



ẢNH HƯỞNG CỦA PROTEIN LvCTL3 TÁI TỔ HỢP LÊN CHỈ TIÊU MIỄN DỊCH, TĂNG TRƯỞNG VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH AHPND TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*) DO *Vibrio parahaemolyticus*

Trần Vinh Phương^{1,2}, Nguyễn Quang Linh², Trần Thị Bách Thảo¹,
Nguyễn Đức Quỳnh Anh², Nguyễn Ngọc Phước^{2*}

¹Đại học Huế, 3 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

²Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Ngọc Phước <nguyennhocphuoc@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 7-3-2024; Ngày chấp nhận đăng: 3-5-2024)

Tóm tắt. Tôm thẻ chân trắng có khối lượng $0,55 \pm 0,1$ g/con được cho ăn với khẩu phần cơ bản có hoặc không bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp với các nồng độ lần lượt 100; 200 và 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tương ứng với hàm lượng 2; 4 và 10 mg/kg thức ăn. Sau 30 ngày thí nghiệm tôm được thu thập để xác định các chỉ tiêu tăng trưởng, tỷ lệ sống và máu tôm được lấy để phân tích các chỉ tiêu miễn dịch. Sau đó, tôm được thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (nồng độ 1×10^5 CFU/mL). Kết quả các chỉ tiêu tăng trưởng, hệ số chuyển đổi thức ăn và các chỉ tiêu miễn dịch: tổng số tế bào máu, hoạt tính các enzyme: phenoloxidase, Superoxide dismutase (SOD), lysozyme và hoạt động thực bào của máu tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm ăn thức ăn có bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp cao hơn đáng kể so với đối chứng ($p < 0,05$). Trong đó, tôm được cho ăn chế độ ăn có bổ sung 4 hoặc 10 mg/kg thức ăn có tổng số tế bào máu và SOD được ghi nhận cao hơn so với các nghiệm thức còn lại. Sau 15 ngày cảm nhiễm, tỷ lệ chết tích lũy của tôm ở các nghiệm thức từ 20,0–36,67%, là thấp hơn đáng kể so với đối chứng (63,66%).

Từ khóa: miễn dịch, protein LvCTL3 tái tổ hợp, tôm thẻ chân trắng, *Vibrio parahaemolyticus*

Effect of recombinant LvCTL3 protein on the immune parameters, growth performance, diseases resistance of white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against AHPND causing *Vibrio parahaemolyticus*

Tran Vinh Phuong^{1,2}, Nguyen Quang Linh², Tran Thi Bach Thao¹,
Nguyen Duc Quynh Anh², Nguyen Ngoc Phuoc^{2*}

¹ Hue University, 3 Le Loi St., Hue, Vietnam

² University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Ngoc Phuoc <nguyennngocphuoc@hueuni.edu.vn>

(Submitted: March 7, 2024; Accepted: May 3, 2024)

Abstract. Whiteleg shrimp (size of 0.55 ± 0.1 g) were fed basic diets either without or with supplementation of recombinant LvCTL3 protein at concentrations of 100; 200 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ equivalent to 2; 4 and 10 mg/kg. After a 30-day feeding trial, shrimp were collected to measure growth parameters and survival rate, and shrimp hemolymph was also collected for analysis of immune parameters. Then, the shrimp were challenged with *Vibrio parahaemolyticus* at a concentration of 1×10^5 CFU/mL for 15-day. The results indicated that the growth performance, feed conversion ratio, immune parameters such as total hemocyte count, phenoloxidase, superoxide dismutase, lysozyme enzyme activity, and phagocytic activity of shrimp in the treated groups were significantly higher than those in the control ($p < 0.05$). Specifically, the dietary supplementation with recombinant LvCTL3 protein at 4 or 10 mg/kg showed better results than the other treatments. After a 15-day bacterial challenged test, the cumulative mortality rate of shrimp in the treated ranged from 20.0 to 36.67% which was significantly lower than that of the control group (63.66%) ($p < 0.05$).

Keywords: immune, recombinant LvCTL3 protein, white-leg shrimp, *Vibrio parahaemolyticus*

1 Đặt vấn đề

Vibrio parahaemolyticus được xem là tác nhân chính gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (Acute hepatopancreatic Necrosis Disease - AHPND) hay còn gọi là Hội chứng chết sớm (Early Mortality Syndrome - EMS) đã gây chết hàng loạt đối với tôm nuôi dưới 30 ngày tuổi, đang là thách thức lớn nhất cho nghề nuôi tôm hiện nay trên thế giới và Việt Nam. Bệnh AHPND xuất hiện lần đầu tiên tại Trung Quốc (2009), Việt Nam (2010), Malaysia (2010) và Thái Lan (2012) sau đó lan rộng ra các nước khác nhưng đến nay vẫn chưa có giải pháp phòng và trị bệnh hiệu quả [1]. Hệ thống miễn dịch của tôm không có miễn dịch đặc hiệu, chúng chỉ có miễn dịch bẩm sinh nhằm chống lại tác nhân gây bệnh do vậy không tạo ra đáp ứng nhớ miễn dịch đối với từng loại tác nhân gây bệnh [1]. Khi có tác nhân gây bệnh xâm nhập, các phân tử thụ thể nhận diện có khả năng kết hợp với nhiều loại phân tử của mầm bệnh khác nhau như lipopolysaccharide của màng tế bào vi khuẩn Gram âm và kích hoạt phản ứng tiêu diệt tác nhân gây bệnh [2]. Hệ thống miễn dịch không đặc hiệu của tôm thẻ chân trắng thường bị suy giảm đáng kể khi bị cảm nhiễm vi

khuẩn *V. parahaemolyticus* [3]. Gần đây, những nghiên cứu bổ sung các chất kích thích miễn dịch như lectin, probiotic, synbiotic hay thảo dược có vai trò quan trọng trong việc nâng cao khả năng đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) đang được quan tâm. Trong đó, lectin được biết đến là một protein có thể gắn kết với glycoprotein hoặc glycolipid trên bề mặt tác nhân gây bệnh làm ức chế sự xâm nhập của tác nhân gây bệnh nên lectin được xem là phân tử nhận diện quan trọng giúp nâng cao hoạt động miễn dịch bẩm sinh của động vật [4]. C-type lectin (CTL) từ tôm thẻ chân trắng đã được chứng minh tham gia vào một loạt các phản ứng miễn dịch bẩm sinh bao gồm nhận diện mầm bệnh, ngưng kết vi khuẩn, diệt vi sinh vật và kháng virus, tăng cường opsonin hóa và quá trình tạo thể bao tế bào [5]. Cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào về ảnh hưởng của CTL tái tổ hợp lên tăng trưởng của tôm, mà chủ yếu tập trung vào đánh giá ảnh hưởng của các loại CTL tái tổ hợp lên khả năng kháng bệnh của giáp xác. Năm 2020, Nguyễn Thị Phương Thảo và cs. [6], cho biết việc ứng dụng kỹ thuật gene và protein tái tổ hợp có thể giúp tăng cường biểu hiện CTL để sử dụng như chất kích thích miễn dịch bổ sung vào thức ăn cho tôm, và có tiềm năng ứng dụng trong hỗ trợ điều trị bệnh AHPND do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra trên tôm thẻ chân trắng. Những nghiên cứu gần đây của chúng tôi đã phân lập, tạo dòng thành công gene LvCTL3 mã hóa CTL từ tôm thẻ chân trắng (*L. vannamei*), phân tử LvCTL3 có trọng lượng đạt 20 kDa [7], có hoạt tính ngưng kết mạnh với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND trên tôm thẻ chân trắng (số liệu chưa công bố). Trong nghiên cứu này, protein LvCTL3 tái tổ hợp được bổ sung vào thức ăn nhằm nâng cao đáp ứng miễn dịch, tăng trưởng và khả năng kháng bệnh của tôm thẻ chân trắng do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trong điều kiện *in vivo*.

2 Vật liệu và Phương pháp

2.1 Vật liệu

Chuẩn bị nguồn protein LvCTL3 tái tổ hợp: Protein LvCTL3 được sản xuất bằng công nghệ DNA tái tổ hợp biểu hiện thành công trong vật chủ *Escherichia coli* BL21 (DE3), với khuẩn lạc tế bào *E. coli* TOP10 tái tổ hợp mọc trên môi trường có 100 µg/mL Kanamycin. Sự biểu hiện protein LvCTL3 tái tổ hợp ở *E. coli* BL21 (DE3) trong môi trường LB (Luria Bertani Agar, Himedia, Ấn Độ) được thể hiện trên gel polyacrylamide bằng kỹ thuật SDS - Page (kết quả chưa công bố). Ba nồng độ protein: CTL1 (100 µg/mL); CTL2 (200 µg/mL) và CTL3 (500 µg/mL) được chuẩn bị từ mẫu chuẩn có nồng độ 500 µg/mL, pha loãng bằng dung dịch đệm muối phốt phát (PBS - Phosphate-buffered saline) để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Chuẩn bị thức ăn: Việc chuẩn bị nguyên liệu (có điều chỉnh) và bảo quản khẩu phần được tiến hành theo nghiên cứu của Hong và cs. [8], thành phần nguyên liệu (% vật chất khô) gồm: bột cá: 35%; Lecithin: 2%; dầu cá: 3%; bột đậu nành: 20%; bột ngô: 2,5%; Vitamin hỗn hợp: 2%; và Cholesterol: 2,0% nguyên liệu được cân và nghiền nhỏ, rây qua lưới 60 µm, và trộn đều. Các nguyên liệu được phối trộn với dầu cá và nước trước khi cho vào máy đùn tạo viên có kích thước từ 0,5–1 mm để đạt thành phần dinh dưỡng của thức ăn sau khi phối trộn tương tự như nghiên

cứ của Hong và cs. [8] như sau: protein 40,21%; lipid 7,26%; khoáng 12,30% và độ ẩm 11,47%. Nguồn nguyên liệu được mua từ các nguồn như nghiên cứu của Hong và cs. [8]. Thức ăn được ở bảo quản ở nhiệt độ phòng trong 72 giờ. Lấy 20 mL dung dịch protein LvCTL3 tái tổ hợp ở các nồng độ 100; 200 và 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ phun đều trong 1 kg khẩu phần để đạt nồng độ 2; 4 và 10 mg/kg thức ăn tương ứng với ba nghiệm thức CTL1, CTL2 và CTL3. Nghiệm thức đối chứng được bổ sung 20 mL dung dịch đệm PBS. Sau đó thức ăn được để khô ở nhiệt độ phòng trong 20 phút và bảo quản 4 °C để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Chuẩn bị vi khuẩn: Chủng *V. parahaemolyticus* TTHVP202101001 được xác định là tác nhân gây bệnh AHPND trên tôm thẻ chân trắng [9], được bảo quản trong Glycerol ở -80 °C và được phục hồi trên môi trường Tryptone Soya Agar (TSA, HiMedia, Ấn Độ) có bổ sung 2% NaCl. Lấy 1 khuẩn lạc trên đĩa thạch nuôi cấy tăng sinh trong 10 mL Tryptone Soya Broth bổ sung 2% NaCl (TSB, HiMedia, Ấn Độ) ở nhiệt độ 28 °C trong 24 giờ. Dung dịch vi khuẩn được li tâm với tốc độ 3000 vòng trong 10 phút bằng máy ly tâm (Digisystem Laboratory Instruments Inc., Đài Loan), loại bỏ phần dịch nổi. Dùng nước muối sinh lý 0,85% NaCl rửa vi khuẩn hai lần, sau đó cho 10 mL dung dịch nước muối sinh lý vào để tạo huyền phù. Đo mật độ vi khuẩn bằng máy đo mật độ quang học (Spectrophotometer model 4111 RS, Zuzi, Tây Ban Nha) ở bước sóng 620 nm, dùng nước muối sinh lý pha loãng đến giá trị $\text{OD}_{620} = 1$ (tương đương 10^9 CFU/mL).

Tôm thí nghiệm: được cung cấp từ Công ty TNHH MTV Thương mại Thủy sản Quốc Thắng, Thừa Thiên Huế có khối lượng trung bình $0,55 \pm 0,1$ g/con và được kiểm dịch không mang mầm bệnh đốm trắng (WSSV), bệnh hoại tử cơ quan tạo máu và biểu mô (IHHNV) và AHPND tại Chi cục Chăn nuôi và Thú y tỉnh Thừa Thiên Huế. Tôm được nuôi thuần trong bể composite (có thể tích 1 m³) trong 14 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm. Các yếu tố môi trường trong quá trình nuôi thuần và quá trình thí nghiệm duy trì trong khoảng tương ứng nhiệt độ là 22–23 °C; pH: 7,5–8,0; độ mặn 22–25‰ và hàm lượng oxy hòa tan 5–6 mg/L. Tôm được cho ăn 3 lần/ngày vào lúc 8 giờ 00, 13 giờ 00 và 17 giờ 00 với khẩu phần ăn bằng 3% trọng lượng thân/ngày. Trước khi bố trí thí nghiệm, tôm được kiểm tra không bị nhiễm khuẩn *Vibrio* bằng cách cấy trực tiếp mẫu gan tụy của 5 tôm ngẫu nhiên trong bể lên môi trường Thiosulfat Citrat Bile Salt Agar (TCBS, HiMedia, Ấn Độ) và ủ ở nhiệt độ 28 °C trong 24 giờ và kiểm tra sự phát triển của vi khuẩn theo mô tả của Nguyễn Ngọc Phước và cs. [10]. Sau 30 ngày thí nghiệm cho ăn thức ăn có bổ sung nồng độ protein LvCTL3 tái tổ hợp, 30 tôm/nghiệm thức (10 tôm/bể) được chọn ngẫu nhiên để gây bệnh thực nghiệm với *V. parahaemolyticus* TTHVP202101001 với mật độ 1×10^5 CFU/mL [9].

2.2 Ảnh hưởng của protein LvCTL3 tái tổ hợp đến tăng trưởng và đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí với bốn nghiệm thức với ba lần lặp lại/nghiệm thức. Bao gồm nghiệm thức đối chứng (ĐC), chỉ sử dụng khẩu phần cơ bản (không bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp), với ba nghiệm thức có bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp với các mức như sau; nghiệm thức CTL1: 2 mg/kg thức ăn; nghiệm thức CTL2: 4 mg/kg thức ăn và nghiệm thức CTL3: 10 mg/kg thức ăn. Tôm có khối lượng ban đầu là $0,55 \pm 0,1$ g/con được bố trí ngẫu nhiên vào 12 bể (120 L, 30 con/bể), sục khí liên tục và được cho thức ăn có hoặc không bổ

sung protein LvCTL3 tái tổ hợp trong 30 ngày. Bể thí nghiệm luôn được vệ sinh hàng ngày bằng cách siphon hết cặn, phân, vỏ và tôm chết vào buổi sáng.

Các chỉ tiêu theo dõi: Sau 30 ngày thí nghiệm, tiến hành thu ngẫu nhiên 10 con/bể để xác định các chỉ tiêu tăng trưởng và miễn dịch. Các chỉ tiêu tăng trưởng cụ thể: tăng trọng (WG, g), tăng trưởng khối lượng theo ngày (DWG, g/ngày), tăng trưởng đặc trưng (SGR, %/ngày), hệ số chuyển đổi thức ăn (FCR) và tỷ lệ sống (SR, %) được tính theo công thức của Adel và cs. [11].

- Tăng trọng (Weight Gain - WG)

$$WG (g) = W_2 (g) - W_1 (g) \quad (1)$$

- Tốc độ tăng trưởng khối lượng theo ngày (g/ngày) (Daily weight gain - DWG)

$$DWG (g/ngày) = W_2 - W_1/T \quad (2)$$

- Tốc độ tăng trưởng đặc trưng (%/ngày) (Specific growth rate - SGR)

$$SGR (\%/ngày) = (\ln W_2 - \ln W_1) \times 100/T \quad (3)$$

trong đó: W_2 : khối lượng tôm sau khi kết thí nghiệm; W_1 : khối lượng tôm ban đầu; T: là khoảng thời gian thí nghiệm.

- Hệ số chuyển đổi thức ăn (Feed conversion ratio - FCR)

$$FCR = \text{Tổng lượng thức ăn ăn vào (g) / Khối lượng tăng trọng của tôm (g)} \quad (4)$$

- Tỷ lệ sống

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = (\text{Số tôm còn sống còn lại} / \text{Số tôm đưa vào thí nghiệm}) \times 100 \quad (5)$$

Các chỉ tiêu miễn dịch: Sau khi đo khối lượng, 6 con/bể (số tôm này được lấy từ 10 tôm được thu để cân khối lượng) được lấy mẫu máu để đánh giá đáp ứng miễn dịch tự nhiên gồm tổng số lượng tế bào máu (THC), hoạt tính phenoloxidase (PO); Superoxide dismutase (SOD) và lysozyme (LYS) và 6 con tôm khác từ mỗi thí nghiệm thức được sử dụng để xác định hoạt động thực bào (PA - Phagocytic Activity).

Tổng tế bào máu (THC): được xác định theo phương pháp của Le Moullac và cs. [12]. Dùng xylanh (1mL) chứa 900 μ L dung dịch chống đông máu (30 mM trisodium citrate; 0,34 M NaCl và 10 mM EDTA ở độ pH 7,55 trung hoà bằng glucose đến 780 Osm/kg). Lấy 100 μ L máu tôm từ chân bò thứ 3 của tôm. Số lượng tế bào máu được đếm (lặp lại 3 lần) bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer-improved và quan sát dưới kính hiển vi quang học (Leica, Đức) (độ phóng đại 40 \times) và tính tổng tế bào máu tôm bằng công thức (6).

$$THC = \text{số tế bào máu đếm được} \times 10.000 / \text{số ô vuông đếm} \times \text{hệ số pha loãng (tế bào/mL)} \quad (6)$$

Hoạt tính phenoloxidase (PO): Hoạt tính enzyme PO được phân tích bằng cách xác định sự hình thành dopachrome từ L-DOPA (L-3, -4-dihydroxyphenylalanine, Sigma) theo phương pháp của Pan và cs. [13], Sung và cs. [14]. Lấy 350 μ L hỗn hợp máu tôm với chất chống đông máu ly tâm ở tốc độ 6.500 vòng/phút trong 2 phút ở nhiệt độ 4 °C. Loại bỏ phần dịch nổi, phần lắng được rửa sạch và trộn nhẹ nhàng trong 700 μ L dung dịch đệm cacodylate 0,1 M (natri cacodylate 10 mM, natri clorua 450 mM và trisodium citrat 100 mM; pH 7,0), sau đó tiếp tục ly tâm (10.000 vòng/phút, 10 phút, 4 °C). Lấy 50 μ L phần dịch nổi trộn với 100 μ L trypsin 0,1% (hòa tan trong dung dịch đệm cacodylate 0,1 M) và ủ trong 10 phút ở 25 °C. Sau đó, cho 50 μ L L-DOPA (3 mg/mL cacodylate 0,1 M) vào và tiếp tục ủ trong 20 phút ở 25 °C, tiếp theo bổ sung 150 μ L dung dịch đệm cacodylate 0,1 M. Hoạt tính PO được xác định bằng máy đo quang phổ (Jasco, Nhật Bản) tại bước sóng 490 nm. Đơn vị biểu thị là U/mg protein.

Hoạt tính superoxide dismutase (SOD): được xác định bằng bộ Kit 706.002; (Cayman, Hoa Kỳ), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Một đơn vị hoạt độ SOD được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để phân hủy 50% gốc superoxide và hoạt tính cụ thể được biểu thị bằng U/mg protein.

Hoạt tính lysozyme (LYS): Hoạt tính lysozyme được xác định theo phương pháp của Chiu và cs. [15]: lấy 500 μ L dung dịch máu tôm ly tâm ở tốc độ 6.500 vòng/phút trong 2 phút. Loại bỏ phần dịch nổi, phần lắng ở dưới được trộn với 1 mL (0,02%) dung dịch *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, Hoa Kỳ) ở nhiệt độ phòng. Đo mật độ quang dung dịch ở bước sóng 530 nm sau 0,5 và 4,5 phút trên máy quang phổ (Jasco, Nhật Bản). Một đơn vị hoạt độ của enzyme lysozyme tạo ra tương đương với sự giảm độ hấp thụ 0,01/phút, và được biểu thị là U/mg protein.

Hoạt động thực bào (PA): Hoạt động thực bào của tế bào máu tôm được xác định theo phương pháp của Huynh và cs. [16], Liu và Chen [17]. Lấy 20 μ L dung dịch vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TTHVP202101001 (tương đương với mật độ 10^6 CFU/mL, sau đó pha loãng về nồng độ 1×10^5 CFU/mL (giá trị LD₅₀ của kết quả nghiên cứu trước) tiêm vào xoang bụng của 2 con/bể (6 con/nghiệm thức). Sau khi tiêm 2 giờ, tiến hành lấy máu tôm như đã trình bày ở trên. Lấy 100 μ L mẫu máu trộn với 100 μ L paraformaldehyde 0,1% để cố định các tế bào máu trong 30 phút ở 4 °C. Tiếp theo, lấy 50 μ L dung dịch tế bào máu đã cố định nhỏ lên phiến kính và ly tâm với tốc độ 1.000 vòng trong 3 phút ở máy Cytospin TD-4K (Hunan, Trung Quốc). Sau đó, các lam kính được để khô ở nhiệt độ phòng và nhuộm bằng thuốc nhuộm Wright-Giemsa. 200 tế bào máu tôm được quan sát bằng kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 40 \times . Hoạt động thực bào (PA) được xác định theo công thức (7).

$$PA (\%) = (\text{số tế bào máu có hoạt động thực bào} / 200 \text{ tế bào máu quan sát}) \times 100 \quad (7)$$

2.3 Đánh giá ảnh hưởng của protein LvCTL3 tái tổ hợp lên khả năng kháng bệnh AHPND trên tôm thẻ chân trắng trong điều kiện *in vivo*

Bố trí thí nghiệm: Tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm có khối lượng trung bình $5,0 \pm 0,8$ g/con (10 tôm/bể, 3 bể/nghiệm thức, được sử dụng từ kết quả của thí nghiệm trên) được cảm nhiễm bằng cách ngâm trong 10 L nước biển 20‰ chứa vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

TTHVP202101001 ở 1×10^5 CFU/mL với nhiệt độ nước $28 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 1 giờ theo phương pháp của Loc và cs. [18]. Tôm sau khi cảm nhiễm được nuôi riêng ở các bể khác nhau (120 L) với hệ thống nước chảy tốc độ 0,38 L/phút, nhiệt độ nước ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 15 ngày. Tôm được cho ăn với chế độ ăn cơ bản và khẩu phần bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp như thí nghiệm trước 3 lần/ngày, liên tục trong 15 ngày. Theo dõi dấu hiệu bệnh lý và tỷ lệ chết hàng ngày. Tỷ lệ chết tích lũy được xác định sau khi kết thúc thí nghiệm theo công thức của Ellis [19]. Thu mẫu tôm còn sống và tái phân lập trên môi trường TCBS từ mẫu gan tụy được định danh bằng test kit API 20E (Biomérieux- Pháp).

$$\text{Tỷ lệ chết tích lũy (\%)} = (\text{Tổng số tôm chết tích lũy theo ngày} / \text{Tổng số tôm thí nghiệm}) \times 100 \quad (8)$$

2.4 Xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm MS. Excel 2016 để tính giá trị trung bình (Mean) và sai số chuẩn (SE). Phân tích ANOVA một nhân tố trong phần mềm SPSS 16.0 để so sánh các giá trị trung bình ở mức $p < 0,05$ bằng phép thử LSD.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ protein LvCTL3 tái tổ hợp lên đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng

Tăng trưởng của tôm thí nghiệm

Tốc độ tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng thí nghiệm ở các nghiệm thức có hoặc không có sử dụng protein LvCTL3 tái tổ hợp được trình bày ở Bảng 1. Khi bổ sung LvCTL3 vào thức ăn thì các chỉ tiêu tăng trưởng ở tôm đều cao hơn tôm ở nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Các chỉ tiêu tăng trưởng như tăng trưởng về khối lượng (WG), tốc độ tăng trưởng khối lượng theo ngày (DWG), tăng trưởng đặc trưng (SGR) đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 4 mg/kg thức ăn (nghiệm thức CTL2) và 10 mg/kg thức ăn (nghiệm thức CTL3). Hệ số chuyển đổi thức ăn (FCR) ở các nghiệm thức bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp thấp hơn nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Khi bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp ở các mức 4 hoặc 10 mg/kg thức ăn cho thấy các chỉ tiêu của tôm như WG, DWG và SGR đều cao hơn và giá trị FCR thấp hơn tôm ở nghiệm thức bổ sung 2 mg/kg (nghiệm thức CTL1) ($p < 0,05$). Đặc biệt, không có sự sai khác về các chỉ tiêu này ở tôm cho ăn thức ăn bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp ở nồng độ 4 và 10 mg/kg thức ăn ($p > 0,05$). Tỷ lệ sống của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm và đối chứng sau 30 ngày nuôi đạt khá cao dao động từ 92,20–95,56% và không có sự sai khác giữa các nhóm thí nghiệm ($p > 0,05$). Cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào về ảnh hưởng của lectin lên tăng trưởng của giáp xác nói chung và tôm thẻ chân trắng nói riêng. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây của Hong và cs. [8], Hồng Mông Huyền và cs. [20], Châu Tài Tảo và cs. [21], cho thấy khi bổ sung các chất kích thích miễn dịch như dịch chiết từ thảo dược hoặc hỗn hợp dược liệu đều làm tăng tốc độ tăng trưởng đặc trưng, tăng trưởng khối lượng theo ngày của tôm thí nghiệm. Trong thí

Bảng 1. Tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng thí nghiệm

Thông số	Thí nghiệm thức			
	Đối chứng	CTL1	CTL2	CTL3
Khối lượng tôm ban đầu (g/con)	0,54 ^a ± 0,03	0,56 ^a ± 0,03	0,56 ^a ± 0,04	0,55 ^a ± 0,07
Khối lượng tôm kết thúc thí nghiệm (g/con)	4,12 ^a ± 0,07	4,62 ^b ± 0,07	5,75 ^c ± 0,09	5,77 ^c ± 0,09
Tăng trọng (g/con)	3,58 ^a ± 0,07	4,06 ^b ± 0,07	5,19 ^c ± 0,09	5,22 ^c ± 0,09
Tăng trưởng khối lượng theo ngày (DWG, g/ngày)	0,12 ^a ± 0,07	0,14 ^b ± 0,07	0,17 ^c ± 0,09	0,17 ^c ± 0,09
Tăng trưởng đặc trưng (SGR, %/ngày)	6,76 ^a ± 0,05	7,06 ^b ± 0,05	7,78 ^c ± 0,05	7,84 ^c ± 0,05
Hệ số chuyển đổi thức ăn (FCR)	1,39 ^a ± 0,05	1,22 ^b ± 0,04	1,06 ^c ± 0,04	1,10 ^c ± 0,06
Tỷ lệ sống (SR, %)	93,33 ^a ± 3,33	95,56 ^a ± 1,92	94,44 ^a ± 3,85	92,20 ^a ± 3,85

Chú thích: Số liệu được biểu hiện giá trị trung bình (Mean) ± sai số chuẩn (SE). Ký tự ^{a, b, c} giống nhau trong cùng một hàng không có sự sai khác thống kê ($p > 0,05$). Khẩu phần ăn: Đối chứng = khẩu phần cơ bản; Protein LvCTL3 tái tổ hợp ở mức 2 mg/kg khẩu phần ăn (CTL1), hoặc 4 mg/kg khẩu phần (CTL2), hoặc 10 mg/kg khẩu phần (CTL3).

nghiệm này, việc bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp đã giúp tôm đạt tốc độ tăng trưởng tương đối lên 7,06–7,84%/ngày. Như vậy, việc bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp đã giúp tăng các chỉ tiêu tăng trưởng ở tôm thẻ chân trắng.

Đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thẻ chân trắng

Khi bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp đã cải thiện các chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu trên tôm thẻ chân trắng, các chỉ tiêu như tổng số tế bào máu (THC), hoạt tính các enzyme như PO, SOD, LYS và khả năng thực bào (PA) ở tôm khi bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp đều cao hơn tôm ở nghiệm thức đối chứng (chi tiết tại Bảng 2).

Tổng số tế bào máu: Tổng số tế bào máu của tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức có bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp ở các mức 2; 4 hoặc 10 mg/kg lần lượt là 14,50; 17,70 và 17,32 × 10⁶ tế bào/mL cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (13,20 × 10⁶ tế bào/mL) ($p < 0,05$). Tổng số tế

Bảng 2. Chỉ tiêu miễn dịch của tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức thí nghiệm

Chỉ tiêu	Thí nghiệm thức			
	Đối chứng	CTL1	CTL2	CTL3
THC (× 10 ⁶ tế bào/mL)	13,20 ^a ± 0,22	14,50 ^b ± 0,72	17,70 ^c ± 0,71	17,32 ^c ± 0,77
PO (U/mg protein)	0,16 ^a ± 0,01	0,22 ^b ± 0,01 ^b	0,24 ^{bc} ± 0,01	0,26 ^c ± 0,02
SOD (U/mg protein)	0,81 ^a ± 0,02	1,43 ^b ± 0,04	1,52 ^c ± 0,03	1,49 ^c ± 0,04
LYS (U/mg protein)	0,56 ^a ± 0,06	0,88 ^b ± 0,05	0,88 ^b ± 0,07	0,90 ^b ± 0,05
PA (%)	90,33 ^a ± 2,32	95,50 ^b ± 1,26	97,00 ^b ± 1,45	97,25 ^b ± 0,94

Chú thích: Số liệu trên là giá trị trung bình (Mean) ± sai số chuẩn (SE). Ký tự ^{a, b, c} giống nhau trong cùng một hàng không có sự sai khác thống kê ($p > 0,05$).

bào máu ở tôm các nghiệm thức CTL2 và CTL3 là tương đương nhau ($p > 0,05$), nhưng cao hơn so với THC của tôm được bổ sung mức 2 mg/kg thức ăn (nghiệm thức CTL1) ($p < 0,05$) (Bảng 2). Nghiên cứu này phù hợp với Li và cs. [22], khi bổ sung protein rLvLec hay rLvPLP tái tổ hợp vào tôm thẻ chân trắng (ở dạng tiêm) sẽ giúp tăng tổng số tế bào máu và hoạt tính PO. Các nghiên cứu của Jiravanichpaisal và cs. [23], Li và Xiang [24], tế bào máu có vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu ở tôm. Tế bào máu thực hiện chức năng bao vây, đóng gói tác nhân gây bệnh và thực hiện quá trình thực bào. Ngoài ra, tế bào máu tôm còn chứa và giải phóng các enzyme như PO, LYS làm tăng cường đáp ứng miễn dịch dịch thể ở tôm. Nhiều nghiên cứu cũng đã cho thấy việc tăng số lượng tế bào máu là chỉ tiêu quan trọng trong việc tăng đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu ở tôm và giúp tôm có khả năng kháng lại sự nhiễm khuẩn [8, 25, 26].

Hoạt tính PO: Hoạt tính PO ở nghiệm thức đối chứng không sử dụng khẩu phần bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp chỉ đạt 1,6 U/mg protein thấp hơn các nghiệm thức bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp trong khẩu phần thức ăn ($p < 0,05$) (Bảng 2). Hoạt tính PO cao nhất đạt 0,26 U/mg protein ở nghiệm thức bổ sung 10 mg/kg (nghiệm thức CTL3) nhưng không có sự khác biệt với nghiệm thức bổ sung 4 mg/kg thức ăn (nghiệm thức CTL2) ($p > 0,05$). Phenoloxidase là một enzyme quan trọng trong hệ thống miễn dịch thể dịch của giáp xác nói chung và ở tôm thẻ chân trắng nói riêng. Khi giáp xác bị tấn công bởi mầm bệnh, enzyme PO sẽ được kích hoạt nhằm bắt hoạt và ngăn chặn sự xâm nhập của tác nhân gây bệnh. Hoạt tính của PO sẽ tăng lên khi có sự tăng lên của THC [27]. Sự gia tăng của PO sẽ giúp tôm kháng lại sự cảm nhiễm vi khuẩn và giảm tỷ lệ chết của tôm [8, 20, 28]. Điều này cho thấy, việc bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp có vai trò quan trọng trong việc kích hoạt hệ thống miễn dịch và tăng cường khả năng đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm khi có sự xâm nhập của tác nhân gây bệnh. Đặc biệt là có khả năng hoạt hóa hệ thống enzyme PO để tạo ra các chất có khả năng chống lại vi khuẩn xâm nhập.

Hoạt tính SOD: Theo báo cáo của Fridovich [29], hoạt tính SOD là một trong những thành phần chính trong cơ chế đáp ứng miễn dịch bẩm sinh của giáp xác nhằm chống lại các tác nhân gây bệnh xâm nhập. Kết quả nghiên cứu sau 30 ngày thí nghiệm hoạt tính SOD ở các nghiệm thức có bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp đều cao hơn so với nghiệm thức sử dụng khẩu phần thức ăn cơ bản ($p < 0,05$). Trong đó, SOD ở tôm từ nghiệm thức CTL2 đạt 1,52 U/mg protein là tương đương với nghiệm thức CTL3 đạt 1,49 U/mg protein ($p > 0,05$) nhưng cao hơn đáng kể so với nghiệm thức CTL1 chỉ đạt 1,43 U/mg protein (Bảng 2). Việc gia tăng hoạt tính SOD ở tôm thẻ chân trắng giúp tôm kháng tốt hơn với sự cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* [20].

Hoạt tính lysozyme (LYS): Hoạt tính enzyme LYS của tôm tăng cao ở các nghiệm thức có bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp trong khẩu phần đạt 0,88 (U/mg protein) ở nghiệm thức bổ sung 2 mg/kg thức ăn (nghiệm thức CTL1) và 4 mg/kg thức ăn (nghiệm thức CTL2) và đạt 0,90 (U/mg protein) ở nghiệm thức bổ sung 10 mg/kg thức ăn (nghiệm thức CTL3), cao hơn đáng kể so với nghiệm thức chỉ sử dụng thức ăn cơ bản đạt 0,56 U/mg protein ($p < 0,05$). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này hoạt tính LYS không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức có bổ sung protein LvCTL3

tái tổ hợp ($p > 0,05$) (Bảng 2). Việc gia tăng hoạt tính LYS ở tôm thẻ chân trắng giúp tôm kháng tốt hơn với sự cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* [8, 20, 28, 30].

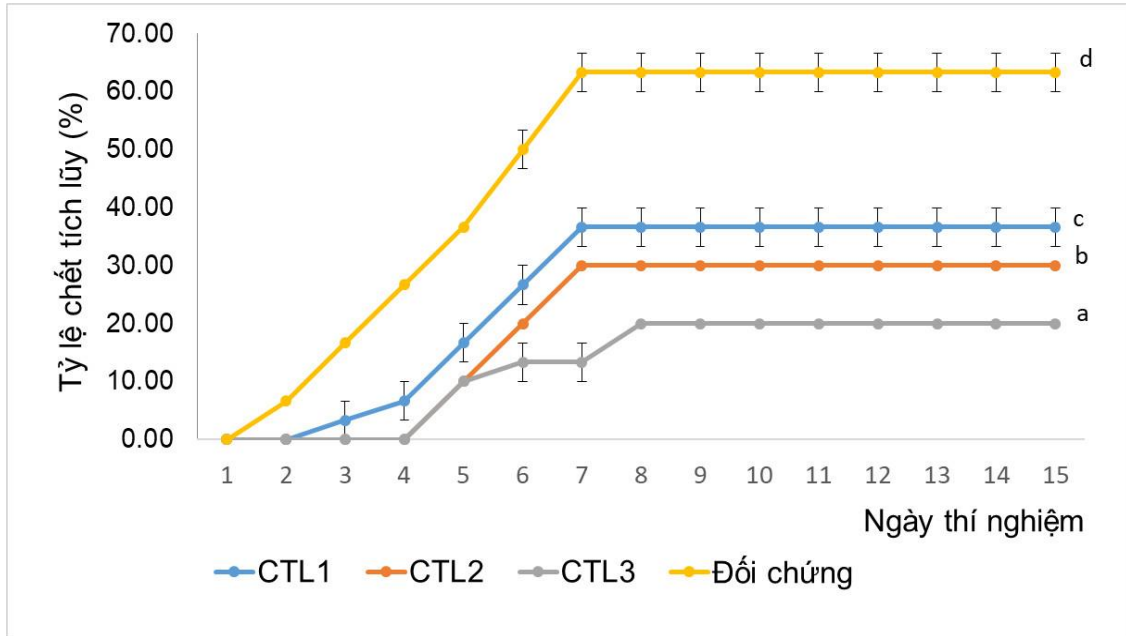
Hoạt động thực bào: Hoạt động thực bào (PA) ở các nghiệm thức đối chứng, CTL1, CTL2 và CTL3 lần lượt đạt 90,33; 95,50; 97,00 và 97,25%. Tương tự như hoạt tính LYS, hoạt động PA ở các nghiệm thức có bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp trong khẩu phần đều cao hơn đáng kể so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Tuy nhiên, không có sự khác biệt về hoạt động PA đối với các nghiệm thức có bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp trong khẩu phần ($p > 0,05$) (Bảng 2).

Do không có khả năng tạo ra kháng thể đáp ứng với kháng nguyên, tôm phụ thuộc vào hệ thống miễn dịch không đặc hiệu hay miễn dịch bẩm sinh để bảo vệ trước những mầm bệnh truyền nhiễm khác nhau. Hệ thống miễn dịch bẩm sinh ở tôm có cả hai loại miễn dịch tế bào và miễn dịch thể dịch. Trong đó, miễn dịch tế bào là các hoạt động: 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 được thực hiện bởi tế bào máu. Đáp ứng miễn dịch thể bao gồm các cơ chế tác động bao gồm đông máu, sản xuất peptide kháng khuẩn [31]. Việc bổ sung protein LvCTL3 cho thấy các chỉ tiêu miễn dịch tế bào và miễn dịch thể đều tăng dẫn đến tăng khả năng thực bào ở tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm so với nghiệm thức đối chứng.

3.2 Ảnh hưởng của protein LvCTL3 trong khả năng phòng trị bệnh AHPND trên tôm thẻ chân trắng trong điều kiện *in vivo*

Tỷ lệ chết tích lũy

Khi bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp trong thức ăn đã giúp giảm tỷ lệ chết của tôm thẻ chân trắng khi cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TTHVP202101001. Sau khi gây bệnh thực nghiệm, tôm ở nghiệm thức sử dụng khẩu phần cơ bản (không bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp) có tỷ lệ chết tích lũy cao nhất (63,33%), cao hơn so với tất cả các nghiệm thức có bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp trong khẩu phần ($p < 0,05$). Tỷ lệ chết tích lũy của tôm có giảm dần tương ứng với sự gia tăng nồng độ protein LvCTL3 tái tổ hợp bổ sung trong thức ăn ở các nghiệm thức thí nghiệm (Hình 1). Tỷ lệ chết tích lũy thấp nhất ở nghiệm thức CTL3 chỉ 20% thấp hơn đáng kể so với nghiệm thức CTL2 (đạt 30%) và nghiệm thức CTL1 (36,67%) ($p < 0,05$). Tỷ lệ chết tích lũy của tôm thí nghiệm được ghi nhận đầu tiên vào ngày thứ 2 đối với nghiệm thức đối chứng (không bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp) là 6,67% và tăng lên 16,67% vào ngày thứ 3; và cao nhất là 63,33% vào ngày thứ 7 sau cảm nhiễm. Đối với nghiệm thức có bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp ở nồng độ 2 mg/kg (nghiệm thức CTL1) tôm bắt đầu chết vào ngày thứ 3 (3,33%), chậm hơn 1 ngày so với thức đối chứng, sau đó tăng dần và cao nhất đạt 36,67% từ ngày thứ 7. Trong khi đó, 2 nghiệm thức có bổ sung nồng độ protein LvCTL3 tái tổ hợp cao hơn (4 hoặc 10 mg/kg) tôm chết được ghi nhận muộn hơn sau 2 ngày so với nghiệm thức CTL1 và sau 3 ngày so với nghiệm thức đối chứng, và tỷ lệ chết cao nhất được ghi nhận vào ngày thứ 7 đối với nghiệm thức CTL2 (30%) và đối với nghiệm thức CTL3 vào ngày thứ 8 (20%). Kết quả này cho thấy, việc bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp làm tăng đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân

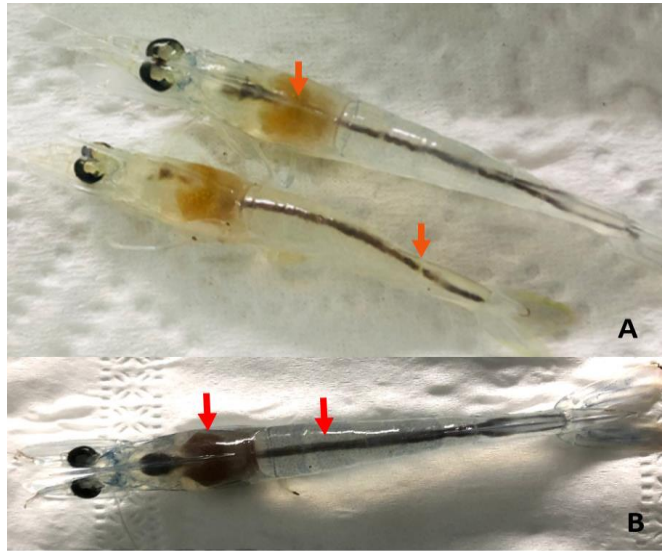


Hình 1. Tỷ lệ chết tích lũy của tôm thí nghiệm

trắng, làm chậm quá trình bệnh lý sau khi vi khuẩn xâm nhập vào cơ thể. Đồng thời việc bổ sung nồng độ protein LvCTL3 tái tổ hợp khác nhau cũng có sự tác động đến tăng cường sức đề kháng trong việc đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng trong cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh. Ở các nồng độ bổ sung cao hơn (4 hoặc 10 mg/kg thức ăn) các chỉ tiêu miễn dịch như THC, PO, SOD, LYS và khả năng thực bào (PA) đều tăng cao hơn các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$), tôm có khả năng kháng vi khuẩn cao hơn dẫn đến dấu hiệu bệnh lý xuất hiện muộn hơn và tỷ lệ chết cũng thấp hơn. Việc bổ sung thức ăn có nồng độ protein LvCTL3 tái tổ hợp bước đầu cho thấy protein LvCTL3 tái tổ hợp có vai trò trong việc giúp tôm thẻ chân trắng tăng cường khả năng đáp ứng miễn dịch và giảm tỷ lệ chết khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND.

Diễn biến bệnh lý

Trước đó, các dấu hiệu ghi nhận ban đầu cho thấy, tôm thẻ chân trắng sau hai ngày cảm nhiễm (đối với nghiệm thức đối chứng) và sau ba ngày đối với các nghiệm thức có bổ sung protein LvCTL3 trong khẩu phần, với các có dấu hiệu điển hình: bơi lơ đờ, hoạt động chậm. Dấu hiệu bệnh lý thể hiện rõ nhất vào ngày thứ bảy, tôm bị bệnh có dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của bệnh AHPND tương tự như mô tả của Lightner và cs. [32]: bị mềm vỏ, khối gan tụy teo và có màu vàng nhạt và ruột có thức ăn đứt quãng (Hình 2A). Trong khi đó, cùng thời điểm những tôm khỏe mạnh có khối gan tụy đều hai bên, màu nâu đậm và thức ăn trong ruột không đứt quãng (Hình 2B). Tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức cảm nhiễm được tái phân lập trên môi trường TCBS từ mẫu gan tụy được định danh bằng test kit API 20E được xác định là chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với các dấu hiệu đặc trưng. Thông qua kết quả định danh có thể xác định tôm



Hình 2. Tôm nhiễm bệnh (A) và tôm không nhiễm bệnh (B)

Chú thích: A: tôm vàng gan, ruột có thức ăn đứt quãng (mũi tên cam); B: gan tụy nâu đen, đều và ruột đầy thức ăn (mũi tên đỏ).

thí nghiệm chết với các dấu hiệu điển hình của bệnh lý AHPND là do nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* [10].

4 Kết luận

Tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn có bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp trong khẩu phần với mức 2; 4 hoặc 10 mg/kg có ảnh hưởng rõ đến các chỉ số tăng trưởng (WG, DWG và SGR), hệ số chuyển đổi thức ăn và tăng cường khả năng đáp miễn dịch của tôm thẻ chân trắng. Vì vậy, nên bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp vào khẩu phần ăn của tôm ở mức 4 mg/kg để nâng cao tốc độ sinh trưởng, sức khỏe của tôm nuôi và tăng hiệu quả kinh tế.

Kết quả bước đầu cho thấy việc bổ sung protein LvCTL3 tái tổ hợp vào khẩu phần giúp tôm thẻ chân trắng có khả năng kháng lại vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND với tỷ lệ chết tích lũy thấp hơn so với nhóm chỉ sử dụng khẩu phần cơ bản (63,66%).

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu được hỗ trợ tài chính từ Đề tài khoa học và công nghệ cấp Quốc gia, mã số ĐTĐL.CN-56/22; Chương trình Nhóm Nghiên cứu mạnh của Đại học Huế, mã số NCM.DHH.2022.005.

[Trần Vinh Phương] được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo (VinIF), mã số [VINIF.2023.TS.089].

Tài liệu tham khảo

1. OIE, (2020), *Immediate notifications, Acute hepatopancreatic necrosis disease.* (https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=36209&newlang=en).
2. Xu, T. W., Wang, X. W., Zhang, 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, <https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-010-0558-7>.
3. Võ Văn Tuấn, Nguyễn Thị Thanh Trúc, Võ Thị Thanh Bình (2020), Đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thẻ chân trắng, *Penaeus vannamei*, cảm nhiễm bởi vi khuẩn gây hoại tử gan tụy cấp tính *Vibrio parahaemolyticus*, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh*, 18(1), 81–88, <https://jad.hcmuaf.edu.vn/index.php/jad/article/view/86>.
4. Yu, X. Q. & 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, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.02.005>.
5. Liang, Z. Yang, L., Zheng, J., Zuo, H., Weng, S., He, J., 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*, 99, 29–34, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.11.002>.
6. 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, <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2020.061>.
7. Tran, V. P., Nguyen, X. H., Nguyen, Q. L., Hoang, T. Q., Tran, N. N., Nguyen, N. P., Nguyen, Q. L. (2023), Cloning and characterization of the *LvCTL* genes encoding C-type lectin from white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *F1000Research*, 12(260), <https://doi.org/10.12688/f1000research.126044.2>.
8. Hong, N. T. X., Nguyen, T. H. L., Baruah, K., Do, T. B. T., Nguyen, N. P. (2022), The Combined Use of *Pediococcus pentosaceus* and Fructooligosaccharide Improves Growth Performance, Immune Response, and Resistance of Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei* Against *Vibrio parahaemolyticus*, *Frontiers in Microbiology*, 13 (10), 1–10, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.826151/full>.
9. Trần Vinh Phương, Nguyễn Đức Quỳnh Anh, Nguyễn Thị Xuân Hồng, Nguyễn Ngọc Phước (2023), Nguyên nhân ban đầu gây chết trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) tại Thừa Thiên Huế, *Tạp chí khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 132(3A), 135–153, <https://jos.hueuni.edu.vn/index.php/hujos-ard/article/view/6953>.

10. Nguyễn Ngọc Phước, Nguyễn Nam Quang, Nguyễn Đức Quỳnh Anh (2021), Phân lập vi khuẩn tía quang hợp từ bùn đáy ao nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) tại tỉnh Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 2(tháng 6/2021), 84–90, <http://tapchinongnghiep.vn/tapchi/detail/3668>.
11. Adel, M., Yeganeh, S., Dawood, M. A. O., Safari, R., Radhakrishnan, R. (2017), Effects of *Pediococcus pentosaceus* supplementation on growth performance, intestinal microflora and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, *Aquaculture Nutrition*, 23(6), 1401–1409, <https://doi.org/10.1111/anu.12515>.
12. Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., VanWormhoudt, A. (1997), Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda), *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 208(1–2), 107–125, [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(96\)02671-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(96)02671-8).
13. Pan, L. Q., Hu, F. W., Jing, F. T., Liu, H. J. (2008), The effect of different acclimation temperatures on the prophenoloxidase system and other defence parameters in *Litopenaeus vannamei*, *Fish & Shellfish Immunology*, 25(1–2), 137–142, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.016>.
14. Sung, H. H., Kou, G. H., Song, Y. L. (1994), Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*), *Fish Pathology*, 29(1), 11–17, <https://doi.org/10.3147/jfsfp.29.11>.
15. Chiu, C. H., Guu, Y. K., Liu, C. H., Pan, T. M., Cheng, W. (2007), Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*, *Fish Shellfish Immunology*, 23(2), 364–377, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.11.010>.
16. Huynh, T. G., Cheng, A. C., Chi, C. C., Chiu, K. H., Liu, C. H. (2018), A synbiotic improves the immunity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Metabolomic analysis reveal compelling evidence, *Fish & Shellfish Immunology*, 79, 284–293, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.031>.
17. Liu, L., Xiao, J., Xia, X., Pan, Y., Yan, S., Wang, Y. (2015), Draft genome sequence of *Vibrio owensii* strain SH-14, which causes shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease, *Genome Announcements*, 3(6), e01395-15, <https://doi.org/10.1128/genomeA.01395-15>.
18. Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., 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, <https://www.int-res.com/abstracts/dao/v105/n1/p45-55/>.
19. Ellis, A. E. (1990), Lysozyme Assays. In: Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S. and Van Muiswinkel, W. B., Eds, *Techniques in Fish Immunology*, SOS Publications, Fair Haven, 101–103, https://books.google.com.vn/books/about/Techniques_in_Fish_Immunology_Fish_Immun.html?id=hbg7zAEACAAJ&redir_esc=y, 1990.
20. Hồng Mộng Huyền, Lê Quốc Việt, Trần Thị Tuyết Hoa, Lê Quốc Việt (2020), Ảnh hưởng của chất chiết thảo dược lên tăng trưởng, miễn dịch không đặc hiệu và khả năng kháng bệnh của

- tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) với *Vibrio parahaemolyticus*, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56(5B), 150–159, <https://ctujsvn.ctu.edu.vn/index.php/ctujsvn/article/view/3605>.
21. Châu Tài Tào, Hoàng Văn Lâm, Cao Mỹ Án, Trần Ngọc Hải (2017), Ảnh hưởng của hỗn hợp được liệu lên tăng trưởng, tỷ lệ sống và đáp ứng miễn dịch trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) nuôi thâm canh trong bể, *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 48(Phần B), 10–17, <https://ctujsvn.ctu.edu.vn/index.php/ctujsvn/article/view/2542>.
 22. Li Y., Pan L., Yu J. (2022), The injection of one recombinant C-type lectin (*LvLec*) induced the immune response of hemocytes in *Litopenaeus vannamei*, *Fish Shellfish Immunol*, 124, 324–331, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.04.017>.
 23. Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L., Söderhäll, K. (2006), Ceel-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization, *Immunobiology*, 211(4), 213–236, <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.015>.
 24. Li, F. & Xiang, J. (2013), Review: Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China, *Developmental & Comparative Immunology*, 39(1–2), 11–26, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.03.016>.
 25. Bao, L., Kim, D. G., Nguyen, N. P., Nguyen, T. H. L., Yang, S. H. (2022), Dietary supplementation with *Pediococcus pentosaceus* enhances the innate immune response in and promotes growth of *Litopenaeus vannamei* shrimp, *Journal of Fish disease*, 45(9), 1343–1354, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35675520/>.
 26. Trần Việt Tiên và Đặng Thị Hoàng Oanh (2020), Ảnh hưởng của β -glucan lên đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) cảm nhiễm *Vibrio parahaemolyticus*, *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 56(3B), 153–159, <https://ctujsvn.ctu.edu.vn/index.php/ctujsvn/article/view/3551>.
 27. Cheng, W., Wang, L. U., Chen, J. C. (2005), Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*, *Aquaculture*, 250(3–4), 592–601, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.060>.
 28. Nguyễn Thị Huế Linh, Nguyễn Thị Xuân Hồng, Trần Thị Thúy Hằng, Nguyễn Ngọc Phước (2021), Ảnh hưởng của chế phẩm synbiotic chứa vi khuẩn sinh axit lactic *Lactococcus lactis* và fructooligosaccharide lên một số chỉ tiêu miễn dịch của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*), *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Nông nghiệp*, 5(1), 2310–2319, <https://doi.org/10.46826/luaf-jasat.v5n1y2021.492>.
 29. Fridovich, I. (1995), Superoxide radical and superoxide dismutases, *Annual Review of Biochemistry*, 64, 97–112, <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>.
 30. Hồng Mộng Huyền, Trần Thị Tuyết Hoa, Huỳnh Trường Giang (2018), Đáp ứng miễn dịch và sức đề kháng với *Vibrio harveyi* của tôm sú (*Penaeus monodon*) ăn thức ăn có bổ sung chất chiết từ rong mơ (*Sargassum microcystum*), *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54 (Số chuyên đề: Thủy sản: 2), 158–167, <https://ctujsvn.ctu.edu.vn/index.php/ctujsvn/article/view/3180>.

31. Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V., Visetnan, S., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., Charoensapsri, W., Tang, S. (2018), Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization, *Developmental & Comparative Immunology*, 80, 81–93, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.009>.
32. Lightner, D. V. (1996), *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedure for diseases of culture penaeid shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, LA, <https://www.was.org/Shopping/handbook-of-shrimp-pathology-and-diagnostic-procedures-for-diseases-of-penaeid-shrimp>.