BỆNH ĐỐM TRẮNG TRÊN TÔM THẺ VÀ TÔM NƯỚC NGỌT

Võ Văn Tuấn*, Mathias Corteel, Patrick Sorgeloos, Hans Nauwynck
** Khoa Thủy Sản Trường ĐH Nông Lâm Tp.HCM*

ABSTRACT

An in vivo titration of two white spot syndrome virus (WSSV) stocks was performed to investigate the infectivity of WSSV in Macrobrachium rosenbergii and to compare it with penaeid shrimp. M. rosenbergii prawns were injected intramuscularly with WSSV Thai-1 and WSSV Viet, infection was detected using indirect immunofluorescence (IIF) and the prawn infectious dose 50% endpoint (PID_{50} ml^{-1}) was determined. Clinical symptoms of WSSV were seen in prawns inoculated with WSSV Thai-1 from 24 hpi (hour post infection), and from 36 hpi with WSSV Viet. Mortality started from 48 hpi with both strains. A higher percentage of mortality (±85%) was found in dead and euthanized prawns inoculated with low dilutions of WSSV Thai-1 than these inoculated with low dilutions of WSSV Viet (±45%). The infection titers of WSSV Thai-1 and WSSV Viet stocks as titrated in penaeid shrimp in earlier work were $10^{6.6}$ and $10^{5.8}$ SID_{50} ml^{-1}, respectively. The median virus infection titers in M. rosenbergii were $10^{5.5}$ and $10^{3.15}$ PID_{50} ml^{-1}, respectively.

TÓM TẮT

Thí nghiệm pha loãng in vivo: 2 chủng virus (virus Thai-1 và virus Việt) được sử dụng để gây nhiễm trên tôm càng (M. rosenbergii) thông qua phương pháp tiêm vào cơ. Mức độ nhiễm bệnh được xác định bằng phương pháp IIF (miễn dịch huỳnh quang). Triệu chứng bệnh lý bắt đầu xuất hiện sau 24h gây nhiễm với virus đốm trắng Thai-1 và sau 36h với virus Việt. Tỷ lệ tử vong xuất hiện sau 48h gây nhiễm với cả hai dòng virus. Tuy nhiên, 85% tử vong khi gây nhiễm bởi virus Thai-1 trong khi có 45% tử vong bởi virus Việt (cùng pha loãng ở nồng độ thấp). Nồng độ gây nhiễm của virus Thai-1 và virus Việt trên tôm thẻ là $10^{6.6}$ và $10^{5.8}$ SID_{50} ml^{-1}, trong khi trên tôm càng là $10^{5.5}$ và $10^{3.15}$ PID_{50} ml^{-1}.

GIỚI THIỆU

Virus đốm trắng là một trong những tác nhân gây bệnh nguy hiểm trên các loài giáp xác nuôi, đặc biệt là tôm thẻ. Bệnh xảy ra khắp nơi trên thế giới, là một trong những nguyên nhân gây tỷ lệ tôm chết cao và ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành nuôi tôm công nghiệp.

Tôm càng xanh, *Macrobrachium rosenbergii*, là một trong những loài tôm nước ngọt thương phẩm được nuôi khá phổ biến hiện nay, và được xem là loài có sức đề kháng bệnh mạnh nếu so sánh với tôm thẻ.

Cho đến nay, có rất nhiều nghiên cứu đề cập đến khả năng đề kháng lại virus đốm trắng trên tôm càng xanh. Tuy nhiên, những nghiên cứu này được thực hiện trong các điều kiện khác nhau và ở các giai đoạn khác nhau trên đối tượng thí nghiệm. Do đó, chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm gây nhiễm trên tôm (kích cỡ: 2-5g) trong điều kiện chuẩn, nhằm mục đích là đánh giá và so sánh sự nhạy cảm của *Macrobrachium rosenbergii* với virus đốm trắng so với *Penaeus vannamei*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng và điều kiện thí nghiệm

Tôm càng xanh, *Macrobrachium rosenbergii*, được nuôi trong hệ thống tuần hoàn khép kín tại Trung tâm nghiên cứu về nuôi trồng thủy sản và Artemia, Khoa Công nghệ sinh học, trường Đại học Gent, Bỉ. Ấu trùng (larvae) sẽ được cho ăn 2 lần/ngày trong suốt 3 tuần với artemia nauplii (5% trọng lượng cơ thể). Các chỉ tiêu thủy lý hóa như nhiệt độ, pH, độ cứng,…sẽ được quan sát và duy trì ở biên độ thích hợp trong suốt thời gian thí nghiệm.

Tôm càng xanh (số lượng: 180 con) với trọng lượng cơ thể khoảng 2g sẽ được lựa chọn để tiến hành thí nghiệm. Thí nghiệm được tiến hành dưới điều kiện tiêu chuẩn tại Lab Virus, Khoa Thú Y, trường Đại học Gent. Tôm được bố trí riêng biệt trong những bể plastic (10L). Nhiệt độ sẽ được duy trì trong khoảng 27-28^{0}C trong suốt thời gian thí nghiệm. Tôm được cho ăn thức ăn viên, 2 lần/ngày với 2,5% trọng lượng cơ thể.

Virus

Hai dòng virus, Thai-1 và Việt, sẽ được lựa chọn cho thí nghiệm. Dòng virus Thai-1 được thu từ những con tôm sú tự nhiên (*Penaeus monodon*) bị nhiễm bệnh vào năm 1996. Sau đó chúng sẽ được gây nhiễm trên tôm sông, *Pacifastacus leniusculus* (Jiravanichpaisal và ctv., 2001). Dòng virus Việt cũng được thu từ những con tôm sú tự nhiên (*Penaeus monodon*) bị nhiễm bệnh nhưng vào năm 2003. Sau đó chúng sẽ được gây nhiễm trên *Cherax quadricarinatus*. Huyền dịch virus Thai-1 từ mang của tôm sông được cung cấp bởi P. Jiravanichpaisal và K. Soderhall (Trường Đại học Uppsala, Thụy Điển), trong khi virus Việt được cung cấp từ Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản 2 (Việt Nam). Mỗi dòng virus sẽ được gây nhiễm trên tôm thẻ, *Penaeus vannamei*, để tạo ra chủng gốc và cũng nhằm mục đích là xác định nồng độ gây nhiễm của virus trên đối tượng thí nghiệm.

Quy trình gây nhiễm

Virus sẽ được pha loãng 10 lần, sau đó lấy 50 µL tiêm vào cơ bụng tôm (khoảng giữa đốt bụng thứ 3 và 4). Đối với virus Thai-1, nồng độ virus pha loãng được lựa chọn từ 10^{-1} - 10^{-6}, (10^{-0} - 10^{-4} đối với virus Việt). 5 tôm/nồng độ, với 3 lần lặp lại.

Thời gian thí nghiệm

Mỗi thí nghiệm sẽ kéo dài 120h. Trong suốt thời gian thí nghiệm, cách 12h, tôm sẽ được quan sát và ghi nhận những dấu hiệu bệnh lý như bỏ ăn, lờ đờ,…Những con tôm chết và gần chết sẽ được thu mẫu và tiến hành phân tích để đánh giá mức độ nhiễm bệnh. Cuối thí nghiệm, những con tôm còn sống sẽ được thu và phân tích bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang (IIF).

Phương pháp miễn dịch huỳnh quang (IIF)

Bước 1: Phần đầu tôm được cắt đôi, sau đó cố định trong 2% methylcellulose và đông lạnh ở nhiệt độ -20^{0}C.

Bước 2: (cắt mẫu) mẫu được cắt với kích cỡ khoảng 5 µm, sau đó sẽ được cố định trong methanol ở nhiệt độ -20^{0}C trong 20 phút.

Bước 3: rửa mẫu 3 lần, mỗi lần khoảng 5 phút, trong phosphate buffered saline (PBS-dung dịch đệm). Sau đó cho vào 2 µg mL^{-1} kháng thể đơn dòng 8B7 (monoclonal antibody), ủ ở nhiệt độ 37^0C trong 1 h.

Bước 4: rửa mẫu 3 lần, mỗi lần khoảng 5 phút, trong phosphate buffered saline (PBS-dung dịch đệm). Sau đó cho vào 0.02 µg mL^{-1} fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled goat anti-mouse IgG, ủ ở nhiệt độ 37^0C trong 1 h.

Bước 5: rửa mẫu trong phosphate buffered saline (5 phút) → nước cất (5 phút). Sau đó làm khô mẫu và cho tan mẫu trong dung dịch glycerine và 1,4-diaza-bicyclo(2,2,2)-octane.

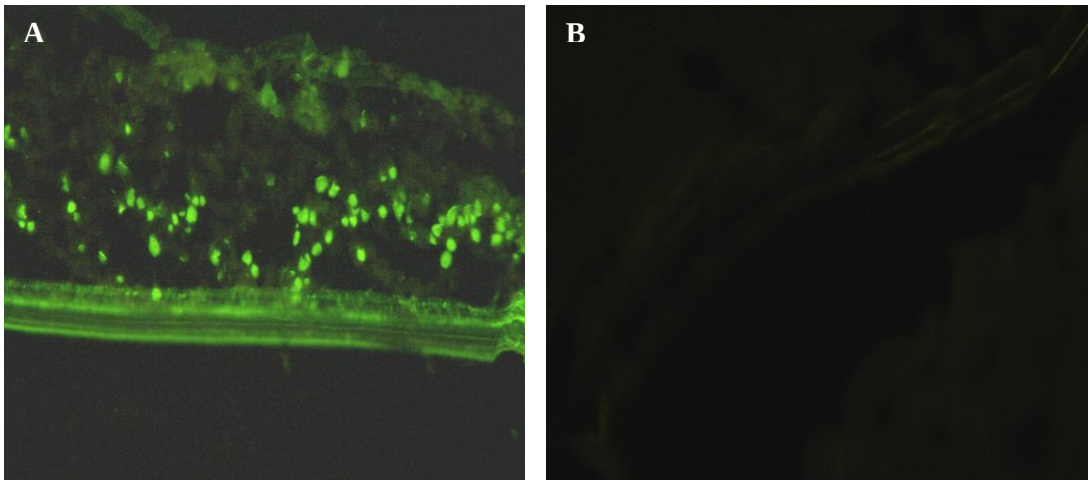
Slides chứa mẫu sẽ được phân tích bằng kính huỳnh quang (400X).

KẾT QUẢ

Chủng virus Thai-1

Bảng 1. Số l ượng tôm chết và tôm bị nhiễm virus đốm trắng Thai-1

Nồng độ	Số lượng tôm	Chết trước 120 hpi (Thời gian chết)	Sống sót	Nhiễm	Không nhiễm
10^{-1}	15	14 (48-84)	1	15	0
10^{-2}	15	11 (48-120)	4	12	3
10^{-3}	15	13 (48-84)	2	15	0
10^{-4}	15	7 (60-108)	8	10	5
10^{-5}	15	2 (108-120)	13	2	13
10^{-6}	15	0	15	0	15

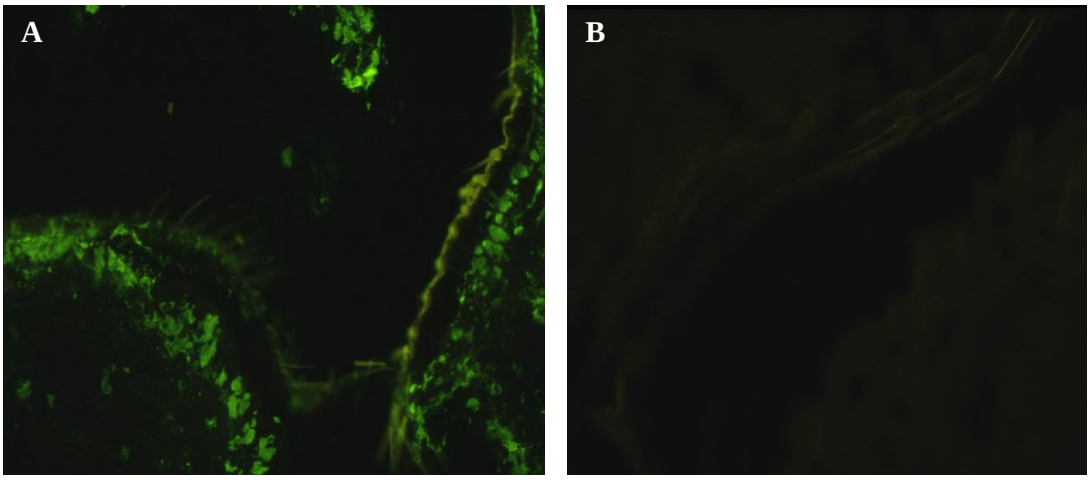


Hình 1. (A) Tế bào dương tính và (B) âm tính với virus Thai-1 trong biểu mô liên kết của *M. rosenbergii* xác định bằng phương pháp IIF.

Chủng virus Việt

Bảng 2. Số lượng tôm chết và tôm bị nhiễm virus đốm trắng Việt

Nồng độ	Số lượng tôm	Chết trước 120 hpi (Thời gian chết)	Sống sót	Nhiễm	Không nhiễm
10^{-0}	15	8 (48-96)	7	15	0
10^{-1}	15	4 (72-120)	11	10	5
10^{-2}	15	6 (96-120)	9	9	6
10^{-3}	15	0	15	0	15
10^{-4}	15	1 (120)	14	0	15



Hình 2. (A) Tế bào dương tính và (B) âm tính với virus Việt trong biểu mô dạ dày của *M. rosenbergii* xác định bằng phương pháp IIF.

THẢO LUẬN

Virus đốm trắng là một trong những tác nhân gây bệnh nguy hiểm không chỉ riêng trên các loài tôm nước lợ mà nó còn xuất hiện ở các đối tượng khác như cua và tôm nước ngọt. Cho đến nay, người ta ghi nhận được có tất cả 43 loài được xem là đối tượng gây bệnh của loại virus này. Con đường lây bệnh có thể thông qua phương tiện nuôi hoặc bị nhiễm bệnh từ các đối tượng khác có mang mầm bệnh virus đốm trắng (Cai và ctv., 1995; Lo và ctv., 1996, Chang và ctv., 1998; Lightner và ctv., 1998; Sahul-Hameed và ctv., 2000, 2001, 2002). Tỷ lệ tử vong ở tôm biển, tôm sông, và cua có thể đạt tới 100% khi bị nhiễm loại virus này, ngoại trừ tôm càng xanh *M. rosenbergii*. Sahul-hameed và ctv đã tiến hành rất nhiều thí nghiệm thông qua các con đường khác nhau như ngâm, cho ăn, và tiêm virus vào đối tượng thí nghiệm, kết quả cho thấy rằng, virus đốm trắng không gây ra bất kỳ tỷ lệ tử vong nào trên *M. rosenbergii*.

Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã sử dụng phương pháp pha loãng *in vivo* để đánh giá và so sánh về khả năng đề kháng virus đốm trắng trên tôm càng xanh *M. rosenbergii* so

với tôm thẻ *P. vannamei*. Chủng virus đốm trắng sẽ được pha loãng *in vivo*, sau đó sẽ được gây nhiễm trên *M. rosenbergii*. Phương pháp pha loãng mẫu và gây nhiễm được tiến hành giống như phương pháp đã được thực hiện trên tôm thẻ trong các thí nghiệm trước đó.

Flint và ctv. (2000) ghi nhận rằng thí nghiệm pha loãng *in vivo* thường được sử dụng khi nồng độ virus không thể tính toán dựa vào *in vitro*. Bên cạnh đó, thí nghiệm chuẩn độ *in vivo* là một trong những công cụ hữu hiệu để đánh giá sự khác biệt về khả năng nhạy cảm giữa các giai đoạn khác nhau trong cùng một loài hoặc giữa những loài có cùng quan hệ với nhau (Plumb và Zigberg 1999). Để tiến hành nghiên cứu quá trình phát sinh bệnh, khả năng gây nhiễm của virus đốm trắng phải được đánh giá bằng phương pháp chuẩn độ *in vivo*. Thông qua phương pháp này, chúng ta sẽ xác định được chính xác liều lượng virus cần gây nhiễm trên đối tượng thí nghiệm.

Kết quả của thí nghiệm cho thấy rằng tôm được gây nhiễm với virus Thai-1 bắt đầu xuất hiện triệu chứng bệnh lý như lờ đờ, bỏ ăn từ 24h sau gây nhiễm, và từ 36h với virus Việt. Tỷ lệ tử vong bắt đầu xuất hiện sau 48h gây nhiễm với cả 2 chủng loại virus. Nguyên nhân có thể do khả năng tăng sinh nhanh của tế bào virus trong cơ thể vật chủ, quá trình này đã phá hủy các cơ quan giữ vai trò thiết yếu trong cơ thể vật chủ. Tuy nhiên đối với tôm được gây nhiễm bởi virus Việt thì triệu chứng bệnh lý và tỷ lệ tử vong chỉ xuất hiện khi đối tượng bị gây nhiễm ở nồng độ cao và ở những thời điểm sau của quá trình thu mẫu. Tỷ lệ tử vong ở tôm được gây nhiễm bởi virus Thai-1 (nồng độ virus: 10^{-1}-10^{-3}) khoảng 75 - 90%; virus Việt (nồng độ: 10^{-0}-10^{-2}) 25-50%. Tỷ lệ nhiễm virus đốm trắng ở đối tượng thí nghiệm được gây nhiễm bởi virus Thai-1 (nồng độ: 10^{-1}-10^{-3}) và virus Việt (nồng độ: 10^{-0}-10^{-2}) lần lượt là 80-100% và 60-100%.

Sự khác biệt về số lượng tôm chết và số lượng nhiễm virus đốm trắng của dòng virus Việt cho thấy rằng dòng virus này ít nhạy cảm trên *M. rosenbergii*. Điều này cũng hoàn toàn phù hợp với kết quả nghiên cứu đã đạt được trên *P. vannamei* (Rahman và ctv., 2008).

Nồng độ gây nhiễm của virus Thai-1 trên *M. rosenbergii* thấp hơn khoảng 13 lần so với nồng độ trên *P. vannamei* ($10^{5.5}$ PID_{50} mL^{-1} so với $10^{6.6}$ SID_{50} mL^{-1}). Trong khi nồng độ gây nhiễm của virus Việt trên *M. rosenbergii* thấp hơn khoảng 450 lần so với trên *P. vannamei*. Số lượng tế bào nhiễm virus đốm trắng ở *M. rosenbergii* thấp hơn rất nhiều so với trên *P. vannamei*, điều đó chứng tỏ rằng, *M. rosenbergii* sở hữu một cơ chế đặc biệt nào đó giúp nó đề kháng lại virus đốm trắng và phục hồi lại sức khỏe ban đầu vào cuối chu kỳ thí nghiệm. Một khả năng nữa có thể là do nhiều loại tế bào ở *P. vannamei* thích hợp cho quá trình tăng sinh của virus. Hoặc sự khác biệt về kiểu gen giữa hai dòng virus Thai-1 và virus Việt, từ đó đưa đến những sự khác biệt về khả năng tăng sinh và gây bệnh trên vật chủ. Baranowski và ctv (2001) ghi nhận rằng sự khác biệt về kiểu gen ở các dòng virus có thể làm biến đổi quá trình tiếp nhận ở cơ quan đích.

Nếu so sánh sự khác biệt về độc lực của 2 chủng virus trên cùng vật chủ, chúng ta nhận thấy rằng, sự khác biệt này có thể do: (1) chu kỳ tăng sinh của virus Thai-1 ngắn hơn của virus Việt, (2) độc lực yếu của virus Việt cho phép *M. rosenbergii* có nhiều thời gian để tạo ra hệ thống miễn dịch nhằm bảo vệ cơ thể, (3) khả năng thích nghi để tăng sinh của virus Việt bên trong *M. rosenbergii* ít hiệu quả hơn. Dù sao đi nữa, thí nghiệm chuẩn độ *in vivo* cũng cho thấy rằng *M. rosenbergii* có khả năng đề kháng cao với virus Việt, nhưng ít đề kháng với virus Thai-1.

Các loài động vật không xương sống sở hữu hệ thống miễn dịch tự nhiên, điều này giúp chúng chống lại hàng loạt các tác nhân gây bệnh xâm nhập từ bên ngoài và trong bản

thân vật chủ. Khi có vật lạ hoặc protein lạ xâm nhập vào cơ thể, vật chủ sẽ sản xuất ra những chất như bactericidins, lysins, và agglutinins để bảo vệ cơ thể (Bang, 1967; Mckay và Jenkin, 1969). Đến nay, có rất nhiều nghiên cứu đã chứng minh sự tồn tại của hệ thống miễn dịch chống lại tác nhân virus trên tôm ví dụ như RNA-interferon (Robalino và ctv., 2007), interferon-like protein (He và ctv., 2005),…Kết quả nghiên cứu của Pais và ctv (2007) chỉ ra rằng hemagglutinins hoặc lectins là một trong những chất tham gia vào quá trình đề kháng lại virus trên tôm.

KẾT LUẬN

Tôm được gây nhiễm với virus Thai-1 bắt đầu biểu hiện triệu chứng bệnh lý như bỏ ăn, lờ đờ sau 24 h gây nhiễm, và từ 36 h sau gây nhiễm đối với virus Việt. Tỷ lệ tử vong xuất hiện sau 48 h gây nhiễm ở cả hai nhóm đối tượng thí nghiệm (nồng độ thấp) (trên 90% tỷ lệ tử vong được quan sát thấy ở nhóm đối tượng được gây nhiễm bởi virus Thai-1 và trên 50% ở virus Việt). Tỷ lệ này cao hơn rất nhiều so với các nghiên cứu đã được xuất bản trước đó.

Nồng độ gây nhiễm của virus đốm trắng trên tôm càng xanh (*M. rosenbergii*) thấp hơn rất nhiều so với nồng độ gây nhiễm của cùng chủng loại virus trên tôm thẻ (*P. vannamei*): 13 lần đối với virus Thai-1 và 450 lần đối với virus Việt. Điều này có nghĩa là, cần tiêm một số lượng lớn virus để gây nhiễm bệnh trên tôm càng hơn tôm trên thẻ.

Đến nay, có rất nhiều nghiên cứu cho rằng, ở một khía cạnh nào đó thì *M. rosenbergii* có khả năng đề kháng với virus đốm trắng. Tuy nhiên, điều này không thực sự đúng trong nghiên cứu của chúng tôi. Khi *M. rosenbergii* được gây nhiễm bởi virus Thai-1, kết quả cho thấy rằng, quá trình tăng sinh của virus đốm trắng ở *M. rosenbergii* cũng hiệu quả như quá trình tăng sinh của nó trên *P. vannamei*. Thế nhưng, có một sự khác biệt giữa hai đối tượng được gây nhiễm bởi virus đốm trắng, *M. rosenbergii* có khả năng hồi phục lại sức khoẻ ban đầu sau một thời gian gây nhiễm và có rất ít tế bào nhiễm bệnh được quan sát thấy trong các cơ quan thiết yếu của đối tượng này, điều này không xuất hiện ở *P. vannamei*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bang, F.B., 1967. Serological responses among invertebrates other than insects. *Fed Proc* 267:1680-1684.

Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M. and Domingo E., 2001. Evolution of cell recognition by viruses. *Science* 292, 1102-1105.

Cai, S., Huang, J., Wang, C., Song, X., Sun, X., Yu, J, Zhang, Y. and Yang, C., 1995. Epidermiological studies on the explosive epidermic disease of prawn in 1993-1994. *J Fish China* 19: 112-117.

Chang, P.S., Chen, H.C., Wang, Y.C., 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crabs and lobsters by *in situ* hybridization. *Aquaculture* 164: 233-242.

Flint, S.J., Enqvist, L.W., Racaniello, V.R. and Skalka, A.M., 2000. *Principles of virology. Molecular biology, pathogenesis and control of animal viruses*. ASM Press, Washington, DC.

He, N., Qin, Q. and Xu, X., 2005. Differential profile of genes expressed in hemocytes of White Spot Syndrome Virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. *Antiviral Res*. 66, 39-45.

Lightner, D.V. and Redman, R.M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164, 201-220.

Lo, C.F., Ho, C.H., Peng, S.E., Chen, C.H., Hsu, H.C., Chiu, Y.L., Chang, C.F., Liu, K.F., Su, M.S., Wang, C.H. and Kou, G.H., 1996. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.* 27, 215-225.

Mckay, D. and Jenkin, C.R., 1969. Immunity in invertebrates: II. Adaptive immunity in the cray fish *(Parachaeraps bicarinatus)*. *Immunology* 17, 127-137.

Pais, R., Shekar, M. and Karunasagar, I., 2007. Hemagglutinating activity and electrophoretic pattern of hemolymph serum proteins of *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus injections. *Aquaculture* 270, 529-534.

Plumb, J.A. and Zilberg, D., 1999. The lethal dose of largemouth bass virus in juvenile largemouth bass and the comparative susceptibility of stripped bass. *J. Aquat. Anim. Health* 11: 246–252.

Sahul-Hameed, A.S., Charles, M.X. and Anilkumar, M., 2000. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 183: 207-213.

Sahul-Hameed, A.S., Yoganandhan, K., Sathish, S., Rasheed, M., Murugan, V. and Jayaraman, K., 2001. White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomus* and *P. pulvinata*). *Aquaculture* 201: 179-186.

Sahul-Hameed, A.S., Murthi, B.L.M., Rasheed, M., Sathish, S., Yoganandhan, K., Murugan, V. and Jayaraman, K., 2002. An investigation of Artemia as a possible vector for white spot syndrome virus (WSSV) transmission to *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 204: 1-10.

Rahman, M.M., Alday-Sanz, V., Pensaert, M.B., Sorgeloos, P. and Nauwynck, H.J., 2008. Differences in virulence between white spot syndrome virus (WSSV) isolates and testing of some control strategies in WSSV infected shrimp.

Robalino, J., Bartlett, T.C., Chapman, R.W., Gross, P.S., Browdy, C.L. and Warr, G.W., 2007. Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 539-547.