Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học
website: sj.ctu.edu.vn

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.129

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẾ ĐỘ CHO ĂN KHÁNG THỂ LÒNG ĐỎ TRỨNG GÀ LÊN ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH VÀ KHẢ NĂNG ĐỀ KHÁNG BỆNH CỦA TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Penaeus vannamei)*

Trần Thị Tuyết Hoa[1*], Lê Quốc Việt[1], Trần Thị Mỹ Duyên[1], Trần Nguyễn Duy Khoa[1], Trần Ngọc Hải[1] và Ahn Hyeong Chul[2]

[1] *Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ*
[2]*Công ty ADBIOTECH Co., LTD, Hàn Quốc*
**Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Thị Tuyết Hoa (email: ttthoa@ctu.edu.vn)*

Thông tin chung:
Ngày nhận bài: 01/05/2020
Ngày nhận bài sửa: 18/05/2020
Ngày duyệt đăng: 28/10/2020

Title:
Effects of dietary egg yolk antibody powder on the immune response and disease resistance of whiteleg shrimp (Penaeus vannamei)

Từ khóa:
Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, kháng thể lòng đỏ trứng gà IgY, tôm thẻ chân trắng, Vibrio parahaemolyticus

Keywords:
Acute hepatopancreatic necrosis disease, IgY egg yolk powder, Vibrio parahaemolyticus, whiteleg shrimp

ABSTRACT

The study was carried out to evaluate the effect of IgY egg yolk powders (IgY) in the resistance to Vibrio parahaemolyticus, causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of whiteleg shrimp (Penaeus vannamei). Immune parameters and survival rate of shrimp were evaluated after being challenge. The experiment consisted of four treatments: negative control treatment; positive control treatment; IgYA 0.5% treatment; and IgYB 0.5% treatment. The experiment recorded that the cumulative mortality rate of shrimp in negative control treatment (1.11%) and IgYB 0.5% supplementation treatment (21.1%) was lowest and significant difference ($p<0.05$) compared to positive control treatment (52.22%) and IgYB 0.5% supplementation treatment (45.56%). The immune indices (total hemocyte count, differential hemocyte count and phenoloxidase activity) were increased in the IgYB 0.5% supplementation treatment and significantly difference compared to other treatments ($p<0.05$). Results showed that diet supplementation of IgYB 0.5% can improve the survival rate and induce the immune response of whiteleg shrimp after being challenged with V. parahaemolyticus.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tìm hiểu ảnh hưởng của việc bổ sung kháng thể lòng đỏ trứng gà (IgY) lên khả năng kháng Vibrio parahaemolyticus, tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (Acute hepatopancreatic necrosis disease - AHPND) trên tôm thẻ chân trắng. Nghiên cứu đánh giá các chỉ tiêu miễn dịch và tỉ lệ sống của tôm sau khi thí nghiệm cảm nhiễm. Thí nghiệm bao gồm 4 nghiệm thức: đối chứng âm; đối chứng dương; nghiệm thức IgYA 0,5% và nghiệm thức IgYB 0,5%. Kết quả thí nghiệm ghi nhận tỉ lệ chết tích lũy của tôm ở nghiệm thức đối chứng âm (1,11%) và tôm ở nghiệm thức IgYB 0,5% (21,11%) thấp nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với nghiệm thức đối chứng dương (52,22%) và nghiệm thức bổ sung IgYA 0,5% (45,56%). Một số chỉ tiêu miễn dịch của tôm bao gồm tổng tế bào máu, định loại bạch cầu và hoạt tính phenoloxidase ở nghiệm thức bổ sung IgYB 0,5% gia tăng khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với các nghiệm thức còn lại. Tóm lại, chế độ cho ăn có bổ sung IgYB 0,5% giúp cải thiện tỉ lệ sống và tăng cường miễn dịch ở tôm thẻ chân trắng khi cảm nhiễm với V. parahaemolyticus.

Trích dẫn: Trần Thị Tuyết Hoa, Lê Quốc Việt, Trần Thị Mỹ Duyên, Trần Nguyễn Duy Khoa, Trần Ngọc Hải và Ahn Hyeong Chul, 2020. Ảnh hưởng của chế độ cho ăn kháng thể lòng đỏ trứng gà lên đáp ứng miễn dịch và khả năng đề kháng bệnh của tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(5B): 193-200.

1 GIỚI THIỆU

Thủy sản là ngành kinh tế mũi nhọn, đóng vai trò quan trọng trong nền kinh tế quốc gia. Hiện nay, tôm thẻ chân trắng là một trong những đối tượng nuôi chủ lực trong nghề nuôi tôm biển ở Việt Nam. Năm 2019, diện tích nuôi tôm đạt 720.000 ha, sản lượng tôm nước lợ ước đạt 750.000 tấn (270.000 tấn tôm sú, 480.000 tấn tôm thẻ chân trắng). Năm 2020, sản lượng nuôi tôm nước lợ tính đến ngày 20/4/2020 đạt 168.600 tấn, trong đó, tôm sú ước đạt 65.000 tấn, giảm 15,6% và tôm thẻ chân trắng đạt 103.600 tấn, tăng 2,1% so với cùng kỳ 2019 (Tổng cục thủy sản, 2020).

Việc gia tăng diện tích nuôi cùng với việc thâm canh hóa dẫn đến tình hình dịch bệnh tăng trên diện rộng, đe dọa nghiêm trọng đến năng suất và sự phát triển bền vững của nghề nuôi tôm (Walker and Mohan, 2009; Lightner *et al.*, 2012; Flegel, 2012). Vi khuẩn gây bệnh trên tôm biển chủ yếu thuộc nhóm *Vibrio*, bao gồm *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. penaeicida* (Lightner, 1996). Trong đó, vi khuẩn *V. parahaemolyticus* là tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (acute hepatopancreatic necrosis disease – AHPND) gây chết tôm với tỉ lệ có thể lên đến 100% sau khi thả giống 20 - 30 ngày (Lightner *et al.*, 2012, 2013; Tran *et al.*, 2013). Ở Việt Nam, bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, bệnh đốm trắng và bệnh do vi bào tử trùng *Enterporytozoon hepatopenaei* hiện là các bệnh phổ biến trong nuôi tôm nước lợ.

Do tác nhân gây AHPND trên tôm nuôi là vi khuẩn, nên việc điều trị bằng kháng sinh trở nên phổ biến. Việc sử dụng kháng sinh không đúng qui định gây ảnh hưởng tới sức khỏe động vật nuôi, môi trường sinh thái, tạo ra các chủng vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh dẫn đến giảm hiệu quả điều trị bệnh, tăng nguy cơ nhiễm khuẩn và tồn lưu trong sản phẩm thủy sản (FAO, 2013; Schryver *et al.*, 2014).

Do vậy, việc sử dụng các hợp chất có hoạt tính sinh học, vi sinh vật hữu ích… nhằm giúp tôm tăng cường hệ miễn dịch, tăng khả năng đề kháng với các tác nhân gây bệnh đang được tập trung nghiên cứu (Lin *et al.*, 2011). Trong đó, hướng nghiên cứu ứng dụng kháng thể lòng đỏ trứng gà (IgY) giúp tăng cường miễn dịch kháng lại các bệnh nguy hiểm trên động vật thủy sản cũng được thực hiện và mang lại hiệu quả cao (Xu *et al*., 2011; Gan *et al*., 2015).

Globulin miễn dịch (Immunoglobulins – Ig) là kháng thể có bản chất glycoprotein. Globulin miễn dịch (Immunoglobulins Y - IgY) được tạo ra từ lòng đỏ trứng gà và có sự khác biệt về bản chất protein so với Ig của động vật hữu nhũ. IgY là kháng thể đặc trưng của nhóm động vật lông vũ và do đó IgY có thể được sản xuất với lượng lớn trong lòng đỏ trứng gà (Muller *et al*., 2015). Để tạo ra kháng thể đặc hiệu, kháng nguyên đặc hiệu (*Vibrio parahaemolyticus, Vibrio harveyi, Vibrio anguillarum*) được tiêm vào cơ ức của gà mái. Kháng thể đặc hiệu sau khi được tạo ra sẽ chuyển sang lòng đỏ trứng của trứng gà con để tạo ra kháng thể IgY. IgY đã được áp dụng thành công trong các lĩnh vực nghiên cứu về chẩn đoán, phòng ngừa, điều trị… do sự ổn định của việc sản xuất IgY (Xu *et al*., 2011).

Với hiệu quả và tiềm năng sử dụng của IgY trong phòng bệnh, việc nghiên cứu "Ảnh hưởng của kháng thể lòng đỏ trứng gà đến khả năng đề kháng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính của tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*)" cần thiết được thực hiện nhằm tìm ra giải pháp hữu hiệu giúp phòng bệnh cho tôm nuôi.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Tôm thẻ chân trắng dùng cho thí nghiệm cảm nhiễm được nuôi trong thời gian 5 tuần ở điều kiện như sau: tôm thẻ chân trắng (0,43 g/tôm) được xác định không nhiễm white spot syndrome virus WSSV và *V. parahaemolyticus*. Tôm được cho ăn thức ăn có bổ sung kháng thể lòng đỏ trứng gà trong thời gian 5 tuần, bao gồm: nghiệm thức đối chứng không bổ sung IgY, nghiệm thức bổ sung IgYA 0,5%, nghiệm thức bổ sung IgYB 0,5%. Tôm được nuôi ở mật độ 40 con/ bể, cho ăn 4 lần/ngày vào 7, 11, 15 và 19 giờ, sử dụng thức ăn công nghiệp (GROBEST) với hàm lượng đạm 40-42%. Chế độ thay nước được thực hiện hàng tuần, thay 20% lượng nước trong bể nuôi.

Kháng thể lòng đỏ trứng gà IgYA và IgYB (ADBIOTECH Co., LTD, Hàn Quốc) được phun áo ngoài viên thức ăn với tỉ lệ 0,5%, tiếp tục phủ đều viên thức ăn với dầu mực và được bảo quản ở 4^{o}C.

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (CM5) dùng cho thí nghiệm cảm nhiễm được chọn từ bộ sưu tập mẫu bệnh của Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Chủng vi khuẩn CM5 được phục hồi, kiểm tra tính thuần qua hình thái khuẩn lạc và nhuộm Gram. Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường nutrient broth (NB, Merck) có bổ sung 1,5% NaCl, ủ ở 28°C trong 16

giờ. Sau đó, mật độ vi khuẩn được đo và xác định bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 610 nm.

2.2 Thí nghiệm cảm nhiễm

Tôm thẻ chân trắng được cho ăn thức ăn có hoặc không bổ sung IgYA và IgYB (0,5%) trong thời gian 5 tuần, sau đó được cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp ngâm với nồng độ đã được xác định cho phép gây chết tôm với tỉ lệ 50% (mật độ 1,6 x 10^7 CFU/mL) (Tran *et al.*, 2013). Tôm ở các nghiệm thức được giữ ổn định 1 ngày trước khi cảm nhiễm với số lượng 30 con/bể. Tôm được bố trí trong bể kính 50 lít với độ mặn là 15‰, nhiệt độ dao động từ 28-30^{o}C và được sục khí liên tục. Thí nghiệm cảm nhiễm bao gồm 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Trong đó, nghiệm thức 1 (NT1- đối chứng âm) tôm không bổ sung kháng thể lòng đỏ trứng gà và không cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*; nghiệm thức 2 (NT2- đối chứng dương) tôm không bổ sung kháng thể lòng đỏ trứng gà và cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*; nghiệm thức 3 (NT3) tôm bổ sung kháng thể lòng đỏ trứng gà IgYA 0,5% và cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*; nghiệm thức 4 (NT4) tôm bổ sung kháng thể lòng đỏ trứng gà IgYB 0,5% và cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*.

Tôm sau khi cảm nhiễm tiếp tục được bổ sung IgYA 0,5% và IgYB 0,5% tương ứng với theo từng nghiệm thức và cho ăn theo nhu cầu. Tôm được theo dõi ghi nhận dấu hiệu bệnh lý và tỉ lệ chết trong vòng 14 ngày.

Tôm thẻ chân trắng sau 3 ngày cảm nhiễm được thu với số lượng 9 tôm/nghiệm thức để phân tích các chỉ tiêu huyết học và hoạt tính PO. Tôm có dấu hiệu lờ đờ được phân lập vi khuẩn từ mẫu gan tụy và định danh vi khuẩn bằng phương pháp PCR.

2.3 Phương pháp phân tích

2.3.1 Chỉ tiêu huyết học

Tổng số tế bào máu được xác định theo phương pháp của Le Moullac *et al*. (1997). Máu tôm (100 µl) được thu bằng kim tiêm vô trùng có chứa 900 µl dung dịch chống đông. Mật độ tế bào máu được xác định bằng buồng đếm hồng cầu và quan sát dưới kính hiển vi (40X). Định loại bạch cầu được xác định dựa trên phương pháp của Cornick and Stewart (1978).

2.3.2 Hoạt tính phenoloxidase (PO)

PO được xác định dựa trên phương pháp của Hernandez-Lopez *et al*. (1996). Mẫu máu được ly tâm ở 2.500 rpm trong 20 phút ở nhiệt độ 4^{o}C. Sau khi loại bỏ phần dịch nổi, thêm vào 1 mL đệm Cacodylate Citrate (pH 7.0) và tiếp tục ly tâm ở tốc độ 2500 rpm, 20 phút, nhiệt độ 4^{o}C. Mẫu tiếp tục được loại bỏ phần dịch nổi và trộn đều với 200 µL đệm Cacodylate Buffer. Sau đó các ống mẫu được bổ sung 50 µL dung dịch Trypsin hoặc 50 µL đệm Cacodylate buffer (ống đối chứng). Giữ mẫu ở nhiệt độ phòng trong thời gian 10 phút, tiếp theo thêm vào 50 µL dung dịch L-DOPA, sau đó giữ mẫu ở nhiệt độ phòng (26-28^{o}C) trong thời gian 5 phút, sau cùng thêm vào 800 µL đệm Cacodylate Buffer, trộn đều mẫu. Đọc kết quả sau 1 phút ở bước sóng λ = 490 nm.

2.3.3 Phương pháp PCR phát hiện V. parahaemolyticus

DNA được chiết tách từ mẫu mang tôm, sau đó được khuếch đại sử dụng cho phản ứng PCR phát hiện vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với thành phần hóa chất tham gia phản ứng và điều kiện chu kỳ nhiệt được thực hiện theo phương pháp của Sritunyalucksana *et al.* (2014). Kết quả điện di được ghi nhận bằng máy đọc gel, căn cứ vào thang DNA 100 bp để xác định trọng lượng phân tử, trong đó mẫu có vạch 1269 bp (sản phẩm PCR bước 1) và 230 bp (sản phẩm PCR bước 2) là mẫu nhiễm *V. parahaemolyticus* và mẫu không có vạch sản phẩm là âm tính không nhiễm *V. parahaemolyticus*.

2.3.4 Phương pháp xử lí số liệu

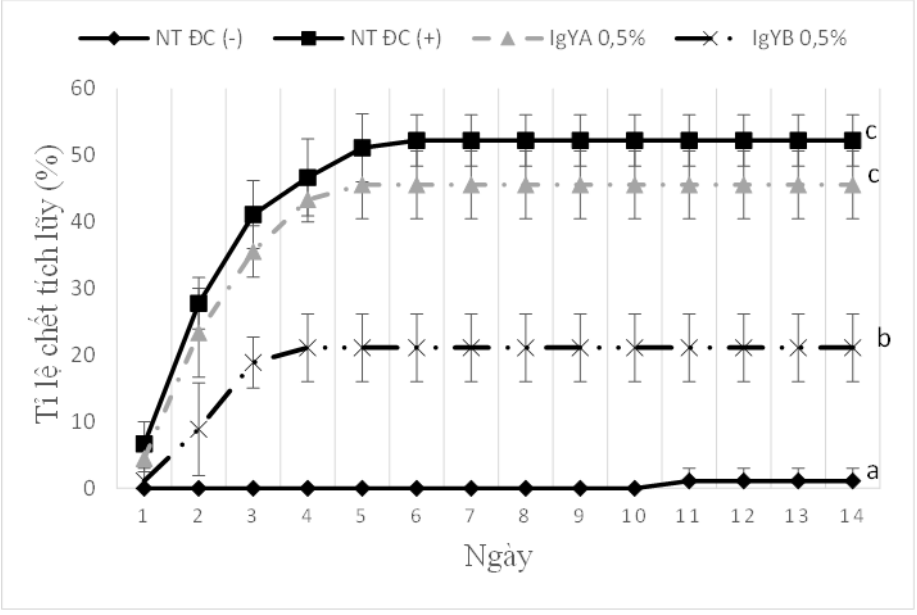
Số liệu thí nghiệm được thu thập và tổng hợp trên phần mềm Microsoft Excel 2013. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được so sánh theo phương pháp phân tích ANOVA một nhân tố bằng phép thử Duncan thông qua phần mềm SPSS 20.0 ở mức ý nghĩa ($p<0,05$).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của việc bổ sung kháng thể lòng đỏ trứng gà lên tỉ lệ sống của tôm thẻ chân trắng (Penaeus vannamei) sau cảm nhiễm với V. parahaemolyticus

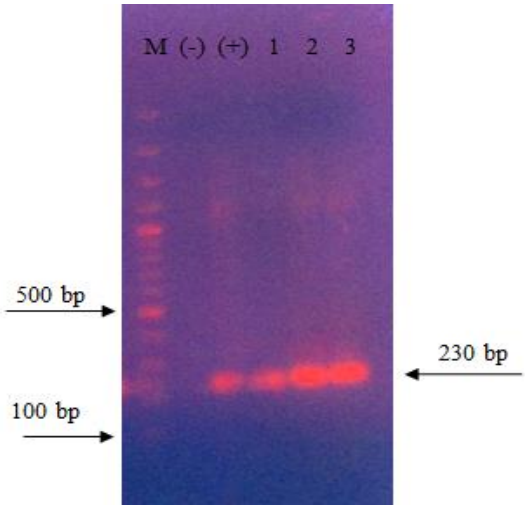
Tôm thẻ chân trắng được cho ăn thức ăn bổ sung IgYA, IgYB (0,5%) trong thời gian 5 tuần và cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp ngâm. Kết quả thí nghiệm cho thấy tôm ở nghiệm thức đối chứng âm (NT1) không bổ sung IgY và không cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có tỉ lệ chết là 1,11% cho đến khi kết thúc thí nghiệm, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p<0,05$). Tôm ở nghiệm thức này hoạt động bình thường, gan tụy sẫm màu và ruột đầy thức ăn. Ở các nghiệm thức tôm cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* (NT2 không bổ sung IgY, NT3 bổ sung IgYA 0,5%, NT4

bổ sung IgYB 0,5%) xuất hiện tôm chết ở ngày thứ 1 sau khi cảm nhiễm và ngưng chết ở các ngày thứ 5, 6, 7 lần lượt ở NT4, NT3, NT2. Khi kết thúc thí nghiệm, tỉ lệ chết tích lũy của tôm ở NT2 (đối chứng dương) là 52,22%, tiếp theo là NT3 (bổ sung IgYA 0,5%) có tỉ lệ chết tích lũy là 45,56% và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với NT4 (bổ sung IgYB 0,5%) có tỉ lệ chết 21,11%. NT4 (bổ sung IgYB 0,5%) có tỉ lệ chết tích lũy thấp nhất trong các nghiệm thức cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p<0,05$). Ngoài ra, trong ngày thứ 2, 3 sau khi cảm nhiễm ở nghiệm thức không bổ sung IgY (NT2) có số lượng tôm chết nhiều hơn so với các nghiệm thức còn lại và kéo dài cho đến ngày thứ 7. Trong khi đó, tôm ở các nghiệm thức bổ sung IgY và cảm nhiễm với vi khuẩn thì có số lượng tôm chết ít và thời gian chết ngắn hơn (Hình 1).



Hình 1: Biểu đồ tỉ lệ chết tích lũy của tôm thẻ chân trắng trong 14 ngày cảm nhiễm với *V. parahaemolyicus*

Các chữ cái (a, b, c) khác nhau trên đồ thị thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *V. parahaemolyticus*

Giếng M: thang DNA 100 bp; Giếng (-): đối chứng âm; Giếng (+): đối chứng dương; Giếng 1: mẫu của nghiệm thức đối chứng không bổ sung IgY cảm nhiễm với V. parahaemolyticus; Giếng 2-3: mẫu của các nghiệm thức 3,4 bổ sung IgY và cảm nhiễm với V. parahaemolyticus.

Kết quả thí nghiệm trên cho thấy bổ sung IgY vào thức ăn có khả năng giúp tôm tăng cường sức đề kháng với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính *V. parahaemolyticus*, trong đó tôm ở nghiệm thức bổ sung IgYB 0,5% có tỉ lệ chết thấp nhất trong suốt thời gian cảm nhiễm. Thí nghiệm này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Gao *et al.* (2016). Tôm thẻ chân trắng ở các giai đoạn zoea, mysis và postlarvae được cho ăn bổ sung 1,5% IgY có chứa kháng thể kháng đặc hiệu *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus* trong một tuần. Kết quả ghi nhận

tôm đề kháng được với tác nhân gây bệnh với tỉ lệ chết tích lũy lần lượt là 37,3% (zoea), 39,3% (mysis), 38,0% (postlarva) sau 48 giờ cảm nhiễm với *V. harveyi* so với nhóm tôm đối chứng có tỉ lệ chết tích lũy tương ứng là 84,0%, 84,7%, 88,0% ($p<0,05$). Nhóm tôm cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* có tỉ lệ chết tích lũy lần lượt là 40,0% (zoea), 41,4% (mysis) và 43,3% (postlarva) so với tỉ lệ chết tích lũy của tôm nhóm đối chứng là 86,7%, 84,0% và 87,3% ($p<0,05$). Một nghiên cứu khác được thực hiện trên môi trường lỏng trong ống nghiệm (*in vitro*) và ở chuột (*in vivo*). Khi bổ sung IgY đặc hiệu với *V. parahaemolyticus* và *V. vulnificus* với liều lượng 150 mg/mL ghi nhận số lượng vi khuẩn trong môi trường lỏng và trong phân chuột giảm đáng kể. Đồng thời, tỉ lệ chết của chuột sau khi kết thúc thí nghiệm cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* là 75% và *V. vulnificus* là 87% so với nhóm đối chứng chết 100% sau 3 ngày cảm nhiễm (Neema *et al.,* 2012). Qua đó cho thấy hiệu quả bảo vệ của IgY giúp vật chủ kháng lại các tác nhân gây bệnh.

Kháng thể từ lòng đỏ trứng gà có ưu điểm giúp vật chủ đề kháng với tác nhân gây bệnh, thân thiện với môi trường, không có tác dụng phụ hoặc dư lượng độc hại (Coleman, 1999). Nghiên cứu của Kim *et al.* (2004) cho thấy tôm thẻ Trung Quốc (*Penaeus chinensis*) cho ăn bổ sung IgY được tổng hợp từ gen VP28 và gen VP19 có thể giúp tôm kháng lại với WSSV thông qua kết quả ghi nhận được tỷ lệ chết tương ứng là 50%, 15% và 17% khi bổ sung IgY với nồng độ 0,001 mg/µL, 0,1 mg/µL và 0,5 mg/µL, trong khi nhóm đối chứng chết 100%. Lu *et al.* (2008) ghi nhận tôm đất (*Metapenaeus ensis*) được tiêm bổ sung IgY (kích thích bởi vaccine WSSV-DNA được tạo ra từ tổ hợp gen VP28, VP19 và VP15) có tỉ lệ chết là 66,7%. Kết quả trên cho thấy tiêm chủng IgY là phương pháp giúp tôm kháng lại lại tác nhân gây bệnh đốm trắng. Tương tự, việc bổ sung trên tôm hùm nước ngọt (*Procambius clarkiaii*) bằng các phương pháp tiêm, cho ăn, ngâm đều có hiệu quả trong việc bảo vệ tôm kháng lại WSSV. Đặc biệt, bổ sung IgY bằng phương pháp ngâm được áp dụng nhiều vào thực tế. Việc bổ sung vaccine WSSV-DNA ghi nhận nghiệm thức tiêm 100 µL/tôm có tỉ lệ chết là 20% sau 7 ngày, nghiệm thức cho ăn có tỉ lệ chết 1%, 10% sau 10 ngày và nghiệm thức ngâm ở liều lượng 100 mg/L có tỉ lệ chết lần lượt là 67,7%; 53,3%, và 46,7% (Lu *et al.,* 2009). Ngoài ra, nghiên cứu sử dụng thảo dược *Asparagus racemosus* như chất bổ trợ khi bổ sung kháng thể IgY cho tôm sú (*Penaeus monodon*) trong 30 ngày, sau đó cảm nhiễm với WSSV (Kumaran *et al.,* 2010). Kết quả ghi nhận tỉ lệ chết tích lũy trong 20 ngày ở nghiệm thức bổ sung IgY có chất bổ trợ thảo dược (20%) thấp hơn nghiệm thức bổ sung IgY không có chất bổ trợ thảo dược (50%). Như vậy, việc sử dụng kháng thể IgY đặc hiệu với WSSV có khả năng ngăn chặn virus xâm nhập vào vật chủ và bảo vệ tôm không nhiễm WSSV.

Bên cạnh đó, nghiên cứu bổ sung IgY giúp đề kháng các tác nhân gây bệnh khác cũng được ghi nhận. Nghiên cứu bổ sung IgY có chứa kháng thể kháng *V. alginolitycus* giúp nâng cao tỉ lệ sống của bào ngư (*Haliotis diversicolor supertexta*), với tỉ lệ chết tích lũy ở nhóm bổ sung 5% IgY và 10% IgY (30%) thấp hơn so với nhóm không bổ sung IgY (100%). Đặc biệt, nhóm bào ngư được bổ sung IgY có tỉ lệ sống 90% trong 2 ngày đầu sau cảm nhiễm (Wu *et al.,* 2011). Nghiên cứu bổ sung kháng thể IgY kháng đặc hiệu *ictaluri* (tỉ lệ 1,25%) lòng đỏ trứng gà chứa IgY kháng *E. ictaluri* đạt được giá trị RPS cao nhất ở cả hai thí nghiệm phòng bệnh (95%) và trị bệnh (87%) (Nguyễn Thị Hiền *và ctv.,* 2013). Một nghiên cứu khác trên cá thơm (*Plecoglossus altivelis*) ghi nhận việc bổ sung IgY chứa kháng thể kháng *V. anguillarum* liều lượng 200 mg/kg cho tỉ lệ chết thấp nhất (20%) so với đối chứng. Tiếp theo, cá được cho ăn bổ sung liều lượng này liên tục 7 ngày trước cảm nhiễm và 1 ngày sau cảm nhiễm ghi nhận tỉ lệ chết lần lượt là 36% và 45% tương ứng với việc phòng và trị bệnh. Qua đó cho thấy rằng, bổ sung IgY đặc hiệu có thể giúp cá đề kháng với tác nhân gây bệnh (Li *et al.,* 2014).

3.2 Ảnh hưởng của việc bổ sung kháng thể lòng đỏ trứng gà lên sự đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) sau khi cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*

Mẫu máu tôm được thu ở thời điểm 3 ngày sau cảm nhiễm để phân tích các chỉ tiêu miễn dịch bao gồm tổng tế bào máu, bạch cầu có hạt, bạch cầu không hạt và hoạt tính PO. Kết quả phân tích được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1: Sự thay đổi tổng tế bào máu (THC), bạch cầu có hạt (GC), bạch cầu không hạt (HC), PO của tôm thẻ chân trắng khi thức ăn bổ sung IgY khác nhau

Nghiệm thức	Thông số miễn dịch			
	THC (10^4 tb/mm^3)	GC (10^4 tb/mm^3)	HC (10^4 tb/mm^3)	PO (490nm)
NT1	1,46±0,26^b	0,21±0,06^a	1,25±0,22^b	0,138±0,012^b
NT2	1,05±0,24^a	0,16±0,05^a	0,89±0,20^a	0,126±0,014^b
NT3	1,02±0,12^a	0,20±0,08^a	0,81±0,10^a	0,112±0,003^a
NT4	1,89±0,20^c	0,35±0,07^b	1,53±0,15^c	0,173±0,023^c

Giá trị trung bình±độ lệch chuẩn. Các giá trị cùng một cột mang mẫu tự (a,b,c) khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05).

Kết quả tổng tế bào máu của tôm được trình bày ở Bảng 1 cho thấy NT1 tôm không bổ sung IgY và không cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* có tổng tế bào máu là 1,46x10^4 tb/mm^3 khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại (p<0,05). Trong khi đó, tổng tế bào máu ở các nghiệm thức cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*, NT4 (bổ sung IgYB 0,5%) có giá trị THC cao nhất (1,89x10^4 tb/mm^3) và khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với NT2 (không bổ sung IgY) 1,05 x10^4 tb/mm^3 và NT3 (bổ sung IgYA 0,5%) là 1,02x10^4 tb/mm^3.

Khảo sát sự biến động số lượng từng loại bạch cầu, chỉ tiêu bạch cầu không hạt (hyaline cells - HC) ở NT4 gia tăng đáng kể, có giá trị cao nhất với 1,53x10^4 tb/mm^3 khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với các nghiệm thức NT1 (1,25x10^4 tb/mm^3), NT2 (0,89x10^4 tb/mm^3) và NT3 (0,81x10^4 tb/mm^3). Tương tự, chỉ tiêu bạch cầu có hạt (granular cells - GC) tăng cao nhất ở NT4 (0,35 x10^4 tb/mm^3) khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với các nghiệm thức còn lại. Số lượng bạch cầu có hạt ở NT2 là 0,16x10^4 tb/mm^3 thấp nhất khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p>0,05) so với NT1 là 0,21x10^4 tb/mm^3 và NT3 là 0,20x10^4 tb/mm^3 (Bảng 1).

Hoạt tính PO được trình bày qua Bảng 1 ghi nhận: sau 3 ngày cảm nhiễm, hoạt tính PO có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) giữa nhóm không bổ sung IgY (NT1- 0,138x10^4 tb/mm^3 và NT2- 0,126x10^4 tb/mm^3) và nhóm có bổ sung IgY (NT3 - 0,112 tb/mm^{3}và NT4 - 0,137x10^4 tb/mm^3). Mặt khác, giá trị PO đạt cao nhất ở NT4 là 0,137x10^4 tb/mm^3 khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với các nghiệm thức còn lại.

Khi có vật thể lạ xâm nhập vào cơ thể, tôm sẽ kích thích hệ thống miễn dịch không đặc hiệu để bảo vệ cơ thể bằng cách nhận diện vật thể lạ, thực bào, melanin hóa, gây độc với tế bào lạ và truyền thông tin tế bào làm giảm đáng kể số lượng tế bào máu (Lorenzon *et al.*, 1999; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Việc bổ sung IgY có thể kích thích hệ miễn dịch đặc hiệu với tác nhân gây bệnh, nên khi vi khuẩn xâm nhập vào cơ thể tôm sẽ gia tăng các đáp ứng miễn dịch và thành phần tham gia (prophenoloxidase, serum lysozyme, …) (Cooper and Alder, 2006). Trong thí nghiệm này, kết quả phân tích các chỉ tiêu miễn dịch của tôm thẻ chân trắng sau khi cảm nhiễm cho thấy chế độ bổ sung IgYB 0,5% giúp gia tăng đáp ứng miễn dịch của tôm, thông qua sự gia tăng số lượng tế bào máu, bạch cầu có hạt, bạch cầu không hạt và hoạt tính PO. Nguyen *et al.* (2014) ghi nhận hoạt tính PO cao (tăng 33%) nhưng không có ý nghĩa thống kê (p>0,05) ở nhóm tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn có chứa bào tử *Bacillus subtilis* biểu hiện gene VP28 và cảm nhiễm với WSSV. Theo đó, sự khác nhau về mức độ hoạt động enzyme là do bào tử *B. subtilis* có xu hướng kích thích hoạt động thực bào của tế bào không hạt nhiều hơn kích thích hoạt động pro-PO tạo thành PO của tế bào có hạt. Do đó, thí nghiệm ghi nhận hoạt độ SOD tăng cao hơn PO. Tương tự, chế độ cho ăn bổ sung *B. subtilis* biểu hiện gen VP28 (CotB-VP28) trong 14 ngày, tôm sú có sự gia tăng cao về tổng tế bào máu (2,29x10^4 tb/mm^3), bạch cầu có hạt (1,99x10^4 tb/mm^3), bạch cầu không hạt (0,30x10^4 tb/mm^3), hoạt tính PO (0,344) ở tại thời điểm 3 ngày sau khi cảm nhiễm với WSSV (Hồng Mộng Huyền và Trần Thị Tuyết Hoa, 2015). Bên cạnh đó, nghiên cứu của Yang *et al.* (2012) ghi nhận tôm thẻ chân trắng được cho ăn thức ăn chứa *Escherichia coli* biểu hiện gene VP28, có hoạt tính PO cao nhất trong suốt 7 ngày sau khi cảm nhiễm với WSSV (p<0,05).

Như vậy, kết quả thí nghiệm cho thấy chế độ cho ăn bổ sung kháng thể lòng đỏ trứng gà (IgYB 0,5%) có thể kích thích hệ miễn dịch đặc hiệu ở tôm thẻ chân trắng và qua đó giúp tôm gia tăng sức đề kháng, tăng tỉ lệ sống khi cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Tôm thẻ chân trắng cho ăn thức ăn bổ sung kháng thể lòng đỏ trứng gà (IgY) sẽ giúp tôm tăng

cường sức đề kháng khi cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Trong đó, tôm được bổ sung IgYB 0,5% có tỉ lệ sống cao nhất so với các nghiệm thức cảm nhiễm với vi khuẩn.

Thức ăn bổ sung IgYB 0,5% giúp tôm thẻ chân trắng tăng cường miễn dịch, thông qua sự gia tăng chỉ số huyết học (tổng tế bào máu, bạch cầu không hạt, bạch cầu không hạt), và hoạt tính phenoloxidase.

4.2 Đề xuất

Thử nghiệm bổ sung IgYB 0,5% cho tôm ở điều kiện ao nuôi nhằm xác định tính hiệu quả của kháng thể lòng đỏ trứng gà trong nuôi tôm thương phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Coleman, M., 1999. Using egg antibodies to treat diseases (pp 351-370). CABI Publishing, Wallingford.

Cooper, M.D. and Alder, M.N., 2006. The evolution of adaptive immune systems. Cell, 124(4): 815-822.

Cornick, J.W. and Stewart, J.E., 1978. Lobster (*Homarus americanus*) hemocytes: classification, differential counts, and associated agglutinin activity. Journal of Invertebrate Pathology. 31(2): 194-203.

FAO, 2013. Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304). FAO Fisheries and Aquaculture Report. 1053: 54.

Flegel, T.W., 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. Journal of Invertebrate Pathology. 110(2): 166-173.

Gan, H., He, H., Sato, A., Hatta, H., Nakao, M. and Somamoto, T., 2015. Ulcer disease prophylaxis in koi carp by bath immersion with chicken egg yolk containing anti-*Aeromonas salmonicida* IgY. Research in Veterinary Science. 99: 82-86.

Gao, X., Zhang, X. Lin, L. *et al*., 2016. Passive immune-protection of *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* infections with anti-*Vibrio* egg yolk (IgY)-encapsulated feed. International Journal of Molecular Sciences. 17(5): 723.

Hernandez-Lopez, J., Gollas-Galvan T. and Vargas-Albores F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comparative Biochemistry and Physiology. 113(1): 61-66.

Hồng Mộng Huyền và Trần Thị Tuyết Hoa, 2015. Khả năng phòng bệnh đốm trắng của bào tử *Bacillus subtilis* biểu hiện gen VP28 trên tôm sú (*Penaeus monodon*). Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 37 (1): 82-88.

Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L. and Soderhall, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology. 211 (4): 213–236.

Kim, D.K., Jang, I.K., Seo, H.C., Shin, S.O., Yang, S.Y. and Kim J.W., 2004. Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a truncated fusion protein derived from WSSV. Aquaculture. 237(1-4): 21-30.

Kumaran, T., Michaelbabu, M., Selvaraj, T., Albindhas, S. and Citarasu, T., 2010. Production of anti WSSV IgY edible antibody using herbal immunoadjuvant *Asparagus racemosus* and its immunological influence against WSSV infection in *Penaeus monodon*. Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition. 2(1): 1-5.

Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D. and VanWormhoudt, A., 1997. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and a-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (*Crustacea Decapoda*). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 208 (1-2): 107-125.

Li, C.H., Lu, X.J., Li, D.F. and Chen J., 2014. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental *Vibrio anguillarum* infection in ayu (*Plecoglossus altivelis*). Fish & Shellfish Immunology. 37(1): 108-114.

Lightner, D.V., 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge: The World Aquaculture Society.

Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C.R., Noble, B.L. and Tran H.L., 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. Global aquaculture advocate. January/February, 40.

Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C.R., Noble, B.L., Nunan, L.M. and Tran H.L., 2013. Documentation of an emerging disease (early mortality syndrome) in SE Asia & Mexico. NACA.

Lin, Y.C., Yeh, S.T., Li, C.C., Chen, L.L., Cheng, A.C. and Chen, J.C., 2011. An immersion of *Gracilaria tenuistipitata* extract improves the immunity and survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei* challenged with white spot syndrome virus. Fish & Shellfish Immunology. 31(6): 1239-1246.

Lorenzon, S., De Guarrini, S., Smith, V.J. and Ferrero, E.A., 1999. Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans *in vivo*. Fish & Shellfish Immunology. 9(1): 31-50.

Lu, Y., Liu, J., Jin, L., *et al*., 2008. Passive protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) using specific antibody from egg

yolk of chickens immunized with inactivated virus or a WSSV-DNA vaccine. Fish & Shellfish Immunology. 25(5): 604-610.

Lu, Y., Liu, J., Jin, L., *et al*., 2009. Passive immunization of crayfish (*Procambius clarkiaii*) with chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against white spot syndrome virus (WSSV). Applied Biochemistry and Biotechnology. 159(3): 750.

Muller, S., Schubert, A., Zajac, J., Dyck, T., and Oelkrug, C., 2015. IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. Nutrition Journal. 14: 109.

Neema, K., Mtenga, A.B., Shim, W.B. and Chung, D.H., 2012. The in vitro and in vivo efficacy of hen IgY against *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. Journal of Microbiology and Biotechnology. 22(10): 1423-1431.

Nguyễn Thị Hiền, Lê Hồng Phước, Ngô Thị Bích Phượng, Nguyễn Phạm Hoàng Huy, Võ Hồng Phượng, Chung Minh Lợi và Dương Thị Hương Giang, 2013. Thử nghiệm hiệu quả bảo vệ của thức ăn bổ sung kháng thể kháng *Edwardsiella ictaluri* đối với bệnh gan thận mủ trên cá tra *Pangasianodon hypophthalmus*. Tạp chí nghề cá sông Cửu Long, số 2. Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản 2.

Nguyen, V.A., Pham, C.K., Pham, H.T., *et al*., 2014. *Bacillus subtilis* spores expressing the VP28 antigen: a potential oral treatment to protect *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome. FEMS Microbiology Letters. 358(2): 202-208.

Schryver, D.P., Defoirdt, T.and Sorgeloos, P., 2014. Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming?. PloS pathogens. 10(4): e1003919.

Sritunyalucksana, K., Dangtip, S., Sanguanrut, P., *et al*., 2014. A two-tube, Nested PCR Detection Method for AHPND Bacteria. Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand. 1-4.

Tổng cục thủy sản, 2020. Tổng sản lượng thủy sản 4 tháng đầu năm tăng 0,4% so với cùng kỳ.

Tran, H.L., Nunan, L., Redman, R.M., *et al*., 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.

Xu, Y., Li, X., Jin, L., *et al*., 2011. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: A review. Biotechnology Advances. 29(6): 860–868.

Walker, P. 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.

Wu, C.J., Wang, H., Chan, Y.L., and Li, T.L., 2011. Passive immune-protection of small abalone against *Vibrio alginolyticus* infection by anti-*Vibrio* IgY-encapsulated feed. Fish & Shellfish Immunology. 30(4-5): 1042-1048.

Yang, J.Y., Chang, C.I., Liu, K.F., Hseu, J.R., Chen, L.H. and Tsai, J.M., 2012. Viral resistance and immune responses of the shrimp *Litopenaeus vannamei* vaccinated by two WSSV structural proteins. Immunology Letters. 148(1): 41-48.