

DOI:10.22144/jvn.2017.610

ẢNH HƯỞNG CỦA LEVAMISOLE LÊN MỘT SỐ CHỈ TIÊU MIỄN DỊCH VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH Ở CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Bùi Thị Bích Hằng, Lê Văn Tèo, Trương Quỳnh Như và Nguyễn Thanh Phương

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 24/06/2016

Ngày chấp nhận: 24/02/2017

Title:

Effect of levamisole on parameters of immune response and bacterial resistance of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Từ khóa:

Cá tra, chất kích thích miễn dịch, levamisole, đáp ứng miễn dịch

Keywords:

Striped catfish, immunostimulant, levamisole, immune response

ABSTRACT

This study is aimed to evaluate the effect of levamisole-enrich diets on the innate immune response of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Different concentrations of levamisole (0, 50, 150, 300 and 450 mg/kg) were incorporated with fish feed for a period of 4 weeks. Experimental fish were challenged intra-peritoneally with *Edwardsiella ictaluri* in the 4th week after feeding levamisole. Hematological and immunological parameters were determined in week 2 and 4. The results of experiment revealed that total leukocyte count, monocytes and neutrophils increased in levamisole supplemented groups compared to the control group. The immunological parameters, lysozyme and complement activity statistically increased at doses of 300 mg/kg of the levamisole supplemented diet after 2 weeks ($p < 0.05$). However, the innate immune response of levamisole groups decreased slightly in the 4th week. The lowest mortality rate of post-challenge found in the group of 300mg/kg showed a statistically significant difference compared to the control group ($p < 0.05$). This study reported that the administration of levamisole dietary treatment of 300 mg/kg feed could enhance the innate immune response and resistance to *E. ictaluri* in striped catfish.

TÓM TẮT

Nghiên cứu thực hiện nhằm tìm hiểu ảnh hưởng của việc bổ sung levamisole vào thức ăn lên sự đáp ứng miễn dịch tự nhiên của cá tra. Levamisole được bổ sung vào thức ăn cho cá tra ở nhiều nồng độ khác nhau (0, 50, 150, 300 và 450 mg/kg thức ăn) trong thời gian 4 tuần. Cá thí nghiệm được cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm xoang bụng với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* ở tuần thứ 4 sau khi bổ sung levamisole. Các chỉ tiêu huyết học và miễn dịch được đánh giá ở tuần thứ 2 và thứ 4 của thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu ghi nhận: tổng bạch cầu, các loại bạch cầu bao gồm bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính ở nhóm bổ sung levamisole tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Các chỉ tiêu miễn dịch, hoạt tính lysozyme và bổ thể tăng cao có ý nghĩa thống kê ở nghiệm thức bổ sung 300 mg/kg thức ăn so với các nghiệm thức còn lại sau 2 tuần bổ sung ($p < 0,05$). Tuy nhiên, đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu của cá giảm nhẹ ở tuần thứ 4 sau khi bổ sung levamisole. Sau khi cảm nhiễm, tỉ lệ chết thấp nhất của cá được tìm thấy ở nghiệm thức bổ sung 300 mg/kg thức ăn, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Nghiên cứu cho thấy, bổ sung levamisole vào thức ăn cá tra với nồng độ 300 mg/kg thức ăn có thể làm gia tăng đáp ứng miễn dịch tự nhiên ở cá và bảo vệ cá tra kháng với vi khuẩn *E. ictaluri*.

Trích dẫn: Bùi Thị Bích Hằng, Lê Văn Tèo, Trương Quỳnh Như và Nguyễn Thanh Phương, 2017. Ảnh hưởng của levamisole lên một số chỉ tiêu miễn dịch và khả năng kháng bệnh ở cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 48b: 1-9.

1 GIỚI THIỆU

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là loài cá nuôi phổ biến và có thể mạnh xuất khẩu ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Trong những năm gần đây, mật độ nuôi tăng cao nhằm thâm canh hóa và gia tăng lợi nhuận theo mục tiêu của người nuôi. Thực tế cho thấy, nuôi thâm canh cá tra ảnh hưởng rất lớn tới môi trường nuôi theo diễn biến xấu, dẫn đến cá dễ bị nhiễm bệnh và khó kiểm soát (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2010). Các loại bệnh xuất hiện phổ biến trên cá tra như: bệnh gan thận mù, xuất huyết, ký sinh trùng... (Dung *et al.*, 2008). Để kiểm soát dịch bệnh, người nuôi thường sử dụng thuốc và hóa chất trong suốt quá trình nuôi cá. Theo Rico *et al.* (2013) 100% hộ nuôi cá tra ở ĐBSCL có sử dụng thuốc và hóa chất trong suốt quá trình nuôi. Việc sử dụng hóa chất và kháng sinh không đúng quy định gây tác động xấu đến môi trường, hệ sinh thái của thủy vực, hiện tượng kháng kháng sinh trong các loài vi khuẩn gây bệnh trên cá và tồn dư lượng trong sản phẩm thủy sản ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng (Sarter *et al.*, 2007; Dung *et al.*, 2009). Người nuôi sử dụng thuốc chủ yếu dựa vào kinh nghiệm và tự pha trộn. Mặt khác, người nuôi biết rõ về danh mục các loại thuốc cấm nhưng một số người vẫn còn sử dụng mà chưa hiểu rõ về các nguy cơ của việc sử dụng thuốc, hóa chất trong phòng trị bệnh cá (Nguyễn Chính, 2005). Do vậy, tìm ra giải pháp phòng bệnh hữu hiệu cho cá, hạn chế tình trạng dùng thuốc và hóa chất để kiểm soát dịch bệnh trên cá là một việc cần thiết và cấp bách. Một vài giải pháp đã được đề xuất và nghiên cứu, trong đó sử dụng chất kích thích miễn dịch để phòng bệnh cho cá là biện pháp đã và đang được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm. Levamisole là một trong những chất kích thích miễn dịch tiềm năng cho động vật trên cạn và cá (Renoux, 1980; Ayarun *et al.*, 2006; Shahidi *et al.*, 2011). Thí nghiệm bổ sung levamisole vào thức ăn cho cá làm gia tăng các chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu như số lượng tế bào bạch cầu, hoạt tính lysozyme, hoạt tính bổ thể, hoạt tính chống oxy hóa, ... (Peng *et al.*, 2006; Ispir *et al.*, 2007). Ngoài ra, levamisole cũng được sử dụng như một chất bổ trợ khi tiêm vắc-xin cho cá hồi (*Salmo salar* L.) (Morrison *et al.*, 2001). Bên cạnh đó, cá tra được tiêm levamisole (5 mg/kg cá) cũng cho thấy levamisole giúp kích thích gia tăng sự đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu của cá tra (Hang *et al.*, 2013b). Tuy nhiên, hiện tại chưa có một nghiên cứu hay báo cáo về việc xác định hàm lượng levamisole bổ sung thông qua thức ăn để nâng cao đáp ứng miễn dịch, tăng cường khả năng kháng bệnh của cá tra tại Việt Nam. Nghiên

cứu này được thực hiện nhằm tìm hiểu khả năng ảnh hưởng của levamisole lên hệ miễn dịch cá tra, đồng thời xác định liều lượng levamisole thích hợp trong phòng bệnh cho cá tra nuôi.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thí nghiệm bổ sung levamisole

Cá tra giống khỏe có kích cỡ 15-20 g/con, được chuyển về phòng thí nghiệm Khoa Thủy sản và thuần hóa 2 tuần để thích nghi với điều kiện thí nghiệm. Trước khi bố trí thí nghiệm, cá được kiểm tra lâm sàng ngẫu nhiên về hình dạng, kí sinh trùng, vi khuẩn (5 cá).

Thí nghiệm bổ sung levamisole (99%, 196142, Sigma) được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức (0, 50, 150, 300 và 450 mg levamisole/kg thức ăn), lặp lại 3 lần. Cá được bố trí với số lượng 40 con/bể 250 ml, có hệ thống sục khí, được cho ăn 2 lần/ngày với khẩu phần 5% trọng lượng thân trong 4 tuần. Thu mẫu máu vào tuần thứ 2 và thứ 4 sau khi cá được cho ăn thức ăn có bổ sung levamisole. Mỗi lần thu 9 cá/nghiệm thức. Mẫu máu được sử dụng phân tích các chỉ tiêu huyết học, hoạt tính lysozyme và bổ thể.

2.2 Thí nghiệm cảm nhiễm

Sau 4 tuần bổ sung levamisole, cá thí nghiệm được cảm nhiễm với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*. Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường Nutrient Broth, ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng là 610 nm. Sau đó pha loãng vi khuẩn đến mật độ 10^5 cfu/ml để tiến hành cảm nhiễm cho cá. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 10 nghiệm thức, trong đó, mỗi nghiệm thức của thí nghiệm bổ sung levamisole được chia thành 2 nghiệm thức nhỏ, một sử dụng làm đối chứng (tiêm 0,1 ml NaCl₂) và một sử dụng để cảm nhiễm vi khuẩn (tiêm 0,1 ml *E. ictaluri*). Thí nghiệm bố trí 45 cá/nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Mỗi cá được tiêm 0,1 ml vi khuẩn (10^5 cfu/ml) (Hang *et al.*, 2013a). Ghi nhận những biểu hiện, tỉ lệ chết của cá trong suốt 14 ngày sau khi cảm nhiễm. Dấu hiệu bệnh lý được ghi nhận, mẫu thận trước được trữ trong ethanol để tái định danh vi khuẩn. Sau 3 ngày gây cảm nhiễm thu 9 cá/nghiệm thức để phân tích các chỉ tiêu huyết học, hoạt tính lysozyme và bổ thể. Thí nghiệm được bố trí trong điều kiện có sục khí, không thay nước trong suốt quá trình thí nghiệm, cá được cho ăn thức ăn (0mg levamisole/kg thức ăn) theo nhu cầu.

Tỉ lệ chết (%) = (Tổng số cá chết / Tổng số cá thí nghiệm) x 100

2.3 Phân tích các chỉ tiêu miễn dịch

Định lượng hồng cầu (Natt và Herrick, 1952), mật độ hồng cầu được xác định bằng buồng đếm Neubauer và tính theo công thức:

$HC = C \times 10 \times 5 \times 200$ (tb/mm³) (C: Tổng số hồng cầu trong 5 vùng đếm)

Định lượng tổng bạch cầu và từng loại bạch cầu (Hrubec *et al.*, 2000). Trải mẫu máu bằng cách nhỏ một giọt máu lên lame, sau đó dùng lamelle chạm vào giọt máu và đẩy lamelle ngược về phía trước. Mẫu máu sau khi khô được cố định trong methanol 1 phút. Để mẫu khô tự nhiên và nhuộm Wright & Giemsa. Tổng số lượng bạch cầu được tính theo công thức:

TBC (tb/mm³) = (Số BC trong 1.500 tế bào x R)/Số HC trong 1.500 tế bào

(TBC: mật độ tổng bạch cầu, BC: bạch cầu, R: mật độ hồng cầu, HC: hồng cầu)

Định lượng từng loại bạch cầu trong tổng số 200 tế bào bạch cầu. Tính mật độ từng loại bạch cầu theo công thức:

Mật độ loại bạch cầu (tb/mm³) = (Số lượng mỗi loại bạch cầu x TBC)/200

Xác định hoạt tính lysozyme (Ellis *et al.*, 1990). Dụng đường chuẩn lysozyme với các nồng độ 0, 2, 4, 8 và 16 µg/mL. Cho 10 µL dung dịch từ các nồng độ pha loãng cho vào đĩa 96 giếng, tiếp theo cho 200 µL/giếng dịch huyền phù *Micrococcus luteus* (Sigma). Đối với mẫu huyết thanh của cá, cho 10 µL vào đĩa 96 giếng, thêm 200 µL/giếng vi khuẩn *Micrococcus luteus*. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 27°C và đo ở bước sóng 495 nm. Hoạt tính lysozyme được tính dựa vào đường chuẩn lysozyme.

Xác định hoạt tính bổ thể: Hoạt tính bổ thể được phân tích theo phương pháp của Sunyer và Tort (1995) dựa trên sự phân giải hồng cầu của bổ thể. Cho 10 µl hồng cầu cừu trộn đều với huyết thanh cá với nhiều nồng độ khác nhau (0,01; 0,005; 0,0025; 0,00125; 0,00062, 0), ủ 100 phút ở nhiệt độ 28°C. Tiếp tục ly tâm 2000 xg trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Đọc mẫu ở bước sóng 405 nm.

2.4 Quy trình PCR phát hiện vi khuẩn

Vi khuẩn *E. ictaluri* được phát hiện theo phương pháp PCR được mô tả bởi Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc phương (2010).

2.5 Xử lý số liệu

Các số liệu được nhập dữ liệu và xử lý bằng phần mềm Excel. Chương trình SPSS 13.0 được sử

dụng phân tích ANOVA 1 nhân tố ở mức ý nghĩa $p < 0,05$.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả chỉ tiêu huyết học

Tổng hồng cầu: Sau 2 tuần bổ sung levamisole, mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức dao động từ 1,67 – 1,95 x 10⁶ tb/mm³, có sự gia tăng mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức bổ sung levamisole so với nghiệm thức đối chứng, trong đó tăng cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 300 và 450 mg/kg, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Ở thời điểm 4 tuần sau khi bổ sung levamisole, mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức bổ sung levamisole (1,72 – 1,90 x 10⁶ tb/mm³) cao hơn nghiệm thức đối chứng (1,65 x 10⁶ tb/mm³). Riêng nghiệm thức 5 (450 mg/kg), mật độ hồng cầu (1,67 x 10⁶ tb/mm³) giảm so với tuần thứ 2 (1,95 x 10⁶ tb/mm³) nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Sau 3 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*, mật độ hồng cầu của cá tăng nhẹ so với cá trước khi cảm nhiễm, trong đó cá ở nghiệm thức có bổ sung levamisole tăng cao hơn cá ở nghiệm thức đối chứng, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

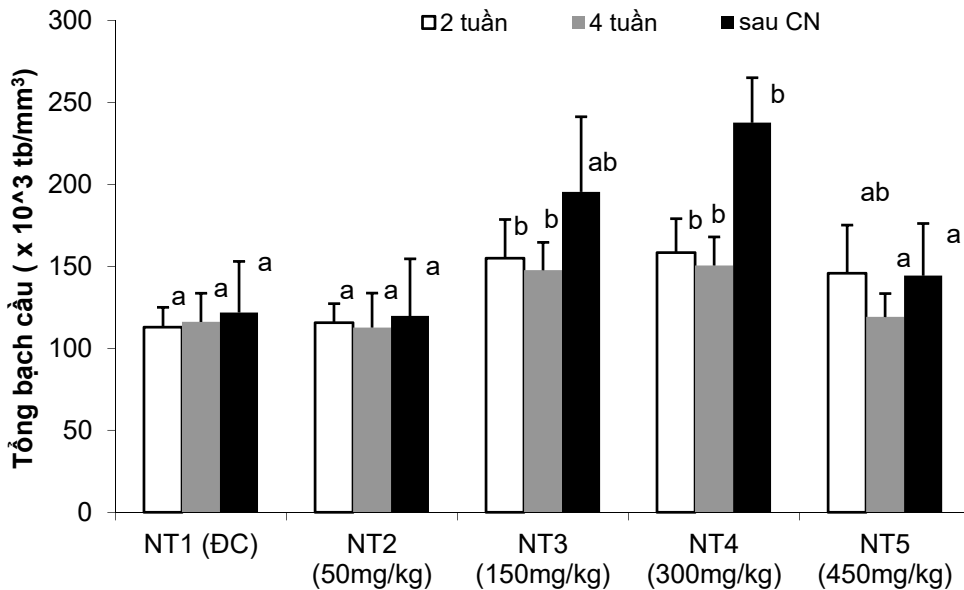
Kết quả mật độ hồng cầu của cá trong thí nghiệm cũng phù hợp theo kết quả của các nghiên cứu trước đây. Nguyễn Thị Thúy Liễu (2008) cho biết mật độ hồng cầu trên cá khô dao động từ 1,69 – 2,05 x 10⁶ tb/mm³. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của lipopolysaccharide lên đáp ứng miễn dịch cá tra cũng cho thấy mật độ hồng cầu cá có sự gia tăng so với đối chứng nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê (Hang *et al.*, 2013a). Tương tự, ở thí nghiệm bổ sung levamisole với nhiều mức khác nhau (0, 125, 250 và 500 mg/kg) vào thức ăn cho cá chép ăn trong 70 ngày. Kết quả cho thấy mật độ hồng cầu tăng cao ở các nghiệm thức cá chép được bổ sung levamisole, trong đó nghiệm thức (250mg/kg) tăng cao nhất và có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (Sajid *et al.*, 2009).

Tổng bạch cầu:

Sau khi bổ sung levamisole, ở tuần thứ 2 tổng mật độ bạch cầu ở các nghiệm thức bổ sung đều tăng cao, các nghiệm thức bổ sung 150, 300 và 450 mg/kg cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Trong đó, nghiệm thức NT4 (300 mg/kg) cho kết quả tổng bạch cầu tăng cao nhất (158,4 x 10³ tb/mm³) và khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng (112,9 x 10³ tb/mm³) ($p < 0,05$). Ở tuần thứ 4, nồng độ bạch cầu ở các nghiệm thức bổ sung levamisole (119,2 – 150,6 x 10³ tb/mm³) vẫn cao hơn nghiệm thức đối

chúng (116×10^3 tb/mm³), trong đó NT 150mg/kg ($147,7 \times 10^3$ tb/mm³) và NT 300 mg/kg ($150,6 \times 10^3$ tb/mm³) cho kết quả cao nhất và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Tuy nhiên, nồng độ bạch cầu ở thời điểm này giảm nhẹ so với thời điểm 2 tuần bổ sung levamisole, ngoại trừ nghiệm thức đối chứng và NT 2 (50 mg/kg). Nghiệm thức 5 (450 mg/kg) cho kết quả tổng bạch cầu ở tuần 4 giảm nhiều nhất so với tuần thứ 2 ($145,9 \times 10^3$ tb/mm³). Tương tự, tổng bạch cầu sau khi cảm nhiễm ở nghiệm thức bổ sung levamisole tăng hơn so với đối chứng, NT4 (300 mg/kg) tăng cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng, nghiệm thức 1 và 5 (Hình 1). Nghiên cứu ảnh hưởng của levamisole lên cá chép Ấn Độ (*Labeo rohita*) đã được báo cáo bởi Wijendra và Pathiratne (2007). Kết quả cho thấy

tổng bạch cầu của nhóm cá được bổ sung levamisole (5g/kg cá) tăng cao gấp hai lần và có ý nghĩa thống kê với nhóm cá đối chứng. Một nghiên cứu khác đã chỉ ra, bổ sung levamisole cho cá chép trong thời gian dài (70 ngày) làm giảm mật độ tổng bạch cầu có ý nghĩa thống kê so với cá đối chứng (Sajid *et al.*, 2009). Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu ảnh hưởng levamisole lên bạch cầu cá tra ở trên, tổng bạch cầu tăng sau 2 tuần bổ sung levamisole và giảm sau 4 tuần bổ sung. Ngoài ra, Sajid *et al.* (2009) cho biết nghiên cứu bổ sung levamisole trên cá chép ở các hàm lượng 125, 250 và 500 mg/kg thức ăn, sau đó cảm nhiễm với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* ở ngày 30 và 58 thì cho thấy tổng hồng cầu, tổng bạch cầu khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ở nhóm bổ sung 250 mg levamisole/kg thức ăn.



Hình 1: Tổng bạch cầu cá tra sau 2, 4 tuần khi bổ sung levamisole và sau cảm nhiễm với *E. ictaluri*

Các loại bạch cầu

Sau 2 tuần bổ sung levamisole, bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính tăng cao ở các nghiệm thức được bổ sung levamisole (Bảng 1). Trong đó, NT3 (150 mg/kg) và NT4 (300 mg/kg) tăng cao nhất và khác biệt thống kê với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Nghiệm thức 5 (450 mg/kg) có mật độ bạch cầu đơn nhân thấp nhất ($18,4 \times 10^3$ tb/mm³) trong các nghiệm thức được bổ sung levamisole và không khác biệt với nghiệm thức đối chứng. Tương tự, mật độ tế bào lympho và tiểu cầu cũng gia tăng ở các nghiệm thức được bổ sung levamisole, tuy nhiên không khác biệt thống kê so với nghiệm thức đối chứng. Sau 4 tuần bổ sung levamisole, mật độ bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, tế bào

lympho và tiểu cầu vẫn tăng cao ở các nghiệm thức có bổ sung levamisole. Tuy nhiên, chỉ có NT 4 (300 mg/kg) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với đối chứng ở chỉ tiêu bạch cầu đơn nhân; NT 3 (150 mg/kg) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở chỉ tiêu bạch cầu trung tính; tế bào lympho và tiểu cầu khác biệt không có ý nghĩa ở tất cả các nghiệm thức ($p > 0,05$). Sau cảm nhiễm với vi khuẩn *E.ictaluri*, mật độ của 4 loại bạch cầu của tất cả các nghiệm thức tăng cao so với trước khi cảm nhiễm. Các loại bạch cầu đều gia tăng ở các nghiệm thức có bổ sung levamisole, trong đó NT 4 (300 mg/kg) tăng cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng.

Bảng 1: Mật độ bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, lympho và tiểu cầu của cá tra ở tuần 2 và tuần 4 sau khi ăn thức ăn bổ sung levamisole ($\times 10^3$ tb/mm³)

Nghiệm thức	BC đơn nhân	BC trung tính	Lympho	Tiểu cầu
Sau 2 tuần bổ sung/ levamisole				
NT 1 (ĐC)	15,9 ± 4,9 ^a	60,6 ± 11,6 ^a	29,8 ± 6,6 ^a	6,4 ± 7,0 ^a
NT 2 (50mg/kg)	22,8 ± 5,3 ^{ab}	62,1 ± 8,5 ^a	25,1 ± 8,7 ^a	5,7 ± 4,7 ^a
NT 3 (150mg/kg)	28,0 ± 4,8 ^b	81,9 ± 13,1 ^b	34,5 ± 12,2 ^a	10,6 ± 8,3 ^a
NT 4 (300mg/kg)	28,1 ± 5,9 ^b	84,4 ± 7,0 ^b	35,3 ± 11,8 ^a	10,5 ± 11,9 ^a
NT 5 (450mg/kg)	18,4 ± 2,5 ^a	77,6 ± 15,3 ^{ab}	32,9 ± 8,6 ^a	12,0 ± 6,5 ^a
Sau 4 tuần bổ sung levamisole				
NT 1 (ĐC)	15,7 ± 7,5 ^a	62,0 ± 11,8 ^a	30,2 ± 8,1 ^a	7,99 ± 4,6 ^a
NT 2 (50mg/kg)	18,6 ± 2,8 ^a	63,3 ± 19,9 ^a	27,4 ± 9,3 ^a	5,9 ± 4,0 ^a
NT 3 (150mg/kg)	23,2 ± 11,4 ^{ab}	86,9 ± 8,9 ^b	32,9 ± 10,1 ^a	10,8 ± 6,9 ^a
NT 4 (300mg/kg)	27,7 ± 3,9 ^b	70,0 ± 22,6 ^{ab}	31,7 ± 6,1 ^a	10,1 ± 8,1 ^a
NT 5 (450mg/kg)	14,5 ± 5,5 ^a	62,3 ± 21,3 ^a	29,0 ± 4,2 ^a	13,3 ± 13,1 ^a
Sau cảm nhiễm với <i>E.ictaluri</i>				
NT 1 (ĐC)	14,2 ± 4,4 ^a	70 ± 45,1 ^a	25,0 ± 10,1 ^a	8,4 ± 5,5 ^a
NT 2 (50mg/kg)	19,5 ± 12,0 ^{ab}	68,7 ± 20,5 ^a	24,5 ± 5,8 ^a	7,1 ± 5,3 ^a
NT 3 (150mg/kg)	28,5 ± 7,6 ^b	106,3 ± 56,4 ^{ab}	45,8 ± 15,6 ^b	14,7 ± 7,0 ^{ab}
NT 4 (300mg/kg)	28,0 ± 6,1 ^b	130,7 ± 55,5 ^b	53,3 ± 13,5 ^b	25,5 ± 23,0 ^b
NT 5 (450mg/kg)	23,9 ± 10,2 ^{ab}	61,7 ± 26,5 ^a	25,6 ± 9,9 ^a	13,0 ± 6,1 ^{ab}

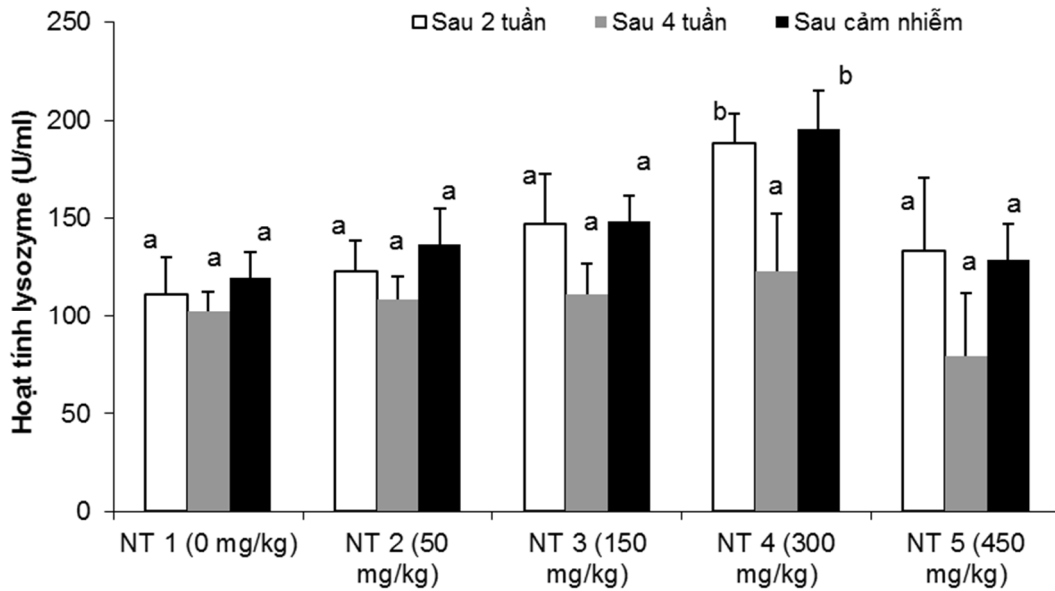
Kết quả trên bảng thể hiện giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một cột mang mẫu tự (a,b,c) giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

Kết quả trên cũng phù hợp với nghiên cứu của Perera và Pathiratne (2008) khi bổ sung levamisole cho cá chép Ấn Độ ở 2 mức 1,25 và 2,5 mg/l trong khoảng thời gian 14, 21, 28, 42 và 56 ngày, cho kết quả bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính tăng có ý nghĩa thống kê và tăng cao nhất sau khi cho ăn 42 ngày. Mật độ tế bào lympho ở các nghiệm thức cho ăn levamisole tăng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ở hàm lượng 1,25 mg/l sau 42 và 56 ngày cho ăn. Shahidi *et al.* (2011) bổ sung levamisole cho cá trắm cỏ (*Ctenopharyngodon idella*) ở các hàm lượng 3, 5 và 10 mg/l trong 18 và 35 ngày. Kết quả cho thấy bạch cầu trung tính của cá tăng có ý nghĩa ở nghiệm thức bổ sung 5 và 10 mg/l trong 18 ngày, bạch cầu đơn nhân tăng có ý nghĩa ở nghiệm thức bổ sung 3 mg/l trong cả 2 thời điểm 18 và 35 ngày, tế bào lympho tăng khi bổ sung 3 mg/l sau 35 ngày nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2 Hoạt tính lysozyme

Sau 2 tuần cho ăn levamisole, kết quả phân tích cho thấy hoạt tính lysozyme trong huyết thanh cá

có bổ sung levamisole tăng cao hơn so với đối chứng. Trong đó, hoạt tính lysozyme ở NT 300 mg/kg (188,3 U/ml) tăng cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức còn lại (111,2 – 147 U/ml). Sau 4 tuần bổ sung levamisole, hoạt tính lysozyme ở các nghiệm thức có bổ sung levamisole đều cao hơn nghiệm thức đối chứng, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Mặt khác, hoạt tính lysozyme ở tuần thứ 4 của tất cả các nghiệm thức đều giảm thấp so với lần thu mẫu ở tuần thứ 2 sau khi bổ sung levamisole (Hình 2). Sau cảm nhiễm với vi khuẩn *E.ictaluri*, hoạt tính lysozyme tăng cao ở tất cả các nghiệm thức so với trước khi cảm nhiễm. Các nghiệm thức bổ sung levamisole đều có hoạt tính lysozyme (136,9 - 195,7 U/ml) tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (119,6 U/ml), trừ nghiệm thức 5 (450 mg/kg) là 128,9 U/ml. Tuy nhiên, chỉ có NT 4 (300 mg/kg) có hoạt tính lysozyme (195,7 U/ml) tăng cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$).



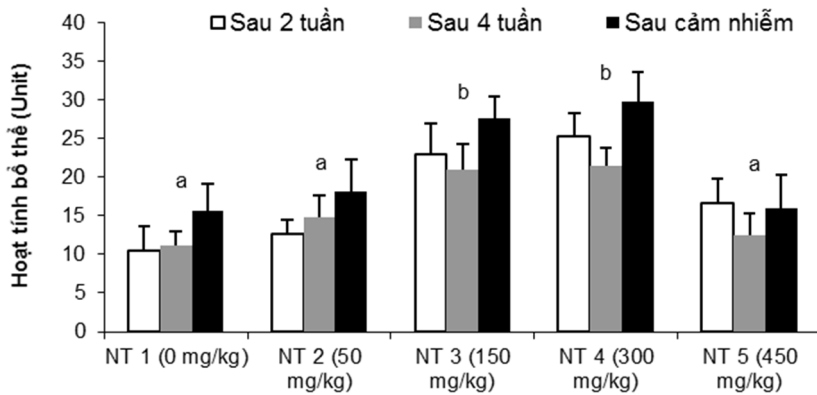
Hình 2: Hoạt tính lysozyme của cá sau 2, 4 tuần khi bổ sung levamisole và sau cảm nhiễm với *E. ictaluri*

Tương tự, nghiên cứu của Ayarun và Venkatesan (2006) đã báo cáo hoạt tính lysozyme của cá chép ăn thức ăn có chứa 250 mg levamisole/kg thức ăn tăng cao so với nhóm đối chứng. Sajid *et al.* (2009) nghiên cứu bổ sung levamisole trên cá chép ở các hàm lượng 0, 125, 250 và 500 mg/kg thức ăn và tiến hành thu mẫu ở ngày 0, 57 và 70 sau khi bổ sung levamisole. Kết quả cho thấy hoạt tính lysozyme tăng cao nhất ở mức bổ sung 250 mg levamisole/kg thức ăn sau 57 ngày và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức còn lại. Tuy nhiên, hoạt tính lysozyme giảm xuống ở lần thu mẫu 70 ngày sau khi bổ sung levamisole. Điều này cho thấy, bổ sung levamisole trong thời gian dài có thể làm giảm hoạt tính lysozyme. Một thí nghiệm khác đã báo cáo, bổ sung beta glucan, bovin lactoferine, chitosan, vitamin C và levamisole cho cá tra trong 2 tuần. Kết quả cho thấy hoạt tính lysozyme của cá ở nghiệm thức bổ sung levamisole tăng cao nhất, có ý nghĩa thống kê so với hoạt tính lysozyme của cá ở các nghiệm thức còn lại (Hang *et al.*, 2013b). Tuy nhiên, một nghiên cứu khác của Perera và Pathiratne (2008), bổ sung levamisole bằng phương pháp ngâm trên cá chép Ấn Độ ở 2 hàm lượng 1,25 và 2,5 mg/l trong các khoảng thời gian

khác nhau 14, 21, 28, 42 và 56 ngày thì hoạt tính lysozyme tăng khác biệt sau 28 ngày bổ sung levamisole nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.3 Hoạt tính bổ thể

Hoạt tính bổ thể của cá ở các nghiệm thức bổ sung levamisole đều tăng cao so với nghiệm thức đối chứng ở 2 đợt thu mẫu: 2 và 4 tuần bổ sung levamisole (Hình 3). Trong đó, nghiệm thức NT3 (150 mg/kg) và NT4 (300 mg/kg) tăng cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại trong cùng một đợt thu mẫu ($p < 0,05$). Sau 4 tuần bổ sung levamisole, hoạt tính bổ thể ở các nghiệm thức đều giảm so với hoạt tính bổ thể ở lần thu mẫu tuần thứ 2, ngoại trừ nghiệm thức NT2 (50 mg/kg), tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Sau cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, hoạt tính bổ thể tăng cao ở tất cả các nghiệm thức so với trước khi cảm nhiễm. Ngoài ra, hoạt tính bổ thể của các nghiệm thức có bổ sung levamisole cũng gia tăng hơn so với nghiệm thức đối chứng, tuy nhiên chỉ có NT3 (150 mg/kg) và NT4 (300 mg/kg) tăng cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$).

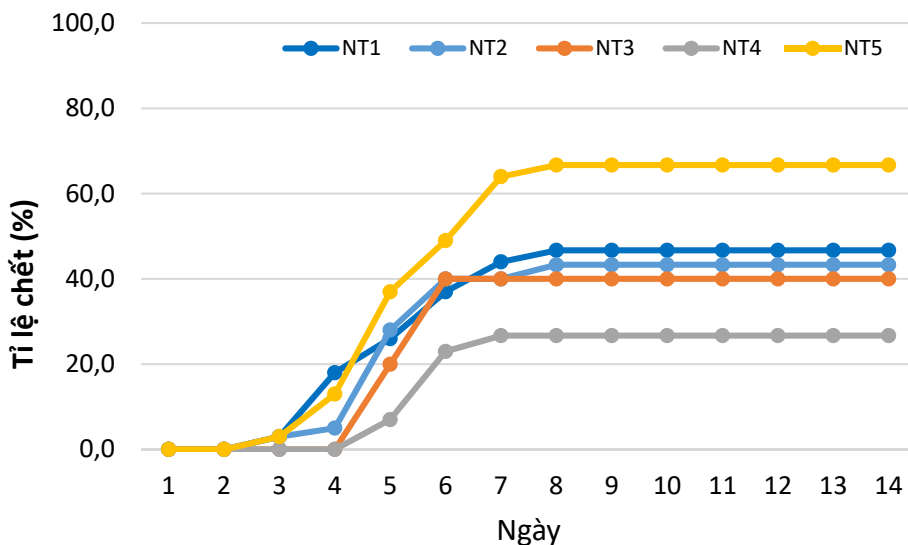


Hình 3: Hoạt tính bổ thể của cá sau 2, 4 tuần khi bổ sung levamisole và sau cảm nhiễm với *E. ictaluri*

Kết quả hoạt tính bổ thể của thí nghiệm cũng tương đồng với báo cáo của Kumari và Sahoo (2006), khi thực hiện thí nghiệm bổ sung levamisole với nhiều nồng độ khác nhau (0, 50, 150 and 450 mg/kg thức ăn) vào thức ăn của cá trê trắng (*Clarias batrachus*) trong 10 ngày. Kết quả cho thấy hàm lượng chất chống oxy hóa, hàm lượng bổ thể trong máu tăng cao có ý nghĩa thống kê ở nghiệm thức bổ sung levamisole 50 và 150 mg/kg. Tuy nhiên, nồng độ oxy nguyên tử và hoạt tính bổ thể giảm ở nghiệm thức bổ sung levamisole liều cao hơn. Tương tự, sau 2 tuần tiêm levamisole (5 mg/kg cá) vào cá tra cho thấy hoạt tính bổ thể tăng cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm cá đối chứng (Hang *et al.*, 2013b).

3.4 Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*

Sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, kết quả theo dõi cá trong 2 tuần ghi nhận cá ở nghiệm thức tiêm nước muối sinh lý (nghiệm thức đối chứng) khỏe mạnh và linh hoạt, không xuất hiện cá chết. Trong khi tất cả các nghiệm thức cảm nhiễm với vi khuẩn đều xuất hiện cá chết sau 3 ngày cảm nhiễm. Tỷ lệ chết ở các ngày sau khi cảm nhiễm cũng như thời gian cá ngưng chết có sự biến động giữa các nghiệm thức. Cá chết nhiều nhất ở nghiệm thức bổ sung 0 và 450 mg/kg thức ăn và ở ngày thứ 5 sau cảm nhiễm. Đến ngày thứ 7, 8 số lượng cá giảm chết và tất cả các nghiệm thức ngưng chết ở ngày thứ 9 sau cảm nhiễm.



Hình 4: Tỷ lệ chết tích lũy của cá tra ở các nghiệm thức bổ sung levamisole sau khi cảm nhiễm với *E. ictaluri*

Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm cho thấy tỷ lệ chết của cá ở các nghiệm thức bổ sung levamisole

cho tỷ lệ chết thấp hơn cá ở nghiệm thức đối chứng, ngoại trừ nghiệm thức NT5 (450 mg/kg) (Hình 4).

Nghiệm thức NT4 (300 mg/kg) có tỉ lệ chết thấp nhất (27%) so với các nghiệm thức còn lại, và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng NT1 (46,7%). Kết quả trên cũng tương tự như mô tả của Sajid *et al.* (2009), nghiên cứu bổ sung levamisole cho cá chép và cảm nhiễm với vi khuẩn *A. hydrophila*, kết quả cho thấy cá ở nghiệm thức bổ sung 250 mg levamisole/kg thức ăn có tỉ lệ chết thấp nhất.

Tài định danh vi khuẩn sau cảm nhiễm: Sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, cá có dấu hiệu kém ăn, bơi lơ đờ, xuất huyết ở các gốc vi. Giải phẫu cá có biểu hiện bệnh cho thấy có dịch trong xoang bụng, nhiều đốm nhỏ màu trắng xuất hiện ở gan, thận và tỳ tạng (Hình 5). Dấu hiệu bệnh lý này giống với sự mô tả của Đặng Thụy Mai Thy (2010) khi cá tra nhiễm *E. ictaluri*.

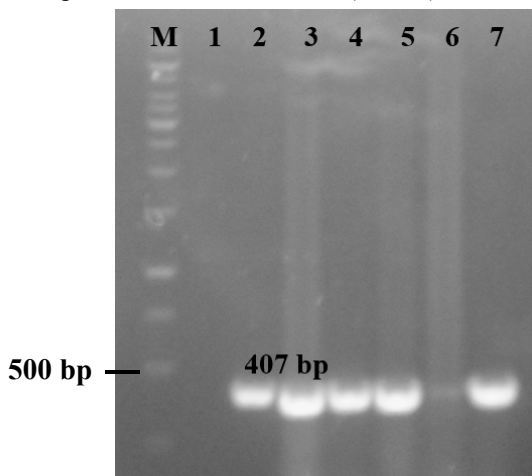


Hình 5: Cá tra với các dấu hiệu bệnh sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri*

Mũi tên chỉ đốm trắng trên gan, thận trước và tỳ tạng

Ngoài ra, thận trước của cá tra có dấu hiệu bệnh lý được dùng để thực hiện phản ứng PCR. Kết quả PCR của mẫu cá ở các nghiệm thức cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* đều thể hiện vạch đặc hiệu 407 bp của vi khuẩn *E. ictaluri* (Hình 6).

bổ sung levamisole trong thời gian dài (4 tuần) cho thấy các chỉ tiêu miễn dịch giảm so với cá bổ sung levamisole trong 2 tuần. Hàm lượng levamisole bổ sung ở mức 300 mg/kg thức ăn có khả năng kích thích hệ miễn dịch của cá tra và làm giảm tỉ lệ chết của cá khi cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*.



Hình 6: Kết quả điện di sản phẩm PCR tái định danh vi khuẩn *E. ictaluri*

Giếng M: thang đo DNA; Giếng 1: đối chứng âm; Giếng 2: đối chứng dương; Giếng 3: NT1; Giếng 4: NT2; Giếng 5: NT3; Giếng 6: NT4; Giếng 7: NT5

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Cá tra được bổ sung thức ăn có chứa levamisole sau 2, 4 tuần cho thấy có sự kích thích đáp ứng miễn dịch thông qua việc gia tăng chỉ tiêu huyết học, hoạt tính lysozyme và bổ thể. Tuy nhiên, bổ

4.2 Đề xuất

Tiếp tục nghiên cứu sự ảnh hưởng của thời gian bổ sung levamisole lên hệ miễn dịch của cá tra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ayarun, G. and A. Venkatesan, 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture* 255: 179-187.
- Dung, T.T., N.T.N. Ngoc, N.Q.Thinh, D.T.M.Thy, N.A.Tuan, A. Shinn, M Crumlish, 2008. Common disease of *Pangasius catfish* farmed in Vietnam. *Global Aquaculture Advocate* 7: 77-78.
- Dung, T.T., F. Haesebrouck, P. Sorgeloos, N.A. Tuan, M. Baelem, A. Smet, A. Descostere, 2009. Inck plasmid-mediated tetracycline resistance in *Edwardsiella ictaluri* isolates from diseased freshwater catfish in Vietnam. *Aquaculture* 295:157-159.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2010. Phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh mù gan trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng phương pháp PCR. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ* 13:151-159.
- Đặng Thụy Mai Thy, 2010. Nghiên cứu đặc tính gây bệnh của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* ở cá tra

- (*Pangasianodon hypophthalmus*). Luận văn cao học. Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ, 83 trang.
- Ellis, A.E., 1990. Lysozyme activity. In: T.C. Stolen, P.D. Fletcher, B.S. Anderson, B.S. Roberson, W.B. Muiswinkel (editors). *Technique in Fish Immunology*. New York: SOS Publications; p 101-103.
- Hang, B.T.B., S. Milla, V. Gillardin, N.T. Phuong, P. Kestemont, 2013a. *In vivo* effects of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on regulation of immune response and protein expression in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish and Shellfish Immunology* 34 (1): 339-347.
- Hang, B.T.B., N.T. Phuong, P. Kestemont, 2013b. Efficiency of different immunostimulants on immune response of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish and Shellfish Immunology* 34 (6): 1654-1655.
- Hrubec, T.C., J. L. Cardinale, S. A. Smith, 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Veterinary Clinical Pathology* 29:7-12.
- Ispir, U., M. E. Yonar, 2007. Effects of levamisole on phagocytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). *Acta Veterinaria Brunensis* 76: 493-497.
- Kumari J., P.K. Sahoo, 2006. None specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several immunostimulants. *Aquaculture* 255:133-141.
- Morrison, R.N., B.F. Nowak, J. Carson, 2001. The histopathological effects of a levamisole adjuvanted *Vibrio anguillarum* vaccine on Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture* 195: 23–33.
- Natt, M. P. and C.A. Herrick, 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poultry Science* 31:735-738.
- Nguyễn Chính, 2005. Đánh giá tình hình sử dụng thuốc, hóa chất trong nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) thâm canh ở An Giang và Cần Thơ. Luận văn cao học. Khoa Thủy sản. Trường Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Thị Thúy Liễu, Bùi Thị Bích Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011. Tìm hiểu sự biến động của các yếu tố miễn dịch không đặc hiệu trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*. Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ 17a: 20-29.
- Peng, L., W. Xiaoxue, M.G. Delbert, 2006. Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Aquaculture* 251: 201–209.
- Perera, H.A.C.C. and A. Pathiratne, 2008. Enhancement of immune responses in Indian carp, *Catla catla*, following administration of levamisole by immersion. pp. 129-142. In: M.G. Bondad-Reantaso, C.V. Mohan, M. Crumlish and R.P. Subasinghe (editors). *Diseases in Asian Aquaculture VI*. Fish Health Section. Asian Fisheries Society. Manila. Philippines.
- Renoux G., 1980. The general immunopharmacology of levamisole. *Drugs* 19:89–99.
- Rico, A., T.M. Phu, K. Satapornvanit, J. Min, A.M. Shahabuddin, P.J.G. Henriksson, 2013. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture* 412:231–243.
- Sajid, M., M.H. Samoon, P. Singh, 2009. Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 9:111-120
- Sarter, S., N.H.N. Kha, L.T. Hung, J. Lazard, M. Didier, 2007. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control* 18:1391-1396.
- Shahidi, A., H. Vahabzade, A. Zamini, A. Sadeghpour, 2011. The Effect of Levamisole on the Immune Response Fingerling Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). International Conference on Medical, Biological and Pharmaceutical Sciences (ICMBPS'2011) Pattaya.
- Sunyer, J.O., L. Tort, 1995. Natural haemolytic and bactericidal activities of sea bream, *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 45:333-345.
- Wijendra, G.D.N.P., A. Pathiratne, 2007. Evaluation of immune responses in Indian carp, *Labeo rohita* (Hamilton) fed with levamisole incorporated diet. *Journal of Science – University of Kelaniya* 3:17- 28.