘNG CỦA THUỐC ALBENDAZOLE VÀ FUMAGILLIN LÊN VI BÀO TỬ TRÙNG *Kabatana* SP. GÂY NHIỄM TRONG TẾ BÀO THẬN VÀ CƠ CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Nguyễn Thị Thu Hằng\* và Đặng Thị Hoàng Oanh

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Thu Hằng (email: ntthang@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 31/05/2018

Ngày duyệt đăng: 30/07/2018

### Title:

Effects of albendazole and fumagillin on *Kabatana* sp. (Microsporidia) infection in kidney and muscle cells of catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

### Từ khóa:

Albendazole, Fumagillin, *Kabatana*, Microsporidia, *P. hypophthalmus*

### Keywords:

Albendazole, Fumagillin, *Kabatana*, Microsporidia, *P. hypophthalmus*

### ABSTRACT

The study was carried out to determine the viability of *Kabatana* sp. spores in artificial environment and the ability of drugs inhibiting Microsporidia infected in kidney and muscle cells of catfish. The results showed that kidney and muscle cells grew well in L-15 medium. The results of spore experimental challenges showed that, after 2 hours of challenge, kidney and muscle cells were invaded by spores, accounted for  $11.68 \pm 2.60\%$  of total kidney cells and  $7.49 \pm 3.02\%$  of total muscle fibers. After 12 hours, 100% of kidney cells and muscle cell fibers were invaded. Besides that, the results of drug experiments showed that Albendazole and Fumagillin, at concentration  $5 \mu\text{g/mL}$ , had ability to inhibit *Kabatana* sp. infection in kidney and muscles cells, and can be applied to treat infection of spores caused by *Kabatana* sp. in catfish muscles.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định khả năng tồn tại của bào tử *Kabatana* sp. trong môi trường nhân tạo và khả năng ức chế của thuốc kháng sinh lên vi bào tử trùng nhiễm trên tế bào thận và cơ cá tra. Kết quả cho thấy tế bào thận và sợi cơ của cá tra có khả năng sống sót trong môi trường L-15. Kết quả cảm nhiễm bào tử vào tế bào thận và cơ sau 2 giờ cảm nhiễm cũng cho thấy, các tế bào bị bào tử xâm nhập với tỉ lệ nhiễm là  $11,68 \pm 2,60\%$  tổng số tế bào thận và  $7,49 \pm 3,02\%$  tổng số sợi cơ. Tại thời điểm 12 giờ sau khi cảm nhiễm, 100% các tế bào thận và sợi cơ bị bào tử xâm nhiễm. Bên cạnh đó, kết quả thí nghiệm thuốc cũng cho thấy albendazole và fumagillin ở nồng độ  $5 \mu\text{g/mL}$  có khả năng ức chế *Kabatana* sp. nhiễm trong tế bào thận/cơ cá tra, có thể áp dụng thử nghiệm trong điều trị bệnh gao do vi bào tử trùng *Kabatana* sp. kí sinh trong cơ cá tra.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2018. Tác động của thuốc albendazole và fumagillin lên vi bào tử trùng *Kabatana* sp. gây nhiễm trong tế bào thận và cơ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(Số chuyên đề: Thủy sản)(2): 116-124.

## 1 GIỚI THIỆU

Cùng với sự phát triển của nghề nuôi cá thương phẩm thì những biến động về môi trường nuôi và

dịch bệnh xảy ra ngày càng phức tạp hơn. Bệnh do kí sinh trùng ngày càng phổ biến và gây thiệt hại nghiêm trọng hơn cho nghề nuôi cá thương phẩm trên thế giới. Trên các đối tượng thủy sản, đặc biệt

là ở các loài cá nuôi, bệnh do nhóm vi bào tử trùng Microsporidia là phổ biến và gây ảnh hưởng nghiêm trọng nhất. Từ những năm 1970 đến nay, Microsporidia gồm một số loài như *Glugea anomala*, *G. plecoglossi*, *Kabatana arthuri*, *Pleistophora* sp. được phát hiện gây nhiễm trên nhiều loài cá kinh tế quan trọng như cá hồi, cá bơn, cá chêm, cá tra (Woo, 2006; Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012). Ngoài ra, ở mức độ bệnh nặng, tỉ lệ chết có thể lên đến 95% nếu không được điều trị (Lom and Nilsen, 2003; Woo, 2006; Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012).

Trong các nỗ lực nhằm hạn chế dịch bệnh do vi bào tử trùng Microsporidia gây ra trên cá, các biện pháp phòng, điều trị bằng thuốc kháng kí sinh trùng và hóa chất đã được nghiên cứu và đạt được những thành công bước đầu. Một số nghiên cứu đã ghi nhận hiệu quả điều trị bệnh do Microsporidia của các loại thuốc kháng kí sinh trùng. Điển hình là thuốc Fumagillin, Toltrazuril, TNP-470, Benzimidazole có tác dụng kìm hãm và tiêu diệt sự phát triển của các bào tử loài *Glugea anomala*, *G. plecoglossi*, *Kabatana takedai*, *Loma salmonae*, *Enterocytozoon bieneusi* (Schmahl *et al.*, 1990; Woo, 2006; Athanassopoulou *et al.*, 2009).

Tại Việt Nam, vi bào tử trùng *Kabatana* sp. đã được ghi nhận là nguyên nhân gây ra bệnh gao trên cá tra giống và thương phẩm (Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011, 2016). Dịch bệnh xảy ra làm suy giảm nghiêm trọng giá trị thương phẩm của cá thịt. Vì thế, các biện pháp điều trị bệnh bằng thuốc là rất cần thiết. Tuy nhiên, hiện nay các nghiên cứu vẫn còn dừng lại ở mức khảo sát tác nhân gây bệnh, những nghiên cứu về thuốc để điều trị bệnh khá hạn chế. Chính vì vậy, đề tài “**Tác động của thuốc albendazole and fumagillin lên vi bào tử trùng *Kabatana* sp. gây nhiễm trong tế bào thận và cơ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*)**” được thực hiện nhằm tạo tiền đề cho những nghiên cứu sâu hơn để điều trị bệnh do nội kí sinh gây ra trên cá nuôi ở Việt Nam có hiệu quả.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Thí nghiệm nuôi cấy tế bào thận và sợi cơ cá tra

Thực hiện theo phương pháp của Seeley *et al.*, 1990 (có bổ sung): Giải phẫu cá: (1) cắt lấy thận trước cho vào đĩa petri vô trùng có chứa môi trường L-15 (5% FCS) và giữ lạnh ngay lập tức; (2) cắt lấy phần cơ cá (kích cỡ 5x5x5 mm) cho vào đĩa petri vô trùng có chứa ít dung dịch PBS và giữ lạnh.

### 2.1.1 Nuôi tế bào thận cá

7 mL L-15 (5% FCS) được hút cho vào 1 đĩa petri vô trùng khác; đặt lưới lọc có mắt lưới 100 µM vào đĩa petri, dùng nhíp chuyển mẫu thận cá đang giữ lạnh và nghiền qua lưới lọc; hút lấy dịch huyền phù (7 mL) vào ống ficol 50 mL; cho thêm 8 mL L-15 (5% FCS) và giữ lạnh mẫu; hút chuyển tế bào thận trong mẫu thận cá sang ống ficol mới; thêm 2 mL L-15 (5% FCS), li tâm 2000 vòng, nhiệt độ 4°C, trong 5 phút; thu lấy phần viên, thêm L-15 (0,1% FCS) và trộn đều mẫu.

Số lượng tế bào thận cá được xác định bằng buồng đếm hồng cầu ở vật kính 10-40X. Kết quả được đọc: Tế bào sống không bắt màu thuốc nhuộm Trypan blue. Mật độ tế bào được điều chỉnh đạt 10<sup>7</sup> tb/mL. Dung dịch mẫu được cho vào đĩa 24 giếng, mỗi giếng chứa 1 mL dung dịch mẫu và hỗn hợp kháng sinh penicillin/streptomycin, liều lượng lần lượt là 100 UI/mL và 100 µg/mL, lặp lại 3 lần. Mẫu được ủ ở nhiệt độ 28°C; quan sát dưới kính hiển vi từ 10-40X ở thời điểm 6, 12, 18, 24, 36, 48 giờ, theo dõi quá trình sống sót của các tế bào thận.

### 2.1.2 Nuôi cấy sợi cơ cá

Mẫu cơ cá được chuyển vào ống eppendorf có chứa 1 mL PBS. Mẫu được nghiền bằng que nhựa tiệt trùng trong PBS; li tâm mẫu ở 1000 vòng, nhiệt độ 4°C, thời gian 10 phút; xác định mật độ sợi cơ 80 sợi/mL; cho dung dịch mẫu cơ cá vào đĩa 24 giếng, mỗi giếng 2 mL dung dịch mẫu và hỗn hợp kháng sinh penicillin/streptomycin, liều lượng lần lượt là 100 UI/mL và 100 µg/mL, lặp lại 3 lần; ủ mẫu ở nhiệt độ 28°C; quan sát mẫu dưới kính hiển vi (10X) ở thời điểm 6, 12, 18, 24, 36, 48 giờ để xác định sự thay đổi và tồn tại của sợi cơ.

## 2.2 Thí nghiệm gây cảm nhiễm *Kabatana* sp. với tế bào thận và sợi cơ cá tra

### 2.2.1 Thu mẫu, xác định mật độ và tỉ lệ sống của *Kabatana* sp

#### Thu vi bào tử trùng *Kabatana* sp. trong mô bệnh phẩm

Phương pháp li tâm tách lớp của Monaghan (2011) được sử dụng; tách bào nang gạo ra khỏi cơ cá tra; cho bào nang vào ống eppendorf chứa 1 mL nước cất tiệt trùng; dùng chày nhựa tiệt trùng nghiền mẫu; cho dung dịch qua lưới lọc (kích thước lưới ≤40 µM); Li tâm dung dịch mẫu ở 2000 vòng/phút, nhiệt độ 4°C trong thời gian 30 phút. Phần viên được hòa tan với 1 mL nước cất tiệt trùng, sử dụng máy vortex trộn mẫu trong 5 phút; giữ lại phần viên và hòa tan với nước cất tiệt trùng để có được một dung dịch các bào tử tinh sạch.

#### Xác định mật độ *Kabatana* sp.

Mật độ bào tử tinh sạch được xác định bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer ở vật kính 40X; đếm 4 ô lớn màu đỏ (1 ô lớn có 16 ô nhỏ) ở 4 góc của vùng đếm hồng cầu và 1 ô lớn màu đỏ ở trung tâm buồng đếm. Mỗi mẫu lặp lại 3 lần.

**Công thức tính:**  $R = C \times 10 \times 5 \times \text{ĐPL}$  (Trong đó: R: Mật độ bào tử (bt/mm<sup>3</sup>); C: Tổng số bào tử trên 5 vùng đếm; 10: Khoảng cách giữa lamelle và buồng đếm là 1/10 mm; 5: Diện tích của mỗi vùng đếm là 1/5 mm<sup>2</sup>; ĐPL: Độ pha loãng).

### Xác định tỉ lệ sống của *Kabatana* sp.

Tỉ lệ sống của vi bào tử trùng *Kabatana* sp. được thực hiện theo phương pháp của Peng *et al.* (2013). Dung dịch *Kabatana* sp. được nhuộm để xác định tỉ lệ bào tử sống và chết trước khi gây cảm nhiễm. Mẫu đối chứng: Xử lí dung dịch *Kabatana* sp. ở 100°C trong 15 phút. *Kabatana* sp. chết sẽ bắt màu đỏ của thuốc nhuộm PI. Mẫu dung dịch bào tử sống: Lấy 1 mL dung dịch mẫu chứa vi bào tử cho vào thuốc nhuộm SG và PI theo tỉ lệ 5:2,4 µM. Dung dịch bào tử quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Các bào tử sẽ bắt màu thuốc nhuộm, bào tử sống bắt màu xanh của thuốc nhuộm SG, bào tử chết bắt màu đỏ của thuốc nhuộm PI.

Xác định tỉ lệ sống của bào tử theo công thức sau:  $S(\%) = \frac{Ns \times 100\%}{No}$

Trong đó: S(%) là tỉ lệ sống, tính bằng %; Ns là số lượng vi bào tử sống; No là số lượng vi bào tử đếm được.

### 2.2.2 Thí nghiệm gây cảm nhiễm

**Chuẩn bị dung dịch bào tử *Kabatana* sp.:** Dung dịch bào tử *Kabatana* sp. chuẩn bị thí nghiệm với gây cảm nhiễm được tinh sạch, mật độ 10<sup>7</sup> bào tử/mL. Riêng mẫu dung dịch bào tử *Kabatana* sp. dùng làm đối chứng được tiệt trùng ở 100°C trong 15 phút.

**Chuẩn bị tế bào thận/cơ cá tra:** Tế bào thận và sợi cơ cá được nuôi cấy trong môi trường L-15 (0,1% FCS). Mật độ tế bào thận: 10<sup>7</sup> tb/mL; mật độ sợi cơ: 80 sợi cơ/giếng.

### Tiến hành thí nghiệm

Dịch huyền phù tế bào thận (1 mL) được cho vào đĩa 6 giếng, sau đó cho dung dịch bào tử vào các giếng theo tỉ lệ 1:1, bổ sung thêm hỗn hợp kháng sinh penicillin/streptomycin, liều lượng lần lượt là 100 UI/mL và 100 µg/mL. Thí nghiệm tương tự với sợi cơ cá; ủ mẫu ở nhiệt độ 28°C. Mỗi nghiệm thức có 1 giếng đối chứng (gồm tế bào thận/sợi cơ cá và dung dịch bào tử đã tiệt trùng). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Các nghiệm thức gây cảm nhiễm với vi bào

tử trùng được quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 10-40X và thời gian 1, 2, 4, 6, 8, 12 giờ; ghi nhận kết quả tác động của vi bào tử trùng *Kabatana* sp. với tế bào thận/sợi cơ cá.

### 2.3 Thí nghiệm khảo sát khả năng ức chế của thuốc lên vi bào tử trùng *Kabatana* sp. gây cảm nhiễm trong tế bào thận và sợi cơ cá tra

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Beauvais *et al.* (1994). Dung dịch vi bào tử *Kabatana* sp. (mật độ 10<sup>7</sup> bào tử/mL, tỉ lệ sống 100%), tế bào thận cá tra (mật độ 10<sup>7</sup> tế bào /mL) và sợi cơ cá tra (80 sợi cơ/giếng) được chuẩn bị. Thuốc albendazole và fumagillin được chuẩn bị ở nồng độ 5 µg/mL, 4 µg/mL, 3 µg/mL.

Thí nghiệm được bố trí trong đĩa 24 giếng với 3 nghiệm thức (NT), mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, gồm có: (NT3) 0,5 mL tế bào thận/cơ cá, 0,5 mL vi bào tử trùng *Kabatana* sp. và 0,5 mL dung dịch thuốc albendazole/fumagillin (3 µg/mL); (NT2) 0,5 mL tế bào thận cá/cơ, 0,5 mL vi bào tử trùng *Kabatana* sp. và 0,5 mL dung dịch thuốc albendazole/fumagillin (4 µg/mL) và (NT1) 0,5 mL tế bào thận cá/cơ, 0,5 mL vi bào tử trùng *Kabatana* sp. và 0,5 mL dung dịch thuốc albendazole/fumagillin (5 µg/mL). Ủ mẫu tế bào thận và sợi cơ ở nhiệt độ 28°C.

Mỗi nghiệm thức có 4 giếng đối chứng (ĐC) gồm: ĐC1: tế bào thận/cơ cá + thuốc albendazole/fumagillin, ĐC2: tế bào thận/cơ cá + môi trường L-15, ĐC3: môi trường L-15; ĐC4: tế bào thận/cơ cá + vi bào tử trùng *Kabatana* sp. Các nghiệm thức được quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 10-40X ở thời gian 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 giờ; ghi nhận kết quả tác động của albendazole và fumagillin đến vi bào tử trùng *Kabatana* sp. cảm nhiễm với tế bào thận/cơ cá tra.

### 2.4 Xử lí số liệu

Số liệu thu thập được chuyển đổi về dạng số thập phân. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được xác định thông qua phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA), phép thử LSD, bằng phần mềm SPSS 16.0, ở mức ý nghĩa  $p < 0,05$ .

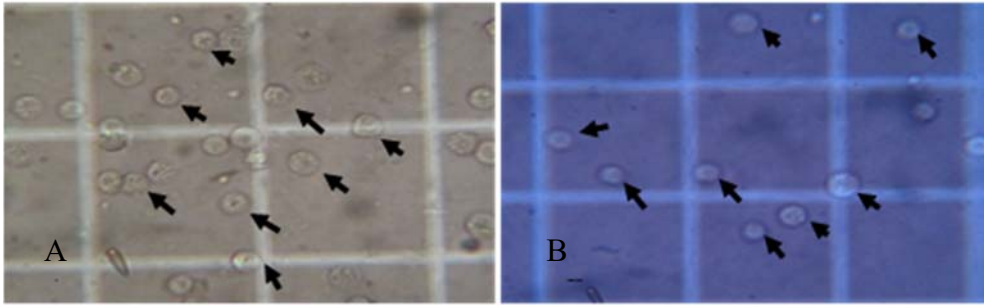
## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Kết quả nuôi tế bào thận và cơ của cá

Tế bào thận và sợi cơ của cá được nuôi trong môi trường nhân tạo L-15 được đánh giá dựa vào (1) mật độ của tế bào thận đưa vào giếng nuôi ban đầu và mật độ các tế bào thận bám dính xuống đáy giếng; (2) tỉ lệ sợi cơ gồm các sợi cơ bám dính xuống đáy giếng/tổng số sợi cơ quan sát trong giếng nuôi. Các tế bào thận sau khi được tách từ mô thận có dạng tế bào đơn, riêng lẻ, màu sắc tươi sáng (Hình 1), các tế

bào thận còn sống sẽ không bắt màu xanh của thuốc nhuộm trypan blue (Hình 1). Mật độ tế bào thận

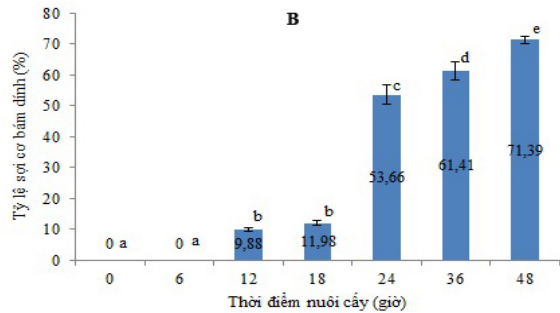
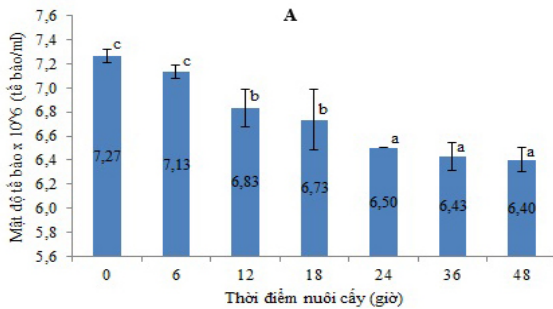
được nuôi cấy ban đầu ở mỗi giếng thí nghiệm là  $7,27 \times 10^6$  tế bào/mL.



**Hình 1: Tế bào thận cá tra (mũi tên); (A) Mẫu tươi và (B) mẫu nhuộm với Trypan blue (40X)**

Quá trình theo dõi sự bám dính của các tế bào thận cá nuôi trong L-15 cho thấy tế bào thận có khả năng sống sót trong 48 giờ nuôi cấy (Hình 2A). Trong 6 giờ đầu, mật độ tế bào thận giảm nhẹ, mật độ tế bào bám xuống đáy giếng là  $7,13 \times 10^6$  tế

bào/mL. Mật độ tế bào tiếp tục giảm đến thời điểm 24 giờ còn  $6,5 \times 10^6$  tế bào/mL và ổn định cho đến 48 giờ ( $6,4 \times 10^6$  tế bào/mL). Kết quả so sánh thống kê cho thấy mật độ tế bào thận khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

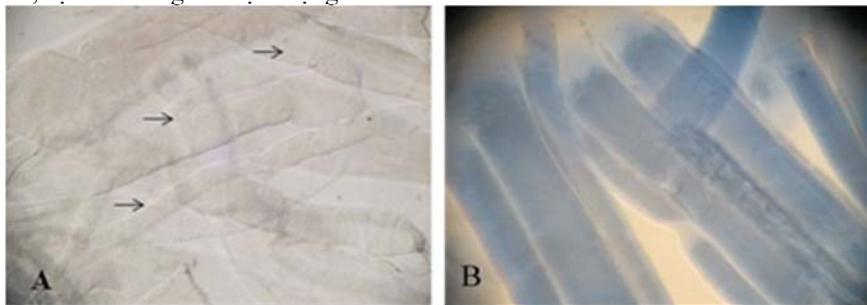


**Hình 2: Mật độ của tế bào thận cá (A) và tỉ lệ sợi cơ bám dính ở các thời điểm nuôi cấy (B)**

Ghi chú: Các cột có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

Đối với mẫu mô cơ cá tra, kết quả quan sát dưới kính hiển vi cho thấy sợi cơ có dạng sợi dài, riêng lẻ, màu sắc trong sáng (Hình 3) và bắt màu xanh nhạt của thuốc nhuộm trypan blue (Hình 3). Các mẫu cơ được bảo quản trong khoảng thời gian từ 2 giờ trước khi tiến hành phân lập đều cho kết quả nuôi cấy khá tốt, sợi cơ không có hiện tượng nhiễm

khẩn, các sợi cơ này có khả năng bám dính đáy đĩa nuôi cũng như khả năng sống cao ở tất cả các đĩa nuôi. Kết quả nuôi cấy các sợi cơ (chứa các tế bào cơ) được đánh giá thông qua khả năng sống, bám dính của tế bào được tiến hành sau khoảng thời gian 6, 12, 18, 24, 36, 48 giờ kể từ khi cho vào các giếng nuôi.



**Hình 3: Sợi cơ trong các giếng nuôi (mũi tên) (A); sợi cơ được nhuộm với trypan blue (B)**

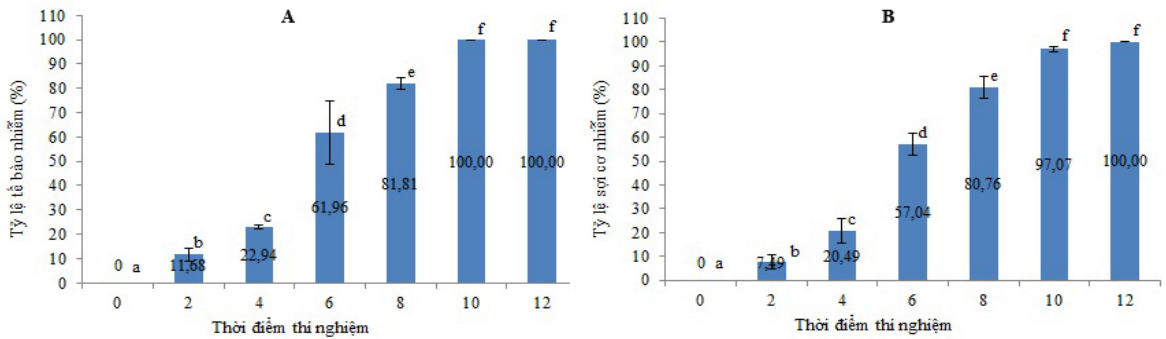
Kết quả cho thấy trong thời gian 6 giờ kể từ lúc nuôi, các sợi cơ chưa có hiện tượng bám dính. Sau

đó, các sợi cơ bắt đầu bám dính, ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy, đạt trung bình khoảng 53,66% so với mức 9,88% thời điểm 12 giờ nuôi cấy. Ở thời điểm 48

giờ nuôi cấy, tỉ lệ sợi cơ sống sót so với tổng số sợi cơ quan sát được đạt khoảng 71,39% (Hình 2B). Kết quả cho thấy tỉ lệ sợi cơ sống sót ở các thời điểm khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Việc nuôi cấy tế bào cơ và thận để phục vụ cho nghiên cứu đã có những thành công nhất định. Một số nghiên cứu đã sử dụng nuôi cấy tế bào cơ cá để tìm hiểu cách thức xâm nhập cũng như khả năng gây bệnh của vi bào tử trùng *Microsporidia* vào tế bào vật chủ (Kou *et al.*, 1995; Lores *et al.*, 2003).

### 3.2 Kết quả cảm nhiễm *Kabatana* sp. vào tế bào thận và cơ cá tra

Kết quả quan sát thí nghiệm tại thời điểm 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 giờ sau khi cảm nhiễm đã ghi nhận ở thời điểm 1 giờ sau cảm nhiễm, các bào tử vẫn chưa xâm nhập vào tế bào thận. Đến thời điểm 2 giờ, một số bào tử ở các giếng nuôi cấy bắt đầu kí sinh và phá hủy tế bào thận, tỉ lệ nhiễm trung bình ở thời điểm này là  $11,68 \pm 2,60\%$  tổng số tế bào. Kết quả so sánh thống kê cho thấy tỉ lệ nhiễm bào tử *Kabatana* sp. trên tế bào thận giữa các thời điểm quan sát khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

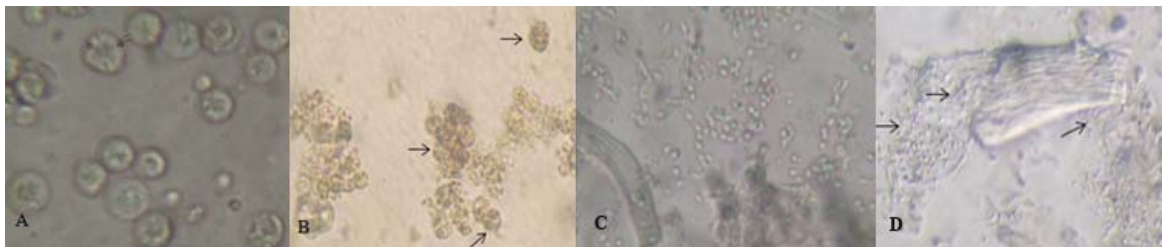


**Hình 4: Tỉ lệ nhiễm bào tử *Kabatana* sp. trên tế bào thận (A); tỉ lệ nhiễm bào tử *Kabatana* sp. của sợi cơ (B)**

Ghi chú: Các cột có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

Ở thời điểm 6 giờ, mức độ xâm nhiễm của bào tử đạt mức cao, với  $61,96 \pm 12,96\%$  tế bào bị nhiễm *Kabatana* sp. tăng gấp 6 lần so với thời điểm 2 giờ. Lúc này, màu sắc môi trường nuôi cấy L-15 ở các giếng thí nghiệm cảm nhiễm bắt đầu thay đổi từ màu hồng tươi chuyển dần sang màu hồng rất nhạt, một lượng lớn tế bào thận đã bị phá hủy, vì vậy mức độ tế bào thận bị xâm nhiễm tăng lên. Thời điểm 10 và 12 giờ, các tế bào thận đã bị bào tử xâm nhập và phá hủy hoàn toàn, 100% tế bào bị mất cấu trúc, các tế bào có biểu hiện bám dính lại với nhau, vách ngoài tế bào bị phá hủy, không còn liên mạch. Các vật chất bên trong tế bào bị đông vón và bị phá hủy theo mức độ nhiễm (Hình 5A, B).

Sau thời điểm 12 giờ, môi trường nuôi cấy ở các giếng cảm nhiễm đã mất màu hồng và môi trường chuyển sang trong suốt. Quan sát dưới kính hiển vi có thể thấy các tế bào thận đã bị xâm nhiễm và phá hủy trong các giếng cảm nhiễm. Thí nghiệm cảm nhiễm vẫn được tiếp tục theo dõi ở thời điểm 36 giờ và 48 giờ, dịch môi trường chứa bào tử nhiễm các tế bào thận cá được nhuộm với thuốc nhuộm SG và PI. Các mẫu nhuộm cho thấy các bào tử bắt màu xanh của thuốc nhuộm SG, tỉ lệ sống của bào tử là 100% sau 48 giờ cảm nhiễm. Từ kết quả trên cho thấy bào tử *Kabatana* sp. có thể được nuôi trong môi trường nuôi cấy bằng tế bào thận cá tra.



**Hình 5: Tế bào thận: (A) trước gây cảm nhiễm và (B) sau khi gây cảm nhiễm với bào tử *Kabatana* sp.; (C) bào tử sau 1 giờ cảm nhiễm vào sợi cơ; (D) bào tử bám vào đầu sợi cơ sau 2 giờ cảm nhiễm (mũi tên)**

Tương tự, kết quả cảm nhiễm vi bào tử *Kabatana* sp. vào sợi cơ được tổng hợp trong Hình 5. Quan sát thí nghiệm ở thời điểm 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 giờ sau khi gây cảm nhiễm thấy ở thời điểm 1 giờ sau cảm nhiễm, các bào tử có xu hướng tập trung bám vào phần đầu của sợi cơ, chưa xâm vào trong sợi cơ (Hình 5C, D). Đến thời điểm 2 giờ, các giếng nuôi cấy đã ghi nhận một số sợi cơ bị bào tử kí sinh. Theo đó, tỉ lệ nhiễm trung bình ở thời điểm này là  $7,49 \pm 3,02\%$  tổng số sợi cơ. Quan sát dưới kính hiển vi có thể thấy các sợi cơ bị bào tử trùng *Kabatana* sp. xâm nhập làm các sợi cơ mất cấu trúc, vách ngoài các sợi cơ bị phá hủy, rất nhiều các bào tử bám bên ngoài sợi cơ, đặc biệt là phần đầu các sợi cơ, vì vùng này có nhiều sợi cơ chứa tế bào cơ nên bào tử dễ dàng bám vào hơn bám bên ngoài sợi cơ. Kết quả so sánh thống kê cho thấy tỉ lệ nhiễm bào tử *Kabatana* sp. của sợi cơ giữa các thời điểm quan sát khác biệt có ý nghĩa ở mức  $p < 0,05$ .

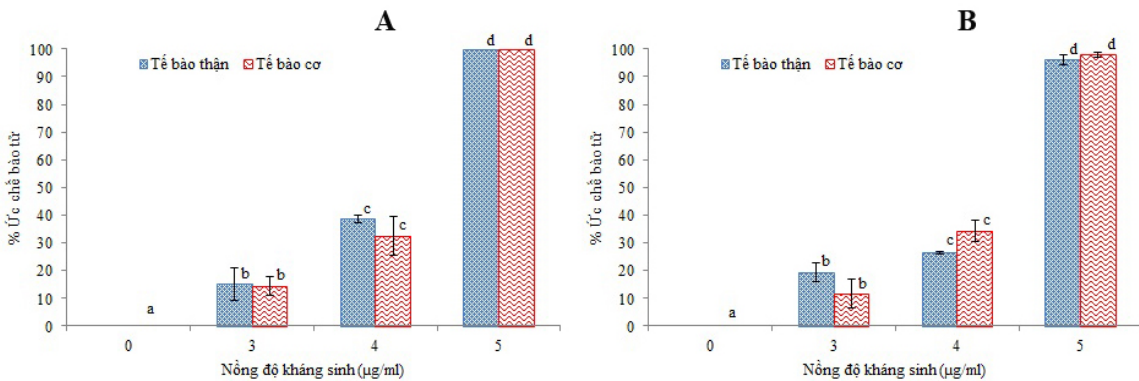
Thời điểm 8 giờ tỉ lệ xâm nhiễm của bào tử đạt  $80,76 \pm 4,61\%$ , sợi cơ bị nhiễm nhiều hơn, tăng gấp 11 lần so với thời điểm 2 giờ. Màu sắc môi trường nuôi cấy ở các giếng gây nhiễm với bào tử bắt đầu thay đổi từ màu hồng chuyển sang màu hồng rất nhạt. Thời điểm 12 giờ sau cảm nhiễm, quan sát bằng mắt thường có thể thấy các giếng cảm nhiễm đã mất màu hồng hoàn toàn và chuyển sang trong suốt. Quan sát cho thấy 100% các sợi cơ đã bị bào tử xâm nhập hoàn toàn. Dịch môi trường được quan sát dưới kính hiển vi 40X ghi nhận vi bào tử

*Kabatana* sp. vẫn vận động bình thường, sau đó tiếp tục nhuộm dịch mẫu với thuốc nhuộm SG và PI, kết quả cho thấy 100% bào tử bắt màu xanh dưới kính hiển vi huỳnh quang. Điều này chứng tỏ các bào tử vẫn phát triển bình thường trong môi trường.

Việc nuôi cấy vi bào tử trùng Microsporidia có ý nghĩa rất quan trọng trong những nghiên cứu chuyên sâu về cách thức lây nhiễm và gây bệnh cũng như các phương pháp phòng và điều trị bệnh do các loài vi bào tử trùng gây ra. Trước đây, đã có rất nhiều nghiên cứu gây cảm nhiễm vi bào tử trùng Microsporidia thành công với các dòng tế bào nuôi trong môi trường nhân tạo để nghiên cứu sâu hơn về bào tử của chúng. Điển hình là các nghiên cứu của Silveira và Canning (1995), Santillana-Hayat *et al.* (2002), Lores *et al.* (2003), Fenoy *et al.* (2009), Lallo *et al.* (2015). Các thí nghiệm cảm nhiễm vi bào tử trùng lên tế bào chủ cá đã giúp cho quá trình khảo sát hiệu quả của hóa chất và thuốc kháng kí sinh trùng tốt hơn trong việc phòng và điều trị bệnh do vi bào tử trùng gây ra.

### 3.3 Xác định khả năng ức chế của thuốc lên vi bào tử trùng *Kapatana* sp. gây nhiễm trong tế bào thận/cơ cá tra

Kết quả thí nghiệm gây cảm nhiễm vi bào tử trùng *Kapatana* sp. với tế bào thận/cơ cá tra có sử dụng thuốc albendazole cho thấy tỉ lệ bào tử bị ức chế tăng dần theo nồng độ thuốc, có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) (Hình 6A).



**Hình 6: Nồng độ thuốc của albendazole (A) và fumagillin (B) lên bào tử *Kabatana* sp. nhiễm trên tế bào thận và cơ cá tra sau 6 giờ cảm nhiễm**

Ghi chú: Các cột giống nhau có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ )

Tương tự, kết quả thí nghiệm gây cảm nhiễm vi bào tử *Kapatana* sp. với tế bào thận/cơ cá tra có sử dụng thuốc fumagillin cũng cho thấy tỉ lệ bào tử bị ức chế tăng dần theo nồng độ thuốc, có ý nghĩa thống kê ở mức  $p < 0,05$  (Hình 6B).

Đồ thị Hình 6A và 6B cho thấy sau 6 giờ cảm nhiễm, nghiệm thức sử dụng albendazole nồng độ 5

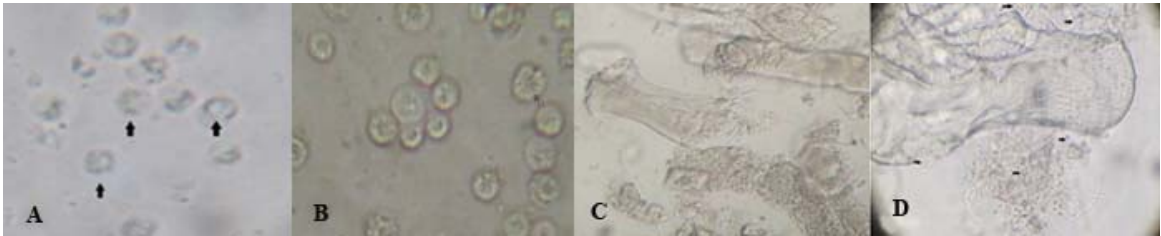
µg/mL, ức chế 100% bào tử *Kabatana* sp. Nghiệm thức sử dụng fumagillin (5 µg/mL) cũng có tác dụng ức chế gần hoàn toàn các bào tử, với tỉ lệ ức chế 96,16% ở nghiệm thức cảm nhiễm tế bào thận và ức chế 97,87% ở nghiệm thức cảm nhiễm sợi cơ. Trong khi đó, tỉ lệ ức chế bào tử ở nồng độ 3 và 4 µg/mL của loại thuốc albendazole, fumagillin ở các nghiệm thức rất thấp ( $\leq 35\%$ ).

Quan sát giéng nuôi tế bào thận/cơ cá (Đôi chúng 1-ĐC1) có sử dụng thuốc albendazole và fumagillin nồng độ 5 µg/mL, sau 48 giờ các tế bào thận/cơ của cá vẫn phát triển bình thường, không phát hiện sự suy giảm về số lượng của các tế bào thận cũng như sợi cơ. Điều này cho thấy thuốc kháng kí sinh trùng albendazole và fumagillin ở liều lượng 5 µg/mL không gây độc cho tế bào chủ và có thể sử dụng an toàn. Ở giéng ĐC2, tế bào thận và cơ vẫn phát triển bình thường trong môi trường L-15. Ở giéng ĐC3, môi trường L-15 không bị nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, ở giéng ĐC4-, cảm nhiễm với vi bào tử *Kabatana* sp. thì 100% tế bào thận và cơ cá đã bị bào tử xâm nhiễm làm biến đổi cấu trúc tế bào sau 12 giờ cảm nhiễm.

Ở các thí nghiệm cảm nhiễm bào tử với tế bào thận và sử dụng thuốc kháng kí sinh trùng, có thể quan sát bằng mắt thường các giéng nuôi cấy ở cả 3

thí nghiệm (NT) thấy có sự thay đổi màu sắc của môi trường. So sánh với giéng đối chứng âm (ĐC2: tế bào thận + môi trường L15), màu môi trường chuyển từ hồng đậm ở NT1 nhạt dần đến NT3. Quan sát cho thấy các tế bào thận đã bị bào tử *Kabatana* sp. xâm nhiễm và phá hủy cấu trúc tế bào.

Quan sát các thí nghiệm cảm nhiễm tế bào thận có sử dụng albendazole, ở thời điểm 2 giờ cảm nhiễm, vi bào tử *Kabatana* sp. vẫn hoạt động. Tuy nhiên, sau 4 giờ cảm nhiễm, albendazole nồng độ 3 µg/mL (NT3) có tác dụng ức chế bào tử khá thấp, 15,24% bào tử bị ức chế phát triển; nồng độ 4 µg/mL (NT2) bào tử bị ức chế 38,76%. Đối với các thí nghiệm thức có sử dụng fumagillin, tác dụng của thuốc lên vi bào tử *Kabatana* sp. cũng có sự thay đổi sau 4 giờ cảm nhiễm. Thuốc Fumagillin nồng độ 3 µg/mL (NT3) có tác dụng ức chế 19,29% bào tử, nồng độ 4 µg/mL (NT2) ức chế 26,45% bào tử.



**Hình 7: Tế bào thận (A) NT3 - tế bào thận bị mất cấu trúc - 40X; (B) NT1 - tế bào thận phát triển bình thường - 100X; sợi cơ cá tra (C) bào tử xâm nhiễm phá hủy cấu trúc sợi cơ; (D) bào tử dính lại thành cụm trên thành sợi cơ**

Kết quả quan sát dịch môi trường cảm nhiễm trên kính hiển vi cho thấy ở NT3 các tế bào thận bị vi bào tử xâm nhiễm gây hại, nồng độ thuốc albendazole và fumagillin (3 µg/mL) không hoàn toàn ức chế bào tử *Kabatana* sp. Tuy nhiên, ở NT1 với nồng độ thuốc 5 µg/mL thì rõ ràng màu sắc dịch môi trường không khác biệt nhiều so với giéng đối chứng, kết quả quan sát dịch môi trường cảm nhiễm cho thấy ở nồng độ này thuốc có khả năng ức chế vi bào tử gây hại cho tế bào. Tương tự, màu sắc ở các giéng nuôi sợi cơ cũng có sự thay đổi màu môi trường theo nồng độ thuốc. Màu môi trường chuyển từ hồng ở NT1 nhạt dần đến NT2 và chuyển sang màu vàng nhạt ở NT3. Quan sát dịch môi trường NT2 và NT3 trên kính hiển vi cho thấy nhiều sợi cơ đã bị bào tử *Kabatana* sp. xâm nhiễm và phá hủy cấu trúc vách sợi cơ.

Tác động của thuốc albendazole và fumagillin lên vi bào tử *Kabatana* sp. khi gây nhiễm với tế bào cơ cũng cho kết quả tương tự như gây nhiễm trên tế bào thận. Đối với abendazole, ở NT3, nồng độ thuốc 3 µg/mL không ức chế hiệu quả bào tử, nên hầu hết các sợi cơ bị bào tử xâm nhiễm làm ảnh hưởng vách sợi cơ, tỉ lệ ức chế chỉ đạt 14,45 % bào tử; ở nồng độ 4 µg/mL (NT2) tỉ lệ ức chế 32,53%. Với

fumagillin, nồng độ 3 µg/mL (NT3) ức chế 11,53 % bào tử, nồng độ 4 µg/mL (NT2) ức chế 34,31%. Riêng NT1, với nồng độ 5 µg/mL, cả albendazole và fumagillin đã ức chế bào tử, các bào tử bị bất hoạt và thường dính lại với nhau thành cụm (Hình 7). Như vậy, từ kết quả thí nghiệm cho thấy albendazole và fumagillin có thể được sử dụng trong điều trị bệnh do vi bào tử trùng *Kabatana* sp. kí sinh trong cơ của cá. Nồng độ của albendazole và fumagillin có tác dụng hiệu quả ức chế vi bào tử trùng là 5 µg/mL. Benzimidazole thuộc nhóm thuốc có phổ diệt kí sinh trùng khá rộng nên được sử dụng khá rộng rãi, các loại thuốc này có tác dụng ngăn chặn sự hình thành các vi ống của bào tử Microsporidia. Khi các vi ống này bị phá hủy, các chức năng vận chuyển, chuyển hóa và hấp thụ glucose và glycogen của bào tử bị ức chế dẫn đến bị tiêu diệt hoàn toàn (Kappagoda *et al.*, 2011). Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận albendazole có khả năng tiêu diệt các loài vi bào tử trùng như: *E. Cuniculi*, *G. anomala*; *V. Corneae*, *E. Intestinalis*; *Nosema* sp. với các nồng độ thuốc khác nhau từ 55 ng/mL đến 50µg/L (Didier *et al.*, 2006; Lallo *et al.*, 2013; Nayaka, 2016).

Theo Didier *et al.* (2006), Athanassopoulou *et al.* (2009), Selzer (2009), nhóm thuốc kháng sinh

fumagillin được điều chế từ loài nấm *Aspergillus fumigatus* và đã được sử dụng vào những năm 1950 để điều trị bệnh do Microsporidia gây ra. Fumagillin có tác dụng ức chế sự sao chép DNA và RNA của các loài vi bào tử trùng Microsporidia. Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận fumagillin có khả năng tiêu diệt các loài vi bào tử trùng như: *E. intestinalis*, *V. corneae*, *Loma salmonae*, *Nosema ceranae* với các nồng độ thuốc khác nhau từ 0,515 ng/mL đến 25 µg/L (Didier, 1998; Speare *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2013).

#### 4 KẾT LUẬN

Tế bào thận và sợi cơ của cá tra có khả năng sống sót trong môi trường L-15. Kết quả cảm nhiễm bào tử vào tế bào thận và cơ cho thấy sau 2 giờ cảm nhiễm, các tế bào bị bào tử xâm nhập với tỉ lệ nhiễm là 11,68±2,60% tổng số tế bào thận và 7,49±3,02% tổng số sợi cơ. Thời điểm 12 giờ sau khi cảm nhiễm, 100% các tế bào thận và sợi cơ bị bào tử xâm nhiễm. Thuốc albendazole và fumagillin nồng độ 5 µg/mL có khả năng ức chế *Kabatana* sp. nhiễm trong tế bào thận/cơ cá tra, có thể áp dụng trong điều trị bệnh gao do vi bào tử trùng *Kabatana* sp. kí sinh trong cơ cá tra.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Athanassopoulou, F., I.S. Pappas and K. Bitchava, 2009. An overview of the treatments for parasitic disease in Mediterranean aquaculture. *Options Méditerr Ser A*, 86, pp.65-83.

Beauvais, B., C. Sarfati, S. Challier and F. Derouin, 1994. In vitro model to assess effect of antimicrobial agents on *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 38: 2440-2448.

Didier, E.S., J.A. Maddry, C.D. Kwong, L.C. Green, K.F. Snowden and J.A. Shaddock, 1998. Screening of compounds for antimicrosporidial activity in vitro. *Folia Parasitologica*. 45(2): 129-139.

Didier, P.J., J.N. Phillips, D.J. Kuebler, M. Nasr, P.J. Brindley, M.E. Stovall, L.C. Bowers and E.S. Didier, 2006. Antimicrosporidial activities of Fumagillin, TNP-470, Ovalicin and Ovalicind in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50: 2146–2155.

Fenoy, S., C. Rueda, M. Higes, R. Martín-Hernandez and C. del Aguila, 2009. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Applied and environmental microbiology*. 75: 6886–6889.

Huang, W.F., L.F. Solter, P.M. Yau and B.S. Imai, 2013. *Nosema ceranae* escapes Fumagillin control in honey bees. *PLoS Pathogen*. 9: 1-9.

Kappagoda, S.M.D., S.M.U. Singh, and B.G. Blackburn, 2011. Antiparasitic Therapy. *Mayo Clinic Proceedings*. 86: 561-583.

Kou, G.H., C.H. Wang, H.W. Hung, Y.S. Jang, C.M. Chou and C.F. Lo, 1995. A cell line (EP-1 cell line) derived from “Beko disease” affected Japanese eel elver (*Anguilla japonica*) persistently infected with *Pleistophora anguillarum*. *Aquaculture*. 132: 161–173.

Lallo, M.A., L.F.V. Costa and J.M. Castro, 2013. Effect of three drugs against *Encephalitozoon cuniculi* infection in immunosuppressed fish. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57: 3067–3071.

Lallo, M.A., L.F.V. Costa, A.M. Alvares-Saraiva, P.R.D.A. Rocha, D.D. Spadacci-Morena, F.T. Camargo and I.B. Suffredini, 2015. Culture and propagation of microsporidia of veterinary interest culture of microsporidia. *The Journal of Veterinary Medical Science*.

Lom, J. and F. Nilsen, 2003. Fish microsporidia: fine structural diversity and phylogeny. *International Journal for Parasitology*. 33: 107–127.

Lores, B., M.J. Rosales, C. Mascaró and A. Osuna, 2003. In vitro culture of *Glugea* sp. *Veterinary Parasitology*. 112: 185–196.

Monaghan, S.R.M., 2011. Use of Fish Cell Cultures for the Study and Cultivation of Microsporidia. A thesis presented to the University of Waterloo in fulfillment of the thesis requirement for the degree of Doctor of Philosophy in Biology. Waterloo, Ontario, Canada.

Nayaka, A.R.N., 2016. Effect of new microsporidian infection on the relevant economic characters of silkworm and its management. Ph.D. Thesis: Studies on the newly isolated Microsporidian species (NIK-5hm) infecting silkworm.

Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011. Kết quả nghiên cứu bước đầu về bệnh gao ở cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Kỷ yếu Hội nghị Khoa học Thủy sản lần 4, Trường Đại học Cần Thơ*. Trang 262-269.

Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012. Xác định nhóm kí sinh trùng tạo bào nang trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*. 22c: 155-164.

Nguyễn Thị Thu Hằng, Đặng Thị Hoàng Oanh, 2016. Xác định mầm bệnh vi bào tử trùng (Microsporidia) nhiễm trong cơ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ sinh học*: 42: 101-110.

Peng, Y., T.F. Lee-Pullen, K. Heel, A.H. Millar and B. Baer, 2013. Quantifying spore viability of the honey bee pathogen *Nosema apis* using flow cytometry. *Cytometry Part A*. 85: 454-462.

Santillana-Hayat, M., C. Sarfati, S. Fournier, F. Chau, R. Porcher, J.M. Molina and F. Derouin, 2002. Effects of chemical and physical agents on viability and infectivity of *Encephalitozoon*



- intestinalis determined by cell culture and flow cytometry. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 46: 2049–2051.
- Schmahl, G, A. Toukhy and F.A. Ghaffar, 1990. Transmission electron microscopic studies on the effects of toltrazuril on *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (Microsporidia) infecting the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Parasitology Research*. 76: 700-706.
- Seeley, K.R, P.D. Gillespie and B.A. Weeks. 1990. A simple technique for the rapid spectrophotometric determination of phagocytosis by fish macrophages. *Marine Environmental Research*. 30:123-8.
- Selzer, P.M., 2009. Antiparasitic and Antibacterial Drug Discovery. From Molecular Targets to Drug Candidates. British Library Cataloguing Publication.
- Silveira, H. and E.U. Canning, 1995. In vitro cultivation of the human microsporidium *Vittaforma corneae*: development and effect of Albendazole. *Folia parasitologica*. 42: 241-250.
- Speare, D.J., F. Athanassopoulou, J. Daley and J.G. Sanchez, 1999. A Preliminary Investigation of Alternatives to Fumagillin for the Treatment of *Loma salmonae* Infection in Rainbow Trout. *Journal of Comparative Pathology*. 121: 241–248.
- Woo, P.T.K., 2006. Fish diseases and disorders, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections. University of Guelph Canada. pp 205-230.