

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.061

TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG C-TYPE LECTIN TỪ TÔM THẺ CHÂN TRẮNG *Litopenaeus vannamei* TRONG HỖ TRỢ ĐIỀU TRỊ BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP DO VI KHUẨN *Vibrio parahaemolyticus* TRÊN TÔM NUÔI

Nguyễn Thị Phương Thảo^{1,2,3} và Trần Văn Hiếu^{2,3*}

¹Trường Đại học Tiền Giang

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh

³Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Văn Hiếu (email: tvhieu@hcmus.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/01/2020

Ngày nhận bài sửa: 07/05/2020

Ngày duyệt đăng: 29/06/2020

Title:

Potential applications of C-type lectin from white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* in prevention of acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus* in farmed shrimp

Từ khóa:

C-type lectin, hoại tử gan tụy cấp, miễn dịch bẩm sinh, protein tái tổ hợp, thụ thể nhận diện kiểu mẫu, *Vibrio parahaemolyticus*

Keywords:

Acute hepatopancreatic necrosis disease, C-type lectin, innate immunity, pattern recognition receptor, recombinant protein, *Vibrio parahaemolyticus*

ABSTRACT

Similar to other invertebrates, shrimp lectin repertoires are ample and complex. Until now, seven lectin families have been identified in shrimp. Considering their abundance and diversity, C-type lectin (CTL) occupies important positions in the shrimp immune system. It plays important roles in innate immune responses as pattern recognition receptors, opsonins, and involved in cell signaling. Recently, a CTL from white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* was identified able to agglutinate *Vibrio parahaemolyticus*, which is the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. The application of genetic engineering and recombinant protein for enhancing CTL expression when using as supplemented probiotics in feed is an approach that helps prevent bacteria in general and *V. parahaemolyticus* in particular. This review proposes a specific approach from genes to recombinant proteins and discuss the potential applications of C-type lectin from white leg shrimp *L. vannamei* in prevention of AHPND-causing *V. parahaemolyticus* in farmed shrimp.

TÓM TẮT

Tương tự như ở các động vật không xương sống khác, lectin của tôm rất phong phú và phức tạp. Cho đến nay, bảy loại lectin từ tôm đã được xác định. Khi đánh giá sự đa dạng và phong phú của chúng, C-type lectin (CTL) chiếm vị trí quan trọng trong hệ thống miễn dịch của tôm. Chúng đóng vai trò quan trọng trong các đáp ứng miễn dịch bẩm sinh như là các thụ thể nhận diện kiểu mẫu, opsonin hóa và tham gia vào truyền tín hiệu tế bào. Gần đây, một CTL từ tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* được xác định có khả năng gây ngưng kết vi khuẩn Gram âm *Vibrio parahaemolyticus*, tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm. Việc ứng dụng kỹ thuật gene và protein tái tổ hợp có thể giúp tăng cường biểu hiện CTL này để sử dụng như là lợi khuẩn bổ sung vào thức ăn đang là một cách tiếp cận giúp tôm phòng bệnh cho vi khuẩn nói chung và *V. parahaemolyticus* nói riêng. Báo cáo này đề xuất cách tiếp cận mới từ protein tái tổ hợp và phân tích tiềm năng sử dụng CTL từ tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* trong hỗ trợ điều trị bệnh hoại tử gan tụy cấp do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm nuôi.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Phương Thảo và Trần Văn Hiếu, 2020. Tiềm năng ứng dụng C-type lectin từ tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* trong hỗ trợ điều trị bệnh hoại tử gan tụy cấp do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* trên tôm nuôi. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(3B): 121-133.

1 GIỚI THIỆU

Từ lâu, ở Việt Nam, kháng sinh đã được sử dụng phổ biến trong phòng và điều trị các bệnh trên tôm. Tuy nhiên, các nước thuộc Liên minh Châu Âu đã ban hành lệnh cấm sử dụng đối với một số loại kháng sinh từ 2022 (Ryan, 2018); và mới đây Việt Nam đã cam kết hướng đến việc loại bỏ kháng sinh khỏi thực phẩm chăn nuôi từ năm 2018 (BNN&PTNN, 2017). Vì vậy, việc phát triển một giải pháp phòng ngừa vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, tác nhân chính gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND, acute hepatopancreatic necrosis disease), không sử dụng kháng sinh là một yêu cầu cấp thiết.

Tôm là sinh vật thuộc lớp động vật không xương sống, chưa có hệ miễn dịch hoàn chỉnh như lớp động vật hữu nhũ. Cụ thể, tôm không có hệ miễn dịch thích ứng mà chỉ có hệ miễn dịch bẩm sinh nên không tạo đáp ứng nhớ miễn dịch được hay nói cách khác không thể tạo vaccine cho tôm. Giải pháp hỗ trợ hệ miễn dịch bẩm sinh với các chất kích thích miễn dịch giúp tăng cường đáp ứng bất giữ và loại bỏ vi sinh vật gây bệnh, kể cả vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây AHPND. Các nghiên cứu gần đây trên hệ miễn dịch của tôm cho thấy họ protein C-type lectin (CTL) đóng vai trò quan trọng trong cơ chế phòng vệ của tôm với tác nhân xâm nhiễm. CTL hoạt hóa các cơ chế chống lại vi sinh vật như hoạt hóa enzyme phenoloxidase, tăng cường quá trình thực bào, tăng hoạt tính kháng khuẩn/kháng virus, opsonin hóa và có thể đóng vai trò trong việc tái tạo mô tổn thương (Cerenius *et al.*, 2010). CTL tái tổ hợp đã được chứng minh có vai trò trong việc tăng cường quá trình thực bào, tăng hoạt tính kháng khuẩn/kháng virus và opsonin hóa *in vitro*.

Lectin là protein/glycoprotein có khả năng liên kết thuận nghịch bằng các liên kết không cộng hóa trị với carbohydrate mà không làm thay đổi cấu trúc của chúng. Lectin có thể gắn kết với những tế bào có glycoprotein hoặc glycolipid bề mặt vi sinh vật (Lis and Sharon, 1998). Chính vì vậy, lectin được coi là ứng cử viên quan trọng cho vai trò là thụ thể nhận dạng kiểu mẫu (pattern recognition receptor, PRR) trong miễn dịch bẩm sinh của động vật và đóng vai trò quan trọng trong nhận diện và giải phóng các vi sinh vật xâm nhập, hoặc như thụ thể bề mặt tế bào hoặc như protein hòa tan tồn tại trong dịch tuần hoàn (circulating fluids) (Christophides *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2004). Sự hiện diện của hai hay

nhều vị trí gắn kết đối với mỗi phân tử lectin cho phép nó gắn kết nhiều loại tế bào khác nhau (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009). Họ protein lectin ở tôm rất phong phú và đa dạng với ít nhất 8 loại khác nhau được tìm thấy là CTL, L-type lectin, M-type lectin, P-type lectin, galectin và calnexin dựa vào cấu trúc và tính đặc hiệu với các loại đường khác nhau của vùng nhận diện carbohydrate (carbohydrate recognition domain, CRD). Trong số các loại, CTL là đa dạng nhất và được nghiên cứu kỹ lưỡng nhất (Zhang *et al.*, 2009c).

CTL là họ lectin đặc trưng bởi việc chứa ít nhất một vùng CRD (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009). Tên của nhóm lectin này xuất phát từ việc CTL gắn đặc hiệu với carbohydrate trên bề mặt tác nhân gây bệnh thông qua CRD cần có sự hiện diện của ion Ca^{2+} . CRD là vùng nhận diện carbohydrate của CTL, có cấu trúc gồm 110 đến 130 gốc amino acid (Ofek, 2000). CRD có một vùng gấp cuộn đặc và được giữ ổn định bởi hai cầu nối disulfide, ngoài ra còn có 4 vùng gắn với Ca^{2+} tham gia vào việc giữ vững liên kết giữa carbohydrate và phân tử liên quan đến mầm bệnh (PAMP) (Vasta, 1999). Một số CTL được phát hiện ở động vật không xương sống như côn trùng, tuyến trùng, giáp xác,... có chức năng loại bỏ tác nhân xâm nhiễm bằng cách ngưng kết hoặc giết vi sinh vật, tăng hiện tượng melamine hóa, kích thích các tế bào máu đóng gói tác nhân xâm nhiễm hoặc thúc đẩy việc truyền tín hiệu để tạo ra đáp ứng miễn dịch (Wang, 2014). Các thụ thể này có thể được kích hoạt biểu hiện khi có sự xâm nhiễm của tác nhân hoặc một số chất kích thích (Ofek, 2000). CTL từ tôm hiện nhiên sở hữu các ưu điểm trên, tương tự như các động vật không xương sống còn lại. Chúng đóng vai trò quan trọng trong các đáp ứng miễn dịch bẩm sinh như là các thụ thể nhận diện kiểu mẫu, opsonin hóa và tham gia vào truyền tín hiệu tế bào. Gần đây, các nghiên cứu ứng dụng CTL từ tôm trong hỗ trợ điều trị bệnh trên thế giới đã thu được nhiều kết quả khả quan, điển hình là nhiều CTL từ tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* có khả năng gây ngưng kết vi khuẩn Gram âm *V. parahaemolyticus*, tác nhân gây AHPND trên tôm. Trong khi đó, các nghiên cứu tương tự cũng như các đánh giá sơ bộ về thuận lợi cũng như khó khăn của việc ứng dụng CTL từ tôm trong hỗ trợ điều trị điều trị AHPND ở Việt Nam vẫn chưa được ghi nhận đến thời điểm hiện tại. Vì vậy, mục tiêu của bài viết sẽ tập trung phân tích các tiềm năng và giải pháp của việc ứng dụng CTL từ tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* trong hỗ trợ điều trị AHPND do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm nuôi.

2 NỘI DUNG

2.1 Tình hình dịch bệnh AHPND và tác nhân gây bệnh

2.1.1 Tình hình dịch bệnh AHPND trên thế giới

Nuôi trồng thủy sản là ngành kinh tế quan trọng đóng góp đáng kể trong thị phần xuất khẩu của nhiều nước trên thế giới. Trong số các đối tượng nuôi, tôm đem lại lợi ích kinh tế nhiều nhất. Theo công bố của Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hiệp Quốc, sản lượng tôm toàn thế giới trong hai thập kỷ qua tăng hơn 4 lần từ 1 triệu (1998) lên 4,2 triệu tấn (2017). Với hiệu quả kinh tế và xã hội to lớn như vậy nên nuôi tôm thực sự trở thành nghề sản xuất thu hút nhiều nhà đầu tư.

Sự phát triển bùng nổ nghề nuôi tôm ngoài mặt lợi còn có mặt trái khi có rất nhiều thay đổi và khó khăn suốt hai thập kỷ qua. Ước tính tổng thiệt hại trung bình hàng năm do dịch bệnh ở tôm gây ra trên thế giới khoảng 2 tỷ USD (Shinn *et al.*, 2018). Theo thống kê, đến nay có khoảng 20 loài virus, 4 loài vi khuẩn, 3 loài nấm và một số động vật nguyên sinh gây bệnh trên tôm (Muhammad *et al.*, 2013). Gần đây, AHPND gây thiệt hại nặng nề cho nghề nuôi tôm. Bệnh được ghi nhận đầu tiên năm 2009 ở Trung Quốc, ở Việt Nam năm 2010 sau đó lan sang nhiều nước trên thế giới. Chỉ trong hai năm bùng phát (2011-2013), sản lượng tôm thế giới giảm khoảng 15% tương đương thiệt hại 3 tỉ đô la. Chỉ riêng ở Mexico và Bắc bán cầu, AHPND gây thiệt hại khoảng 118 triệu USD (Schryver *et al.*, 2014). Năm 2011 và 2012, Việt Nam mất khoảng 7,2 triệu USD do dịch bệnh này (Tran *et al.*, 2013).

2.1.2 Tình hình dịch bệnh AHPND ở Việt Nam

Với hơn 700.000 ha đất ngập mặn, Việt Nam là quốc gia có nhiều tiềm năng phát triển nghề nuôi tôm nước lợ và hiện là một trong 5 quốc gia đứng đầu về xuất khẩu tôm của thế giới. Trong đó, Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) được đánh giá có tiềm năng lớn nhất nước, đã và đang phát triển nhanh trong những năm gần đây. Theo thống kê của Tổng cục Thủy sản (2018), chỉ riêng năm 2018 kim ngạch xuất khẩu tôm đạt 3,58 tỷ USD, trong đó tôm thẻ chân trắng đạt 2,48 tỷ USD với sản lượng 492,3 nghìn tấn. Tuy nhiên, cùng với mức độ thâm canh hóa ngày càng cao và sự gia tăng về diện tích, tình

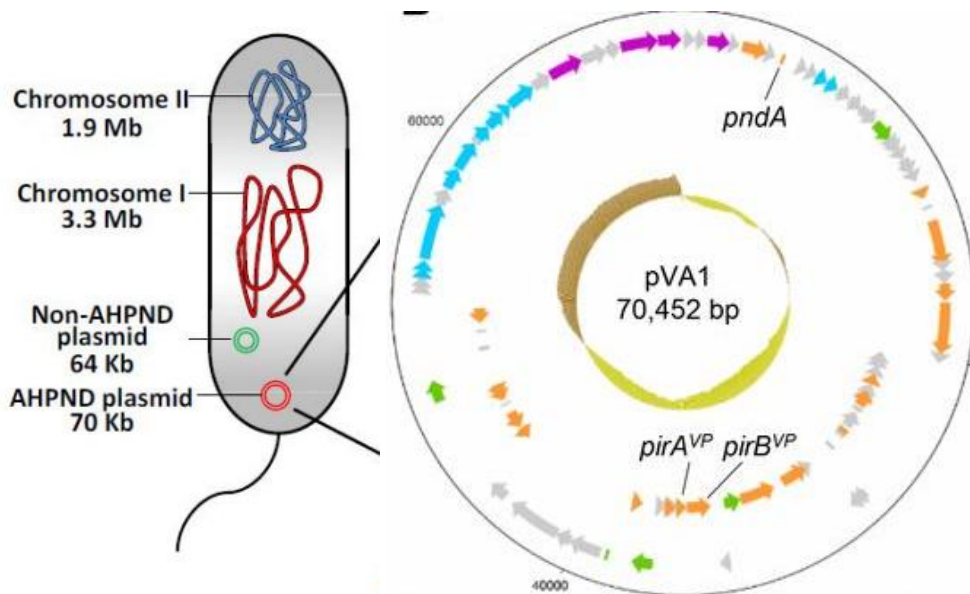
hình dịch bệnh diễn ra ngày càng nhiều trên diện rộng và khó kiểm soát, đe dọa nghiêm trọng đến năng suất và sự phát triển bền vững của nghề nuôi tôm (Walker and Mohan, 2009; Flegel, 2012).

Tại ĐBSCL, năm 2015 AHPND trên tôm thẻ chân trắng gây thiệt hại 8,9 triệu đôla và trên tôm sú là 1,8 triệu đôla (Hội nghị Nuôi trồng thủy sản Châu Âu, 2016). Theo báo cáo của Tổng cục Thủy sản, kết quả điều tra 5 tháng đầu năm 2017, diện tích tôm trên cả nước bị bệnh AHPND là 1.557 ha. trong đó các tỉnh thuộc ĐBSCL chịu thiệt hại nặng nhất đứng đầu là Bạc Liêu (chiếm hơn 25,7% tổng diện tích tôm bệnh), tiếp đó là các Sóc Trăng, Kiên Giang, Trà Vinh... Tình hình dịch bệnh nêu trên cho thấy đề phát triển bền vững nghề nuôi tôm đòi hỏi phải kết hợp rất nhiều yếu tố quan trọng. Các yếu tố đó bao gồm nghiên cứu hoàn thiện quy trình sản xuất giống, vấn đề về dinh dưỡng và môi trường; đồng thời không kém phần quan trọng đó là nghiên cứu tìm ra biện pháp phòng trị bệnh hiệu quả.

2.1.3 Tác nhân *Vibrio parahaemolyticus* gây AHPND

Tác nhân đầu tiên gây AHPND trên tôm được xác định là vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (Tran *et al.*, 2013). Một số chủng *V. parahaemolyticus* mang plasmid khoảng 69–70 kb chứa gene PirA và PirB mã hóa cho hai độc tố ToxA (16 kDa), ToxB (50 kDa) xâm nhiễm vào đường tiêu hóa của tôm (Wangman *et al.*, 2017). Độc tố tấn công và phá hủy các tế bào chức năng của gan tụy, làm cho tế bào bong tróc mất chức năng tạo điều kiện cho sự nhiễm trùng thứ cấp dẫn đến tôm chết sớm.

V. parahaemolyticus có khả năng chịu đựng nhiều ngưỡng khác nhau của độ mặn, pH và nhiệt độ cũng như có thể dễ dàng bám vào tảo biển và được mang đi khắp nơi theo dòng chảy. Mặt khác, vi khuẩn này còn có khả năng ký sinh trên các loài giáp xác và động vật thủy sinh khác nên sẽ gây thiệt hại ở nhiều lần thả nuôi tiếp theo. Vì là loài phổ biến nên *V. parahaemolyticus* phân bố ở hầu hết các cửa biển và trong các hệ sinh thái nước ngọt. Do chủng *V. parahaemolyticus* gây ra AHPND phân bố rộng rãi ở các môi trường và điều kiện sống khác nhau nên có thể dễ dàng giải thích vì sao AHPND dễ lây lan, bùng phát và vô cùng khó khăn trong việc ngăn chặn hoặc kiểm soát dịch bệnh nguy hiểm này.



Hình 2: Plasmid mang gene gây bệnh AHPND (Lee et al., 2015)

V. parahaemolyticus gây bệnh AHPND khi cư trú trong dạ dày và ruột tôm. Chúng tập hợp và hình thành màng sinh học (biofilms) khi bám vào lớp kitin trên bề mặt dạ dày giống như cách hình thành lớp mùn bã hữu cơ trên bề mặt đáy ao. Màng sinh học này ngăn chặn sự tấn công của kháng sinh và các vi sinh vật khác muốn cạnh tranh chỗ bám với chúng trên bề mặt dạ dày. Cụ thể, lớp màng này hình thành bằng cách vi khuẩn tiết chất keo (exopolymer) của chúng giúp chúng bám trên bề mặt dạ dày để rồi sau đó chúng bắt đầu nhân lên và lớp màng bao này ngày càng hoàn thiện. Màng sinh học exopolysaccharide này có tác dụng bảo vệ chúng chống lại kháng sinh, chất sát trùng, các hoạt chất chiết xuất từ thảo dược và các phương pháp điều trị khác... trong khi vẫn cho phép vi khuẩn hoạt động trao đổi chất bình thường (Mshana et al., 2013; Hong and Jang, 2016).

Do tính chất phức tạp của *V. parahaemolyticus* nên việc khống chế AHPND càng trở nên khó khăn hơn. Điều này giải thích vì sao kháng sinh hầu như không ngăn chặn được sự lây nhiễm của AHPND vì nếu kháng sinh không có khả năng tiếp xúc với tác nhân gây bệnh ở mức đủ để ảnh hưởng thì kháng sinh hoàn toàn không hiệu quả. Đây là một ví dụ điển hình về việc sử dụng kháng sinh không mang lại hiệu quả mặc dù vẫn có những trường hợp dùng kháng sinh để điều trị bệnh tôm. Tóm lại, *V. parahaemolyticus* có khả năng ẩn mình trong lớp màng bao sinh học và bảo vệ chúng khỏi những chất mà về cơ bản có thể giết chết chúng đặt ra một thách

thức lớn cho các nhà nghiên cứu trong việc phát triển các phương pháp khống chế bệnh AHPND.

2.2 Phân loại, vị trí biểu hiện và cơ chế phân tử của C-type lectin tôm

2.2.1 Phân loại

CTL tôm hiện có thể được chia thành ba nhóm nhỏ dựa trên thành phần và tổ chức của domain, gồm có: nhóm chỉ chứa một CTLD (C-type lectin domain), nhóm chứa hai CTLD, và nhóm gồm một CTLD và một domain khác (Wang et al., 2013). Trong đó, nhóm chỉ chứa một CTLD là phổ biến hơn cả so với một số ít CTL tôm chứa hai CTLD.

2.2.2 Vị trí biểu hiện

Tương ứng với gan ở động vật có vú, gan tụy là cơ quan đóng vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch của tôm. Do đó, mô này đương nhiên là nguồn cung cấp chính nhiều loại CTL (Gross et al., 2001). Hầu hết các CTL tôm chỉ biểu hiện trong gan tụy, như PmLec (Luo et al., 2006), PmAV (Luo et al., 2007), PmLT (Ma et al., 2008), LvLT (Ma et al., 2007), Fc-Lec2 (Zhang et al., 2009b), Fc-Lec3 (Wang et al., 2009a), Fc-Lec4 (Wang et al., 2009b). Mặc dù một số CTL khác, chẳng hạn như FcLec1, LvCTL1 cũng tồn tại trong dạ dày và ruột nhưng mức độ biểu hiện của các gene này trong gan tụy cao hơn nhiều lần so với trong các mô khác (Sun et al., 2008b; Zhang et al., 2009a; Zhao et al., 2009). Hemocyte tôm tham gia vào đáp ứng miễn dịch chủ yếu qua thực bào và đóng gói, nhưng chúng cũng rất quan trọng trong quá trình tạo thụ thể nhận biết miễn dịch (Cheng et al., 2005; Lin et al., 2008). Do đó,

một số CTL chủ yếu chỉ biểu hiện trong hemocyte tiêu biểu như LvCTL3 (Li *et al.*, 2014), LvLdlrCTL (Liang *et al.*, 2019) trong khi sản phẩm phiên mã của Fclectin chỉ có thể được phát hiện trong các tế bào hemocyte mà không tìm thấy trong gan tụy, ruột và các cơ quan bạch huyết (Liu *et al.*, 2007). Ngoài tế bào gan và tế bào máu, dạ dày cũng là mô chủ chốt để lưu trữ các sản phẩm phiên mã của CTL tôm, tiêu biểu ở LvCL1, FcLec1 dù được biểu hiện ở mức độ thấp. Một số trường hợp ngoại lệ, điển hình như LvLec được phát hiện có biểu hiện trong não ở mức độ cao hơn nhiều so với tế bào gan và tế bào hemocyte; nguyên nhân có thể là do LvLec tham gia vào sự phát triển của hệ thống thần kinh tôm và đóng vai trò duy trì cân bằng nội môi não (Zhang *et al.*, 2009c).

2.2.3 Cơ chế phân tử của CTL trong đáp ứng miễn dịch ở tôm

Giống như các động vật không xương sống khác, tôm phụ thuộc vào hệ thống miễn dịch không đặc hiệu để bảo vệ trước những mầm bệnh truyền nhiễm khác nhau. Do đó có hạn chế so với động vật có xương sống là không tạo ra được kháng thể đáp ứng lại kháng nguyên lạ xâm nhập. Hệ thống miễn dịch bẩm sinh này bao gồm hai cơ chế là miễn dịch tế bào và miễn dịch thể dịch. Trong đó, miễn dịch tế bào là các hoạt động được thực hiện bởi tế bào máu: thực bào, thể bao bao bọc mầm bệnh, thể hạch tạo khối u bao vây vật thể lạ xâm nhập và sau đó phá hủy thông qua hệ thống hoạt hóa prophenoloxidase. Đáp ứng miễn dịch dịch thể rất nhanh và hiệu quả bao gồm các yếu tố nhận biết, chẳng hạn như các cơ chế tác động bao gồm đông máu, sản xuất peptide kháng khuẩn (Tassanakajon *et al.*, 2018). Các phản ứng miễn dịch tế bào bao gồm nhận biết mầm bệnh, tiêu diệt và thải loại bằng thực bào, bắt động bằng bẫy ngoại bào hoặc đóng gói các vi sinh vật lớn hơn (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2015).

Phản ứng miễn dịch bẩm sinh được kích hoạt bởi các PRR như Toll-like receptor và các lectin. Hơn 10 loại PRR khác nhau được tìm thấy trong tôm (Wang *et al.*, 2013). Trong số các PRR này, các CTL rất quan trọng trong việc nhận biết các gốc carbohydrate được hiển thị trên bề mặt vi khuẩn (PAMPs). CTL là một họ protein đa dạng về cấu trúc đặc trưng bởi sự nhận biết phối tử phụ thuộc calcium thông qua C-type carbohydrate recognition domain (CRD). Bằng cách nhận ra glycans của vi sinh vật, CRD chịu trách nhiệm về vai trò của CTL là thụ thể nhận dạng kiểu mẫu (PRR) trong đáp ứng miễn dịch bẩm sinh. Tuy nhiên, vai trò của CTL trong đáp ứng miễn dịch của tôm đối với vi khuẩn

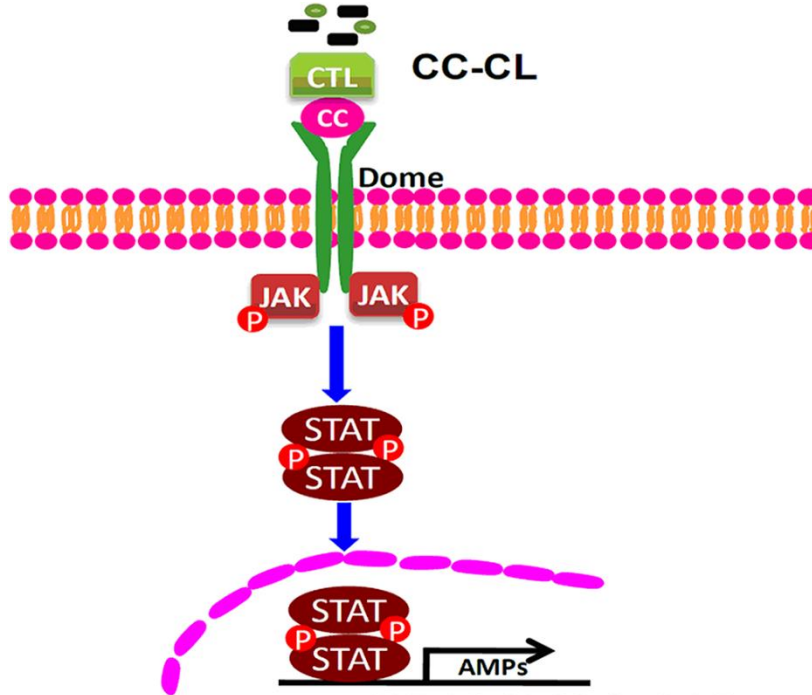
vẫn chưa được hiểu rõ (Sun *et al.*, 2008b; Wang *et al.*, 2013). Các CRD tôm có thể nhận ra glycans của virus hoặc vi khuẩn, và do đó làm bất động các vi sinh vật xâm nhập. CTL cũng có thể tạo ra các phản ứng miễn dịch nhằm mục đích tiêu diệt loại bỏ tác nhân xâm nhập. Đối với một số CTL tôm, các chức năng miễn dịch bẩm sinh của chúng như phagocytosis, kích hoạt phenoloxidase đã được mô tả (Wang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014), mặc dù các cơ chế phân tử vẫn chưa rõ ràng. Gần đây, một CTL (MjHeCL) ngoài việc nhận ra glycans của vi sinh vật thông qua CRD còn sở các đặc tính như ức chế sự tăng sinh của hemolymph microbiota bằng cách duy trì biểu hiện của peptide kháng khuẩn (Wang *et al.*, 2014). Tuy nhiên, cơ chế của sự biểu hiện AMP này ở tôm bằng CTL vẫn chưa rõ ràng.

Bước ngoặt trong khám phá ở cấp độ phân tử về cơ chế tác động của CTL khi MjCC-CL, một CTL mới, được chứng minh có thể điều hòa biểu hiện của AMP dựa trên tín hiệu của cơ chế JAK/STAT (janus kinase/signal transducer and activator of transcription) dẫn đến kích hoạt việc sao chép năm loại AMP (Sun *et al.*, 2017). Cơ chế JAK/STAT phổ biến cho cả động vật không xương sống và động vật có xương sống có khả năng kiểm soát nhiều quá trình sinh học bao gồm phát triển, tăng trưởng và sống sót, cân bằng nội mô và đáp ứng miễn dịch của tế bào (Agaïsse *et al.*, 2004; Stark *et al.*, 2012). Kích hoạt cơ chế JAK/STAT và điều hòa biểu hiện AMP ở tôm diễn ra khi CTLD của MjCC-CL nhận ra các vi khuẩn. Khi đó, CCD (coiled-coil domain) của MjCC-CL sẽ tương tác với ILR domain của Dome receptor. Yếu tố phiên mã STAT được phosphoryl hóa và di chuyển vào nhân, kết quả sẽ cảm ứng sự biểu hiện của AMP. Kích hoạt cơ chế JAK/STAT chịu trách nhiệm cho việc loại bỏ mầm bệnh vi khuẩn xâm nhập bằng cách điều hòa biểu hiện của AMP.

Cơ chế JAK/STAT đóng vai trò làm trung gian cho tác động của lượng lớn các cytokine và yếu tố tăng trưởng. Nó được kích hoạt sau khi có sự hình thành liên kết của một cytokine hoặc yếu tố tăng trưởng với thụ thể tương ứng của nó. Cho đến nay, hơn 50 cytokine và các yếu tố tăng trưởng đã được chứng minh là sử dụng cơ chế này để điều chỉnh sự phát triển của tế bào, biệt hóa, vận động và phản ứng miễn dịch. Cơ chế JAK/STAT có mặt khắp nơi ở động vật có xương sống nhưng cũng như ở một số động vật không xương sống, bao gồm cả tôm. Các thành phần cốt lõi của cơ chế JAK/STAT trong tôm đảm nhận chức năng quan trọng trong khả năng miễn dịch kháng khuẩn. Các mầm bệnh vi khuẩn trực tiếp kích hoạt cơ chế JAK/STAT thông qua

CTL có chứa một coiled-coil domain và một CTL domain (MjCC-CL) trong tôm. Hoạt động như một phối tử của cytokine, MjCC-CL liên kết với các polysaccharide từ vi khuẩn và domain ILR của Domeless, tạo ra sự phosphoryl hóa STAT và

chuyển vị trí vào nhân, để từ đó biểu hiện một số peptide kháng khuẩn (antimicrobial peptides, AMPs). MjCC-CL, vừa là thụ thể nhận dạng kiểu mẫu của vi khuẩn, vừa là phối tử của Dome để làm trung gian kích hoạt cơ chế JAK/STAT.



Hình 2: MjCC-CL hoạt hóa trực tiếp cơ chế truyền tín hiệu JAK/STAT để điều hòa sự biểu hiện của AMP (Sun et al., 2017)

2.3 Các biện pháp giúp nâng cao miễn dịch trên tôm

Vì tôm thuộc nhóm giáp xác nên không thể sử dụng vaccine mà chỉ có thể sử dụng các biện pháp tăng cường hiệu quả đáp ứng miễn dịch thông qua cải thiện điều kiện môi trường nuôi bằng chế phẩm probiotics và hỗ trợ kích thích miễn dịch.

2.3.1 Chất kích thích miễn dịch

Là hợp chất hóa học làm tăng sức đề kháng của tôm giúp chống lại các bệnh do virus, vi khuẩn, nấm và ký sinh trùng; tiêu biểu có β -glucan tác động lên hệ miễn dịch của tôm theo cơ chế như sau:

– Đối với miễn dịch dịch thể: kích thích sản sinh peptide kháng khuẩn (antimicrobial peptides) như crustin, lectin, lysozyme... từ đó làm tăng khả năng kháng khuẩn.

Đối với miễn dịch tế bào: kích thích melanin hóa và gia tăng thực bào. Các bạch cầu hạt sản xuất ra melanin sẽ bao phủ và tiêu diệt tế bào vi khuẩn, sau đó phóng thích ra ngoài lớp vỏ kitin. Trong quá trình thực bào, chất oxi hóa mạnh có vai trò tiêu diệt vi

khẩn gồm các gốc oxi nguyên tử, gốc hydroxyl và hydrogen peroxide cũng được sinh ra.

Tuy nhiên, chống chỉ định sử dụng trong trường hợp: (1) đang tiến hành hoạt động gây stress cho tôm; (2) mức độ phơi nhiễm bệnh gia tăng đã biết trước; (3) các giai đoạn phát triển nhạy cảm với tác nhân gây bệnh. Mặt khác, nếu sử dụng ở giai đoạn bệnh đang trầm trọng thì chất kích thích miễn dịch có thể trở thành tác nhân gây nhiễm bệnh trên tôm, làm cho bệnh trầm trọng thêm. Do đó, mục tiêu đặt ra là cần phải tìm biện pháp hữu hiệu hơn giúp nâng cao miễn dịch ở tôm.

2.3.2 Probiotics

Probiotics là lượng lớn vi sinh vật có lợi phát triển nhằm chống lại sự phát triển của vi sinh vật gây hại, gồm những vi khuẩn sinh lactic acid như *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Enterococcus* và *Streptococcus*, được chứng minh có tác dụng đến khả năng miễn dịch, kháng bệnh và các chỉ số hoạt động khác của tôm. Probiotics bổ sung vào thức ăn và xử lý nước được

chứng minh có tác dụng nâng cao miễn dịch trên tôm nuôi. Khi được bổ sung trong khẩu phần ăn, sẽ giúp củng cố số lượng vi khuẩn có lợi qua đó thiết lập cơ chế phòng ngừa mầm bệnh hữu hiệu bằng cách cạnh tranh nơi ở và dinh dưỡng với vi khuẩn gây bệnh. Hơn nữa, việc tăng cường các vi khuẩn có lợi trong đường ruột giúp cải thiện quá trình tiêu hóa nguồn dinh dưỡng và năng lượng của tôm. Quan trọng hơn cả là lợi khuẩn tạo ra một số protein kháng khuẩn như lactoferrin, bacteriocin, ... có khả năng chống lại một số vi khuẩn Gram âm, Gram dương và virus gây bệnh.

Cùng với đó ao nuôi tôm tích lũy lượng lớn chất hữu cơ gây tình trạng thiếu oxy và tạo điều kiện thuận lợi cho sự hình thành các loại khí độc ảnh hưởng đến sức khỏe của tôm. Sự gia tăng các chất độc cũng thay đổi thành phần vi sinh vật trong môi trường đất, nước và đáy ao, đặc biệt là gia tăng mật độ vi sinh vật gây bệnh. Probiotics giúp biến đổi hệ vi sinh vật trong môi trường nuôi, cải thiện chất lượng môi trường nước bằng cách phân hủy các chất hữu cơ trong nước nhanh hơn. Do đó nâng cao khả năng sử dụng và giá trị dinh dưỡng của thức ăn từ đó nâng cao đáp ứng của tôm với mầm bệnh.

2.3.3 *Lactobacillus* trong nuôi trồng thủy sản

Lactobacillus được dùng rộng rãi trong thủy sản như chủng *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii* và *Lb. helveticus* được sử dụng như chế phẩm sinh học (Gatesoupe *et al.*, 1991; Carnevali *et al.*, 2004). Ngoài kiểm soát mầm bệnh, nâng cao chất lượng nước chúng còn kích thích gia tăng tốc độ tăng trưởng (Gatesoupe *et al.*, 1991). Chủng *Lb. acidophilus* giúp nâng cao tốc độ tăng trưởng, kích thích hoạt động của hệ miễn dịch và tăng khả năng kháng bệnh do vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* và *Streptococcus iniae* khi cảm nhiễm trên cá rô phi (Aly *et al.*, 2008). *Lb. rhamnosus* ATCC 53101 khi trộn vào thức ăn trong 51 ngày giúp giảm tỷ lệ cá chết khi cảm nhiễm vi khuẩn *Aeromonas salmonicida* từ 53% xuống 19% so với đối chứng (Nikoskelainen *et al.*, 2001). *Lb. rhamnosus* giúp cá rô phi chống lại vi khuẩn gây bệnh *Edwardsiella tarda* khi cảm nhiễm (Pirarat *et al.*, 2006). Còn *Lb. fructivorans* và *Lb. plantarum* phân lập từ ruột cá tráp làm giàu hóa trên luân trùng *B. plicatilis* và *Artemia* sau đó cho cá tráp ăn giúp cá tăng khả năng chống chịu với điều kiện stress. Sử dụng *Lb. fructivorans* và *Lb. plantarum* giúp giảm đáng kể tỷ lệ chết của cá tráp giai đoạn ấu trùng (Carnevali *et al.*, 2004). Chủng *Lb. plantarum* CLFP 238 trộn vào thức ăn cho cá hồi cầu vồng trong 30 ngày ở hàm lượng 10^7 CFU/g giúp giảm tỷ lệ chết

đáng kể so với đối chứng khi gây cảm nhiễm bằng vi khuẩn *Lactococcus garvieae*. Hỗn hợp *Lb. plantarum*, *Lb. salivarius* và *Lb. rhamnosus* bổ sung vào môi trường nước giúp tăng tỷ lệ sống của ấu trùng cá (Aukrust and Blom, 1992). Trong số các chủng *Lactobacillus*, hai chủng vi khuẩn có hiệu quả cao và được nghiên cứu nhiều nhất trong nuôi trồng thủy sản là *Lb. plantarum* và *Lb. lactis*.

2.4 Khả năng gắn kết đặc hiệu của CTL tôm

Cấu trúc của các CTL chứa một module duy nhất bảo tồn khoảng 150 amino acid (carbohydrate recognition domain, CRD) (Drickamer *et al.*, 1993). Domain này chứa một vòng kép đặc trưng được ổn định bởi hai cầu nối disulfide bảo tồn cao và bốn vị trí gắn kết C; trong đó vị trí liên kết C liên quan đến vị trí gắn với carbohydrate (Zelensky *et al.*, 2005). CRD thường có một motif chính, hoặc QPD (Gln-Pro-Asp) hoặc EPN (Glu-Pro-Asn), được dự đoán là gắn đặc hiệu với ligand của galactose hoặc mannose tương ứng. Gần đây nhiều CTL chứa các CRD không chuẩn, nghĩa là không gắn với carbohydrate đã được xác định. Chúng được coi là tương tác với những ligand không phải carbohydrate và những CRD này được gọi là C-type lectin like domain (CTLD) (Zelensky *et al.*, 2005). Điều này cho thấy tiềm năng rất lớn để thu nhận nhiều CTL chuyên biệt với nhiều ligand khác nhau.

2.4.1 Gắn kết với monosaccharide

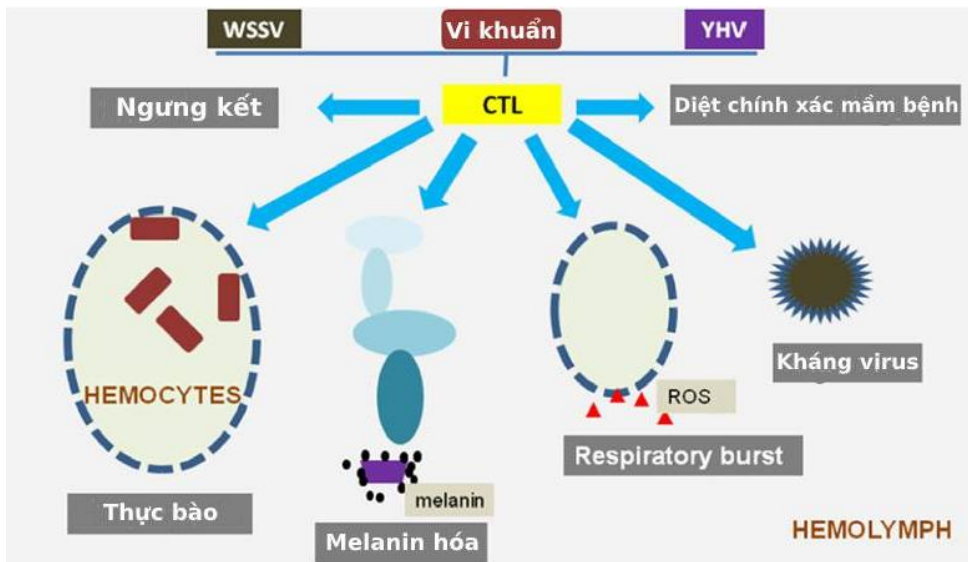
Khả năng gắn kết đặc hiệu của lectin chủ yếu được xác định bằng phương pháp ức chế ngưng kết (agglutinating inhibition assays). Đối với nhiều loại CTL tôm, N-acetylated sugars gây ức chế hiệu quả nhất. N-Acetylneuraminic acid (NeuAC) có thể ức chế hemagglutination (HA), hiệu quả khác nhau tùy loại CTL chẳng hạn như LVL (CTL từ *L. vannamei*) và FC-L (từ *Fenneropenaeus chinensis*) ở nồng độ rất thấp (Sun *et al.*, 2008a); đối với các CTL tôm khác là tương đối cao đối với các loại từ *F. merguensis*, *Litopenaeus setiferus* và *Penaeus monodon* (Alpuche *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2005; Rittidach *et al.*, 2007). So với NeuAC, các N-acetylated monosaccharides khác như GlcNAc, ManNAc và Gal-Nac có khả năng giảm ức chế HA. Có vẻ như N-acetylation là cần thiết, hoặc ít nhất là tạo điều kiện thuận lợi cho monosaccharide ức chế HA của các loại CTL. FC-L từ *F. chinensis* nhận diện Gal-Nac, ManNAc và GlcNAc trong khi nó không thể gắn kết với các loại đường không acetyl hóa (Sun *et al.*, 2008a). Hiện tượng tương tự đã được quan sát thấy ở *F. merguensis* FmL (Rittidach *et al.*, 2007). Khả năng ức chế của monosaccharide đối với LsL từ *L. setiferus* tăng sau khi N-acetyl hóa

(Alpuche *et al.*, 2005). Tuy nhiên, trường hợp ngược lại với PmLec từ *P. monodon* vì nó nhận ra galactose và glucose, nhưng không phải là dẫn xuất N-acetylated của chúng (Luo *et al.*, 2006). Mặt khác, vị trí gắn kết với canxi số 2 trong CTLD cho thấy thành phần gắn kết đặc hiệu với đường (mannose hoặc galactose) của protein tương ứng với motif mà nó mang. FcLec1, LvLec và LvCTL1 có chứa motif EPN thể hiện khả năng gắn kết với mannose (Sun *et al.*, 2008b; Zhang *et al.*, 2009b; Zhao *et al.*, 2009), trong khi CTL chứa motif QPD như PmLec lại liên kết với galactose (Luo *et al.*, 2006).

2.4.2 Gắn kết với các PAMP

Là các PRR nên CTL sở hữu khả năng gắn kết với một số thành phần của thành tế bào vi khuẩn. Sự tương tác giữa carbohydrate và CTL đã được nghiên cứu thông qua enzyme-linked immunosorbent assay (Wang *et al.*, 2009b; Xu *et al.*, 2010). CTL tôm có phổ gắn kết khá rộng vì có thể gắn kết với LPS, peptidoglycan, lipoteichoic acid,... Khả năng gắn kết với LPS có thể do sự tương đồng trong cấu trúc của NeuAC và 2-keto-3-deoxyoctonate, tạo nên lõi polysaccharide kỵ nước của LPS (Rostam-Abadi and Pistole, 1982).

CTL tôm được chứng minh tham gia vào một loạt các phản ứng miễn dịch bẩm sinh bao gồm nhận dạng mầm bệnh, ngưng kết vi khuẩn, đáp ứng diệt vi sinh vật và kháng virus, tăng cường opsonin hóa cũng như đóng gói tế bào (Wang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Xiu *et al.*, 2015). Trong những năm gần đây nhiều CTL đã được ghi nhận từ tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* (Zhao *et al.*, 2009; Junkunlo *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014), tôm thẻ chân trắng Trung Quốc *F. chinensis* (Sun *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009c; Wang *et al.*, 2009b; Xu *et al.*, 2010), tôm sú *P. monodon* (Wongpanya *et al.*, 2017). Hầu hết các loại CTL tôm được phân lập từ thư viện cDNA của gan tụy hoặc hemocyte, tùy thuộc vào từng loại CTL chẳng hạn như sản phẩm phiên mã của Fclectin chỉ được phát hiện trong hemocyte, trong khi sản phẩm phiên mã của LLT PmLT, Fc-hsL, Fc-lec và LvCTL1 biểu hiện đặc biệt cao ở gan tụy. Flec4 lại được tìm thấy trong nhiều loại mô khác nhau từ gan tụy, mang, dạ dày và mức độ thấp hơn cũng có thể được phát hiện trong ruột, đặc biệt L Lec lại có biểu hiện cao nhất trong não (Zhang *et al.*, 2009c). Do đó, việc khám phá CTL mới từ tôm rất quan trọng để phát triển các công cụ và chiến lược để phòng và hỗ trợ điều trị các dịch bệnh trên tôm nuôi.



Hình 3: Các chức năng của CTL khi có hemolymph hiện diện (Wang *et al.*, 2013)

Các nghiên cứu gần đây đã xác định được một loại CTL có hoạt tính kháng virus và kháng vi khuẩn từ tôm thẻ trắng *L. vannamei*. CTL tái tổ hợp này được biểu hiện ở *E. coli* có khả năng ngưng kết vi khuẩn Gram âm *V. parahaemolyticus* khi có sự hiện diện của ion Ca^{2+} trong thử nghiệm *in vitro*. Các thử nghiệm *in vivo* cho thấy protein CTL tái tổ hợp có

thể giảm đáng kể tỷ lệ chết của tôm khi có sự xâm nhiễm của *V. parahaemolyticus* gây AHPND và bệnh đốm trắng, cho thấy CTL này đóng vai trò quan trọng trong phản ứng miễn dịch chống lại vi khuẩn và virus (Li *et al.*, 2014).

2.5 Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước về CTL từ tôm

Vì những hiệu quả do CTL trên hệ miễn dịch nên việc khám phá và thu nhận những CTL từ những loài tôm khác nhau đã được các nhà khoa học trên thế giới thực hiện từ hơn hai thập niên qua và vẫn đang được tiếp tục. Các kết quả thu nhận được rất đáng khả quan, có khá nhiều CTL từ tôm được chứng minh có khả năng gắn hoặc ngưng kết một số loại vi khuẩn và virus, trong đó có vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra AHPND. Một số các nghiên cứu tiêu biểu về CTL có nguồn gốc từ tôm có hoạt tính gắn hoặc ngưng kết vi khuẩn/virus trong thời gian gần đây: Năm loại CTL được thu nhận từ tôm *F. chinensis* là FcLec1 (Sun *et al.*, 2008), FcLec2 (Zhang *et al.*, 2009c), FcLec3 và FcLec4 (Wang *et al.*, 2009b), FcLec5 (Xu *et al.*, 2010) được ghi nhận có khả năng ngưng kết vi khuẩn *Vibrio anguillarum* và *Edwardsiella tarda*. Một số CTL từ tôm lại có khả năng gắn với virus, cụ thể là ba loại CTL gồm MjLecA, MjLecB, MjLecC được thu nhận từ tôm *Metanephrops japonicus* (Song *et al.*, 2010) được chứng minh có gắn với protein của virus gây bệnh đốm trắng; Hai loại CTL được thu nhận từ tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* là LvCTL1 (Zhao *et al.*, 2009) và LvCTL2 (Wei *et al.*, 2012) được ghi nhận có khả năng gắn với virus gây bệnh đốm trắng và các protein cấu trúc của nó; Một CTL khác cũng từ tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* là LvCTLD (Junkunlo *et al.*, 2011) được ghi nhận có khả năng gắn với virus gây bệnh đầu vàng ở tôm. Đặc biệt, một CTL từ tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* là LvCTL3 (Li *et al.*, 2014) đã được chứng minh có khả năng gây ngưng kết vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, bên cạnh khả năng kháng khuẩn và kháng virus của CTL này. Trong khi đó, chưa có nghiên cứu ở trong nước về CTL từ tôm thẻ chân trắng cũng như khảo sát khả năng CTL gắn vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được ghi nhận đến thời điểm hiện tại.

2.6 Tiềm năng ứng dụng CTL trong hỗ trợ điều trị AHPND do *V. parahaemolyticus* tại Việt Nam

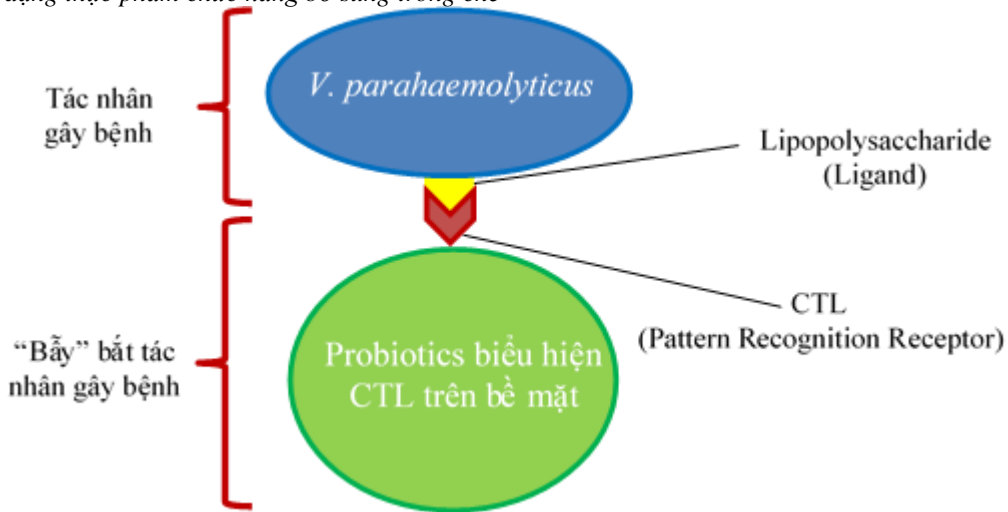
Những ưu điểm của CTL trong việc hỗ trợ miễn dịch trên tôm và gắn vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đã làm tiền đề cho các nghiên cứu sử dụng CTL trong phòng và hỗ trợ điều trị các bệnh trên tôm nói chung và AHPND do *V. parahaemolyticus* nói riêng. Tuy nhiên, để có thể sử dụng với số lượng lớn thì không thể chỉ sử dụng CTL tách chiết từ tôm thẻ chân trắng mà cần phải sản xuất CTL tái tổ hợp. Việc sản xuất protein tái tổ

hợp thường được bắt đầu bằng việc lựa chọn “nhà máy sản xuất protein”, và *Escherichia coli* là chủng vi sinh vật thường được lựa chọn nhất để sử dụng. Ưu điểm của hệ thống biểu hiện này là dễ thực hiện, hệ thống lên men không phức tạp, không đòi hỏi trang thiết bị, vật tư đắt tiền. Tuy nhiên, việc sản xuất protein tái tổ hợp bằng *E. coli* cũng gặp rất nhiều bất lợi, nhất là đối với các protein có nguồn gốc từ eukaryote nói chung (là đối tượng chính để sản xuất protein tái tổ hợp). Các protein tái tổ hợp có nguồn gốc eukaryote được sản xuất từ *E. coli* thường phải qua giai đoạn tái gấp cuộn rất phức tạp. Để khắc phục điều này, các hệ thống biểu hiện khác đã được sử dụng bên cạnh hệ thống lâu đời là *E. coli* như *Saccharomyces*, *Bacillus*, ... đã đạt được nhiều thành công nhất định và ngày càng có nhiều protein tái tổ hợp được sản xuất ra từ những hệ thống này. Phương pháp này ứng dụng công nghệ DNA tái tổ hợp bằng cách dùng các chủng vi sinh vật, cụ thể là probiotics, như *Saccharomyces*, *Bacillus*, ... làm giá thể biểu hiện protein ngoại lai trên bề mặt tế bào. Đây là giải pháp đã được nhiều nhà khoa học sử dụng trong việc biểu hiện nhiều loại protein và bước đầu đã tạo được thành công nhất định (Fredriksen *et al.*, 2010; Christophe *et al.*, 2015; Minic *et al.*, 2015).

Từ các ưu điểm trên nên nếu ứng dụng vào thực trạng AHPND trên tôm ở Việt Nam hiện nay, tiềm năng của phương pháp sử dụng các kỹ thuật của sinh học phân tử hiện đại mà cụ thể là công nghệ gene và protein tái tổ hợp để tạo và phát triển các “bẫy” sử dụng vi sinh vật probiotics biểu hiện protein tái tổ hợp CTL trên bề mặt tế bào nhằm bắt đặc hiệu vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây AHPND là rất lớn. Cụ thể, “bẫy” sẽ hoạt động theo nguyên tắc: lipopolysaccharides (đóng vai trò là phối tử, ligand) trên bề mặt vi khuẩn *V. parahaemolyticus* sẽ liên kết với protein tái tổ hợp CTL (đóng vai trò là thụ thể nhận diện kiểu mẫu, pattern recognition receptor) được biểu hiện ngay trên bề mặt vi sinh vật probiotics, khiến cho vi khuẩn *V. parahaemolyticus* sẽ bị ngưng kết lại và lắng xuống môi trường nuôi hoặc hệ tiêu hoá của tôm khiến chúng không hoạt động bình thường được nữa. Phương pháp này không chỉ có lợi đơn mà còn có lợi kép ở chỗ có thể sử dụng được ưu điểm của chủng probiotics vốn đã được chứng minh rất có hiệu quả trong hỗ trợ tăng cường miễn dịch của tôm (Mục 4). Điều quan trọng là các probiotics mà cụ thể là nhiều chủng *Saccharomyces cerevisiae* và *Lb. plantarum* đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (Food and Drug Administration, FDA) công nhận là GRAS (Generally Regard As Safe), tức là vi

sinh vật an toàn có thể sử dụng được trên người. Đây là giấy thông hành cực kỳ quý giá vì GRAS chỉ được cấp cho các chế phẩm dạng thực phẩm, thuốc và phụ gia khi chúng đạt được hiệu quả và an toàn cho người sử dụng. Vì vậy, đạt được chứng nhận này đồng nghĩa với việc có thể yên tâm sử dụng các chủng probiotics này trong sản xuất các chế phẩm dưới dạng thực phẩm chức năng bổ sung trong chế

độ ăn của tôm mà không phải lo lắng về tính an toàn. Do đó, chiến lược ứng dụng công nghệ gene để đính protein CTL lên bề mặt của GRAS để sử dụng như là một chế phẩm lợi khuẩn bổ sung trực tiếp vào thức ăn của tôm đang là cách tiếp cận đầy hứa hẹn giúp phòng và hỗ trợ điều trị bệnh AHPND do *V. parahaemolyticus*.



Hình 4: Mô hình “bẫy” bắt vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

3 KẾT LUẬN

Thông qua các tóm tắt về cơ chế phân tử cũng như cơ chế nhận diện và gắn đặc hiệu của CTL trước các tác nhân vi sinh vật, bài viết đã trình bày và phân tích về cách tiếp cận mới khi sử dụng công nghệ gene và protein tái tổ hợp trong ứng dụng CTL từ tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* với mục tiêu hỗ trợ điều trị bệnh hoại tử gan tụy cấp. Qua đó cho thấy được tiềm năng rất lớn của việc ứng dụng CTL từ tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* trong hỗ trợ điều trị bệnh hoại tử gan tụy cấp do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm nuôi hiện nay ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Sở Khoa và học Công nghệ tỉnh Tiền Giang trong khuôn khổ Đề tài mã số ĐTNN 05/19.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Agaisse, H., and Perrimon, N., 2004. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunological Reviews*. 198(1): 72-82.

Alpuche, J., Pereyra, A., Agundis, C., and Rosas, C., 2005. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Biochimica et*

Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 1724(1-2): 86-93.

Aly, S.M., Ahmed, Y.A.G., Ghareeb, A.A.A., and Mohamed, M.F., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology*. 25(1-2): 128-136.

Aukrust, T., and Blom, H., 1992. Transformation of *Lactobacillus* strains used in meat and vegetable fermentations. *Food Research International*. 25(4): 253-261.

BNN&PTNT (Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn), 2017. Quyết định số 2625/QĐ-BNN-TY, ngày 21/06/2017 về việc “Kế hoạch Hành động Quốc gia về Quản lý sử dụng kháng sinh và phòng chống kháng kháng sinh trong chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản”, ngày truy cập 01/01/2020. Địa chỉ <http://www.cucthuy.gov.vn/Pages/thong-bao-chi-.aspx>.

Carnevali, O., Zamponi, M.C., Sulpizio, R., and Rollo, A., 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquaculture International*. 12(4-5): 377-386.

Cerenius, L., Kawabata, S.I., Lee, B.L., Nonaka, M., and Söderhäll, K., 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate

- immunity. *Trends in Biochemical Sciences*. 3(10): 575-583.
- Cheng, W.T., Liu, C.H., Tsai, C.H., and Chen, J.C., 2005. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide and β -1, 3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*. 18(4): 297-310.
- Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., and Birney, E., 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*. 298(5591): 159-165.
- Christophe, M., Kuczkowska, K., Langella, P., Eijnsink, V.G., Mathiesen, G., and Chatel, J.M., 2015. Surface display of an anti-DEC-205 single chain Fv fragment in *Lactobacillus plantarum* increases internalization and plasmid transfer to dendritic cells in vitro and in vivo. *Microbial Cell Factories*. 14(1): 95.
- Drickamer, K., and Taylor, M.E., 1993. Biology of animal lectins. *Annual review of cell biology*. 9: 237-264.
- Flegel, T.W., 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 110(2): 166-173.
- Fredriksen, L., Mathiesen, G., Sioud, M., and Eijnsink, V.G., 2010. Cell wall anchoring of the 37-kilodalton oncofetal antigen by *Lactobacillus plantarum* for mucosal cancer vaccine delivery. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(21): 7359-7362.
- Gatesoupe, F.J., 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*. 96(3-4): 335-342.
- Geijtenbeek, T.B., and Gringhuis, S.I., 2009. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature Reviews Immunology*. 9(7): 465-479.
- Gross, P.S., Bartlett, T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W., and Warr, G.W., 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp *L. setiferus*. *Developmental & Comparative Immunology*. 25(7): 565-577.
- Hong, S., and Jang, J., 2016. Biofilm removal using carbon dioxide aerosols without nitrogen purge. *Journal of Visualized Experiments*. (117): e54827.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., and Söderhäll, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. 211(4): 213-236.
- Junkunlo, K., Prachumwat, A., Tangprasittipap, A., and Senapin, S., 2012. A novel lectin domain-containing protein (LvCTLD) associated with response of the whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* to yellow head virus (YHV). *Developmental & Comparative Immunology*. 37(3-4): 334-341.
- Li, H., Zhang, H., Jiang, S., and Wang, W., 2015. A single-CRD C-type lectin from oyster *Crassostrea gigas* mediates immune recognition and pathogen elimination with a potential role in the activation of complement system. *Fish & Shellfish Immunology*. 44(2): 566-575.
- Li, M., Li, C., Ma, C., and Li, H., 2014. Identification of a C-type lectin with antiviral and antibacterial activity from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology*. 46(2): 231-240.
- Liang, Z., Yang, L., Zheng, J., Zuo, H., Weng, S., and Xu, X., 2019. A low-density lipoprotein receptor (LDLR) class A domain-containing C-type lectin from *Litopenaeus vannamei* plays opposite roles in antibacterial and antiviral responses. *Developmental & Comparative Immunology*. 92: 29-34.
- Lin, Y.C., Vaseeharan, B., and Chen, J.C., 2008. Identification and phylogenetic analysis on lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Developmental & Comparative Immunology*. 32: 1260-1269.
- Lis, H., and Sharon, N., 1998. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*. 98(2): 637-674.
- Liu, Y.C., Li, F.H., Dong, B., Wang, B., Zhang, L.S., and Xiang, J.H., 2007. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Molecular Immunology*. 44: 598-607.
- Luo, T., Zhang, X.B., Shao, Z.Z., and Xu, X., 2003. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letters*. 551(1-3): 53-57.
- Luo, T., Yang, H., Li, F., Zhang, X., and Xu, X., 2006. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology*. 30(7): 607-617.
- Luo, T., Li, F., Lei, K.Y., and Xu, X., 2007. Genomic organization, promoter characterization and expression profiles of an antiviral gene PmAV from the shrimp *Penaeus monodon*. *Molecular Immunology*. 44: 1516-1523.

- Ma, T.H.T., Tiu, S.H.K., He, J.G., and Chan, S.M., 2007. Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: early gene down-regulation after WSSV infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 23(2): 430-437.
- Ma, T.H.T., Benzie, J.A., He, J.G., and Chan, S.M., 2008. PmLT, a C-type lectin specific to hepatopancreas is involved in the innate defense of the shrimp *Penaeus monodon*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 99(3): 332-341.
- Minic, R., Gavrovic-Jankulovic, M., Petrusic, V., and Zivkovic, I., 2015. Effects of orally applied Fes p1-displaying *L. plantarum* WCFS1 on Fes p1 induced allergy in mice. *Journal of Biotechnology*. 199: 23-28.
- Muhammad, F., Zhang, Z.F., Shao, M.Y., Shi, X.L., and Shafi, M., 2013. Genesis of hematopoietic tissue and its relation with hemocytes of *Litopenaeus vannamei*. *Pakistan Veterinary Journal*. 33(1): 91-95.
- Mshana, S.E., Matee, M., and Rweyemamu, M., 2013. Antimicrobial resistance in human and animal pathogens in Zambia, Democratic Republic of Congo, Mozambique and Tanzania: an urgent need of a sustainable surveillance system. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 12(1): 28.
- Ng, T.H., Wu, M.H., Chang, S.H., Aoki, T., and Wang, H.C., 2015. The DNA fibers of shrimp hemocyte extracellular traps are essential for the clearance of *Escherichia coli*. *Developmental & Comparative Immunology*. 48(1): 229-233.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., and Bylund, G., 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*. 198(3-4): 229-236.
- Ofek, I., Crouch, E., and Keisari, Y., 2002. The role of C-type lectins in the innate immunity against pulmonary pathogens. In *The Biology and Pathology of Innate Immunity Mechanisms*. Springer, Boston, pp. 27-36.
- Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., and Endo, M., 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 113(3-4): 339-347.
- Schryver, P., Defoirdt, T., and Sorgeloos, P., 2014. Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming?. *PLoS Pathogens*. 10(4).
- Shinn, A.P., Pratoomyot, J., Griffiths, D., and Trong, T.Q., 2018. Asian shrimp production and the economic costs of disease. *Asian Fish*. 31: 29-58.
- Stark, G.R., and Darnell, J.E., 2012. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*. 36(4): 503-514.
- Sun, J., Wang, L., Wang, B. *et al.*, 2008. Purification and characterization of a natural lectin from the plasma of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*. 25(3): 290-297.
- Sun, Y.D., Fu, L.D., Jia, Y.P., and Du, X.J., 2008b. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Molecular Immunology*. 45(2): 348-361.
- Sun, J.J., Lan, J.F., Zhao, X.F., Vasta, G.R., and Wang, J.X., 2017. Binding of a C-type lectin's coiled-coil domain to the Domeless receptor directly activates the JAK/STAT pathway in the shrimp immune response to bacterial infection. *PLoS Pathogens*. 13(9): e1006626.
- Rittidach, W., Pajit, N., and Utarabhand, P., 2007. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1770(1): 106-114.
- Rostam-Abadi, H., and Pistole, T.G., 1982. Lipopolysaccharide-binding lectin from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*, with specificity for 2-keto-3-deoxyoctonate (KDO). *Developmental & Comparative Immunology*. 6(2): 209-218.
- Ryan, C., 2018. Wastewater pollution in China, accessed on 01 January 2020. Available from <http://www.poultrynews.co.uk/news/eu-bans-prophylactic-use-of-antibiotics-in-farming-from-2022.html>.
- Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V., Visetnan, S., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., and Tang, S., 2018. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Developmental & Comparative Immunology*. 80: 81-93.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R.M., Mohny, L.L., Fitzsimmons, K., and Lightner, D.V., 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 105(1): 45-55.
- Vasta, G.R., Quesenberry, M., Ahmed, H., and O'Leary, N., 1999. C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Developmental & Comparative Immunology*. 23(4-5): 401-420.
- Wang, X.W., Xu, J.D., Zhao, X.F., Vasta, G.R., and Wang, J. X., 2014. A shrimp C-type lectin inhibits proliferation of the hemolymph microbiota by maintaining the expression of

- antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry*. 289(17): 11779-11790.
- Wang, X.W., Zhao, X.F., and Wang, J.X., 2014. C-type lectin binds to β -integrin to promote hemocytic phagocytosis in an invertebrate. *Journal of Biological Chemistry*. 289(4): 2405-2414.
- Walker, P.J., and Mohan, C.V., 2009. Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. *Reviews in Aquaculture*. 1(2): 125-154.
- Wang, X.W., Xu, W.T., Zhang, X.W., Zhao, X.F., Yu, X.Q., and Wang, J.X., 2009a. A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*. 27(4): 556-562.
- Wang, X.W., Zhang, X.W., Xu, W.T., Zhao, X.F., and Wang, J.X., 2009b. A novel C-type lectin (FcLec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* in vivo in Chinese white shrimp. *Developmental & Comparative Immunology*. 33(9): 1039-1047.
- Wang, X.W., and Wang, J.X., 2013. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish & Shellfish Immunology*. 34(4): 981-989.
- Wangman, P., Chaivisuthangkura, P., Sritunyalucksana, K., and Taengchaiyaphum, S., 2017. Development of monoclonal antibodies specific to ToxA and ToxB of *Vibrio parahaemolyticus* that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*. 474: 75-81.
- Wei, X., Liu, X., Yang, J., and Fang, J., 2012. Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus. *Fish & Shellfish Immunology*. 32(1): 132-140.
- Wongpanya, R., Sengprasert, P., Amparyup, P., and Tassanakajon, A., 2017. A novel C-type lectin in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* functions as a pattern recognition receptor by binding and causing bacterial agglutination. *Fish & Shellfish Immunology*. 60: 103-113.
- Xiu, Y., Hou, L., Liu, X., and Wang, Y., 2015. Isolation and characterization of two novel C-type lectins from the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Fish & Shellfish Immunology*. 46(2): 603-611.
- Xu, W.T., Wang, X.W., Zhang, X.W., Zhao, X.F., Yu, X.Q., and Wang, J.X., 2010. A new C-type lectin (FcLec5) from the Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Amino Acids*. 39(5): 1227-1239.
- Yu, X.Q., and Kanost, M.R., 2004. Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental & Comparative Immunology*. 28(9): 891-900.
- Zelensky, A.N., and Gready, J.E., 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. *The FEBS Journal*. 272(24): 6179-6217.
- Zhang, X.W., Xu, W.T., Wang, X.W., Mu, Y., Yu, X.Q., Wang, J.X., 2009a. A novel C-type lectin with two CRD domains from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* functions as a pattern recognition protein. *Molecular Immunology*. 46: 1626-1637.
- Zhang, X.W., Xu, W.T., Wang, X.W., Mu, Y., Yu, X.Q., and Wang, J. X., 2009b. A novel C-type lectin with two CRD domains from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* functions as a pattern recognition protein. *Molecular Immunology*. 46(8-9): 1626-1637.
- Zhang, Y., Qiu, L., Song, L., and Zhang, H., 2009c. Cloning and characterization of a novel C-type lectin gene from shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*. 26(1): 183-192.
- Zhao, Z.Y., Yin, Z.X., Xu, X.P., and Weng, S.P., 2009. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. *Journal of Virology*. 83(1): 347-356.