



SỬ DỤNG THỨC ĂN BỔ SUNG DIỆP HẠ CHÂU (*Phyllanthus urinaria*) PHÒNG BỆNH GAN THẬN MŨ TRÊN CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Bùi Thị Bích Hằng* và Trần Thị Tuyết Hoa

Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm bài viết: Bùi Thị Bích Hằng (email: btbhang@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/10/2019

Ngày nhận bài sửa: 18/02/2020

Ngày duyệt đăng: 23/04/2020

Title:

Use of dietary chamber bitter (*Phyllanthus urinaria*) extract for prevention of Bacillary Necrosis in *Pangasius* (BNP) in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Từ khóa:

Cá tra, bệnh gan thận mũ, diệp hạ châu, đáp ứng miễn dịch

Keywords:

Bacillary Necrosis in *Pangasius*, immune response, *Phyllanthus urinaria*, striped catfish

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of dietary chamber bitter (*Phyllanthus urinaria*) extract on the resistance to Bacillary Necrosis in *Pangasius* (BNP) in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). The experiment was in the completely randomized design with 3 triplicated treatments including 0% (control); 1% and 2% of *P. urinaria* extract. After 4 weeks of experimentation, fish were injected with *Edwardsiella ictaluri*. Samples were collected in the week 2nd and 4th of experiment and day 3rd of challenge test for immune parameter test. Fish mortalities among treatments were also recorded. The results showed that erythrocytes, leukocytes, monocytes, lymphocytes and lysozyme activity were significantly increased in supplemented *P. urinaria* treatments if compared those of the control ($p < 0.05$). After challenging with *E. ictaluri*, the accumulative mortality of fish in *P. urinaria* treatments was lower than that of the control treatments. Fish fed 2% of *P. urinaria* extract had the lowest mortality. These results indicated that supplementation of 2% *P. urinaria* extract significantly improved the resistance to the BNP infection in striped catfish.

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm đánh giá ảnh hưởng của chất chiết diệp hạ châu lên khả năng phòng bệnh gan thận mũ của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 nghiệm thức gồm 0 (đối chứng), 1 và 2% chất chiết diệp hạ châu. Sau 4 tuần thí nghiệm, cá được tiêm với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*. Thu mẫu máu cá vào tuần thứ 2, 4 của thí nghiệm. và ngày thứ 3 sau cảm nhiễm để phân tích các chỉ tiêu miễn dịch. Tỷ lệ chết của cá sau cảm nhiễm cũng được ghi nhận. Kết quả cho thấy, mật độ hồng cầu, tổng bạch cầu, tế bào đơn nhân, lympho và hoạt tính lysozyme của cá ở các nghiệm thức bổ sung diệp hạ châu đều tăng cao hơn đối chứng ($P < 0,05$). Sau cảm nhiễm với *E. ictaluri*, tỉ lệ chết của cá được bổ sung diệp hạ châu thấp hơn cá đối chứng, cá ở nghiệm thức 2% diệp hạ châu có tỉ lệ chết thấp nhất. Kết quả thí nghiệm cho thấy bổ sung 2% chất chiết diệp hạ châu cải thiện khả năng phòng bệnh gan thận mũ cho cá tra.

Trích dẫn: Bùi Thị Bích Hằng và Trần Thị Tuyết Hoa, 2020. Sử dụng thức ăn bổ sung diệp hạ châu (*Phyllanthus urinaria*) phòng bệnh gan thận mũ trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(Số chuyên đề: Thủy sản)(1): 149-160.

1 GIỚI THIỆU

Đồng bằng sông Cửu Long là một trong những khu vực phát triển mạnh về nuôi trồng thủy sản, trong đó cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là loài được nuôi phổ biến nhất. Bên cạnh việc tăng nhanh về diện tích nuôi, mật độ nuôi ngày càng cao cũng là một trong những nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường nước và bùng phát dịch bệnh trên cá nuôi. Các bệnh thường gặp và gây ảnh hưởng lớn đối với nghề nuôi cá tra thâm canh ở Việt Nam như gan thận mủ, bệnh xuất huyết phù đầu, trắng gan trắng mang, trắng đuôi (Từ Thanh Dung và *ctv*, 2010). Để hạn chế dịch bệnh, nhiều loại thuốc và hóa chất đã được sử dụng tại nhiều vùng nuôi. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh và hóa chất nhằm kiểm soát dịch bệnh thường xuyên cũng mang đến nhiều mối nguy như khả năng tồn lưu dư lượng thuốc trong cơ thịt cá, tạo ra các dòng vi khuẩn kháng thuốc, ức chế đáp ứng miễn dịch của cá, ô nhiễm môi trường (Sarter *et al.*, 2007). Gần đây, vaccine đã được nghiên cứu và ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản nhưng sử dụng vaccine cũng gặp nhiều trở ngại như chi phí cao, mỗi loại vaccine chỉ đặc hiệu với 1 loại bệnh và đặc biệt là khó ứng dụng rộng rãi trong ao nuôi thâm canh với mật độ cá dày. Một trong những biện pháp kiểm soát bệnh hứa hẹn trong nuôi trồng thủy sản là tăng cường khả năng phòng vệ của cá thông qua việc bổ sung chất điều biến miễn dịch (Christyapita *et al.*, 2007). Nhiều hợp chất có nguồn gốc từ tự nhiên đã được quan tâm. Chiết xuất từ thảo dược được ghi nhận có vai trò quan trọng trong việc kiểm soát dịch bệnh vì chứa những chất có hoạt tính chống oxy hóa, chống vi khuẩn, chống stress, đồng thời kích thích sự tăng trưởng, thèm ăn, tăng cường hệ miễn dịch và kích thích sinh sản (Chitmanat *et al.*, 2005; Chakraborty *et al.*, 2011). Bổ sung chất chiết gừng vào thức ăn làm tăng cường hệ miễn dịch cũng đã được báo cáo trên cá hồi (Nya *et al.*, 2009) và cá chêm châu Á (Talpur *et al.*, 2013). Chất chiết từ hạt giồng của cây hoa nhài cũng có tác dụng điều biến miễn dịch trên cá rô phi, làm tăng khả năng bảo vệ và kháng lại sự lây nhiễm của vi khuẩn *A. hydrophila* khi bổ sung qua thức ăn (Kirubakaran *et al.*, 2010) hoặc tiêm (Kirubakaran *et al.*, 2016). Tương tự, chất chiết xuất từ cò gà cũng làm gia tăng khả năng kháng vi khuẩn *A. hydrophila* và *V. vulnificus* trên cá chép Ấn Độ (Balasubramanian *et al.*, 2011) và cá rô phi (Immanuel *et al.*, 2009). Các loại thảo dược thường dễ tìm và được sử dụng dưới nhiều dạng như thô, chất chiết hoặc các hợp chất hoạt tính từ thực vật với giá thành rẻ cũng là yếu tố khách quan cho việc sử dụng thảo dược để bảo vệ sức khỏe động vật thủy

sản (Awad and Awaad, 2017). Diệp hạ châu được mọc tự nhiên và phân bố nhiều nơi ở Việt Nam. Đây là loài dược liệu quý được sử dụng nhiều trong y học cổ truyền, điều trị các bệnh về gan, đái tháo đường và sỏi thận trên người (Huỳnh Bảo Tuấn và *ctv*, 2013). Căn cứ trên những thông tin tham khảo, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của chất chiết diệp hạ châu lên khả năng kháng khuẩn *E. ictaluri* phòng bệnh gan thận mủ của cá tra, làm cơ sở đề xuất phương pháp phòng bệnh hiệu quả cho cá tra nuôi thương phẩm.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguồn vật liệu

Nguồn cá: cá tra (15-20 g) được chuyển về trại thực nghiệm của Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ và thuần dưỡng trong 2 tuần. Trước khi bố trí thí nghiệm, 5 cá được kiểm tra lâm sàng ngẫu nhiên về hình dạng, ký sinh trùng và vi khuẩn được kiểm tra bằng phương pháp PCR.

Nguồn thảo dược: Diệp hạ châu sau khi thu về loại bỏ phần sâu bệnh, rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ từ 40-45°C. Máu sau khi khô được xay nhuyễn thành mẫu bột nguyên liệu. Bột nguyên liệu được cho vào trong túi vải và ngâm trong dung môi methanol. Máu được ngâm 5 lần, mỗi lần ngâm khoảng 24 giờ, dịch chiết từ các lần ngâm được gom lại, cô quay đuổi dung môi thu được cao tổng thực vật (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007).

Thức ăn thí nghiệm: Thức ăn sử dụng trong quá trình thí nghiệm là thức ăn công nghiệp 32% đạm, kích cỡ 2 mm/viên (Grobest). Chất chiết tương ứng theo tỉ lệ của mỗi nghiệm thức được bổ sung vào thức ăn bằng cách pha loãng với 10 mL DMSO và tiếp tục với 10 mL nước, phun và trộn đều cho chất chiết thấm vào thức ăn, để khô tự nhiên trong vòng 4 giờ. Sau đó áo ngoài viên thức ăn bằng dầu mực và tiếp tục để khô tự nhiên trong 8 giờ ở nhiệt độ phòng. Thức ăn được trữ ở 4°C trong quá trình thí nghiệm.

2.2 Bố trí thí nghiệm

2.2.1 Thí nghiệm cho ăn thức ăn bổ sung diệp hạ châu

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 nghiệm thức bao gồm nghiệm thức đối chứng (0% chất chiết diệp hạ châu), nghiệm thức 1% chất chiết diệp hạ châu và nghiệm thức 2% chất chiết diệp hạ châu. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Số lượng thí nghiệm 40 cá/bể 500 L. Cá được cho ăn với khẩu phần 3% khối lượng thân, chia thành 3 lần/ngày

trong 4 tuần. Bể được sục khí liên tục, theo dõi và siphon đáy bể 2 ngày/lần, mỗi lần thay 20-30% thể tích nước. Định kỳ thu mẫu máu vào 2 đợt gồm tuần thứ 2 (đợt 1) và tuần 4 (đợt 2), thu 3 cá/bể để xác định các chỉ tiêu huyết học và hoạt tính lysozyme. Cá được cân khối lượng ở thời gian bắt đầu và kết thúc thí nghiệm để tính tăng trưởng.

2.2.2 Thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*

Sau 4 tuần cho ăn thức ăn có bổ sung chất chiết diệt hạ châu, cá được cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*. Thí nghiệm được thực hiện với 4 nghiệm thức gồm cá được bổ sung 0% chất chiết diệt hạ châu và tiêm vi khuẩn (NT1); cá được bổ sung 1% chất chiết diệt hạ châu và tiêm vi khuẩn (NT2); cá được bổ sung 2% chất chiết diệt hạ châu và tiêm vi khuẩn (NT3); và nghiệm thức đối chứng âm, tiêm nước muối sinh lí (0,85% NaCl) (NT4). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Mỗi bể có 13 cá, trong đó 10 cá được sử dụng để tính toán tỉ lệ chết của cá cảm nhiễm và 3 cá được sử dụng để thu mẫu sau 3 ngày cảm nhiễm, bể được sục khí liên tục và không thay nước. Mỗi cá được tiêm 0,1 mL vi khuẩn *E. ictaluri* (10^5 CFU/ml). Cá cảm nhiễm được theo dõi trong 14 ngày. Sau 3 ngày cảm nhiễm tiến hành thu mẫu (đợt 3), mỗi bể thu 3 cá để đo chỉ tiêu huyết học và hoạt tính lysozyme (3 cá này sẽ không được tính vào tỉ lệ chết tích lũy của cá trong thí nghiệm cảm nhiễm). Hằng ngày quan sát dấu hiệu bệnh lý, ghi nhận số cá chết, phân lập vi khuẩn *E. ictaluri* từ thận cá lờ đờ và tiến hành tái định danh vi khuẩn bằng phương pháp PCR.

2.3 Phương pháp phân tích

2.3.1 Tăng trưởng

Khối lượng gia tăng: $WG (g) = (W_t - W_0)$

Tốc độ tăng trưởng tuyệt đối: $DWG (g/ngày) = (W_t - W_0)/t$

Trong đó:

W_0 : Khối lượng cá ở thời điểm ban đầu (g); W_t : Khối lượng cá ở thời điểm kết thúc thí nghiệm (g); t : Thời gian nuôi (ngày).

2.3.2 Định lượng hồng cầu được phân tích theo phương pháp của Natt and Herick (1952), mật độ hồng cầu được xác định bằng buồng đếm Neubauer và tính theo công thức: $HC = C \times 10 \times 5 \times 200$ (tế bào/mm³) (C: Tổng số hồng cầu của 5 vùng đếm).

2.3.3 Định lượng bạch cầu được thực hiện theo phương pháp của Hrubec *et al.* (2000). Trải mẫu máu bằng cách nhỏ một giọt máu lên lame, dùng một

lame khác chạm vào giọt máu, sau đó đẩy về phía trước, để khô tự nhiên. Mẫu máu sau khi khô cố định bằng methanol trong 1 phút. Để mẫu khô tự nhiên và nhuộm Wright & Giemsa. Tổng số lượng bạch cầu được tính theo công thức: $TBC (tb/mm^3) = (Số BC trong 1.500 tế bào \times R) / Số HC trong 1.500 tế bào$ (TBC: mật độ tổng bạch cầu, BC: bạch cầu, R: mật độ hồng cầu, HC: hồng cầu).

2.3.4 Định lượng từng loại bạch cầu trong tổng số 200 tế bào bạch cầu được thực hiện theo phương pháp của Hrubec *et al.* (2000). Tính mật độ từng loại bạch cầu theo công thức: $Mật độ loại bạch cầu (tb/mm^3) = (Số lượng mỗi loại bạch cầu \times TBC) / 200$.

2.3.5 Hoạt tính lysozyme được phân tích theo phương pháp của Ellis (1990). Xây dựng đường chuẩn lysozyme với các nồng độ phù hợp. Cho 10μL dung dịch từ các nồng độ pha loãng và huyết thanh vào đĩa 96 giếng, tiếp theo cho 130μL dịch huyền phù *Micrococcus luteus* (Sigma) vào mỗi giếng. 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.

2.3.6 Phương pháp PCR phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri*

Vi khuẩn *E. ictaluri* được phát hiện dựa theo qui trình PCR được mô tả bởi Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương (2009). Mẫu hiện vạch 407 bp là mẫu dương tính với *E. ictaluri*.

2.4 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được nhập, tính trung bình bằng phần mềm Excel. Các số liệu được xử lý thống kê ANOVA 1 nhân tố và phép thử Duncan với mức ý nghĩa 5% bằng phần mềm SPSS.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tăng trưởng của cá tra có sung chất chiết diệt hạ châu trong thức ăn

Sau 4 tuần thí nghiệm, cá tra ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết diệt hạ châu (1% và 2%) có khối lượng tăng trung bình lần lượt là $(12,02 \pm 2,76$ và $15,96 \pm 4,63$ g) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với cá ở nghiệm thức đối chứng ($7,92 \pm 1,11$ g) ($p < 0,05$). Tăng trưởng tuyệt đối (DWG) của cá ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết diệt hạ châu ($0,43 \pm 0,10$ đến $0,57 \pm 0,17$ g/ngày) đều cao hơn đối chứng ($0,29 \pm 0,04$ g/ngày) có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trong đó, cá được bổ sung 1% chất chiết diệt hạ châu có tăng trưởng và tốc độ tăng trưởng tuyệt đối cao nhất (Bảng 1).

Bảng 1: Ảnh hưởng của thảo dược lên tăng trưởng cá tra

Nghiệm thức	Khối lượng cá ban đầu (g)	Khối lượng cá cuối (g)	Tăng trưởng WG (g)	Tốc độ tăng trưởng tuyệt đối DWG (g/ngày)
0% diệp hạ châu	18,33±1,41 ^a	26,26± 0,90 ^a	7,92±1,11 ^a	0,29± 0,04 ^a
1% diệp hạ châu	17,45±1,62 ^a	29,47±1,63 ^b	12,02±2,76 ^b	0,43±0,10 ^b
2% diệp hạ châu	17,84±1,78 ^a	33,80±4,27 ^b	15,96±4,63 ^b	0,57±0,17 ^b

(Ghi chú: Các giá trị thể hiện trên bảng là giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Các giá trị có ký tự khác nhau trong cùng một cột (a, b) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

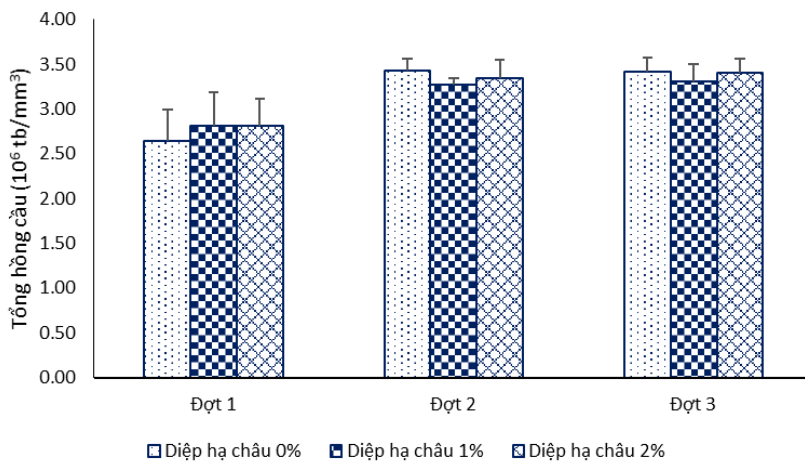
Từ lâu, nhiều loại thảo dược đã được chứng minh có tác dụng thúc đẩy tăng trưởng (Sivaram *et al.*, 2004), do có khả năng chuyển hóa thức ăn tốt (Shalaby *et al.*, 2004), tăng cường chuyển hóa protein và giữ năng lượng (El-Dakar *et al.*, 2004a; 2004b) ở động vật thủy sản. Abdel-Hakim *et al.* (2010) bổ sung tỏi vào thức ăn cá rô phi trong suốt thời gian ương nuôi (22 tuần) làm tăng tỉ lệ sống, thúc đẩy tăng trưởng và khả năng chuyển hóa thức ăn, cải thiện hiệu quả sử dụng protein. Tương tự, bổ sung các loại thảo dược như so đũa, chùm ngây, tần dầy lá, húng quế, cà hôi vào thức ăn cũng thúc đẩy tăng trưởng cho cá rô phi *Oreochromis mossambicus* (Lee and Gao, 2012).

3.2 Chỉ tiêu huyết học

Mật độ tổng hồng cầu

Sau 2 tuần bổ sung chất chiết diệp hạ châu, mật độ hồng cầu của cá dao động từ $2,64 \times 10^6$ đến

$2,81 \times 10^6$ tế bào/mm³ (Hình 1). Nghiệm thức bổ sung diệp hạ châu ở nồng độ 1% và 2% đều cho kết quả tổng hồng cầu đều cao hơn so với cá ở nhóm đối chứng, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Sau 4 tuần thí nghiệm, mật độ hồng cầu của cá tăng cao hơn so với thời điểm thu mẫu ở tuần thứ 2. Các nghiệm thức có mật độ hồng cầu dao động từ $3,27 \times 10^6$ đến $3,43 \times 10^6$ tế bào/mm³. Tổng hồng cầu của cá ở nghiệm thức bổ sung 1% và 2% chất chiết diệp hạ châu đều cho kết quả cao, lần lượt có giá trị ($3,27 \times 10^6$ và $3,35 \times 10^6$ tế bào/mm³) nhưng không khác biệt thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p > 0,05$). Sau 3 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, mật độ hồng cầu ở tất cả các nghiệm thức đều cao, dao động từ $3,31 \times 10^6$ – $3,42 \times 10^6$ tế bào/mm³ và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở giữa các nghiệm thức ($p > 0,05$).



Hình 1: Ảnh hưởng của diệp hạ châu lên mật độ hồng cầu cá tra

Hồng cầu có chức năng tham gia vào quá trình vận chuyển oxy đến các cơ quan và tế bào, tuy không tham gia trực tiếp vào quá trình đáp ứng miễn dịch nhưng cũng góp phần gián tiếp ảnh hưởng đến hệ miễn dịch của cá (Chinabut *et al.*, 1991). Nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của chất chiết từ thảo dược lên động vật thủy sản đã được thực hiện và ghi nhận

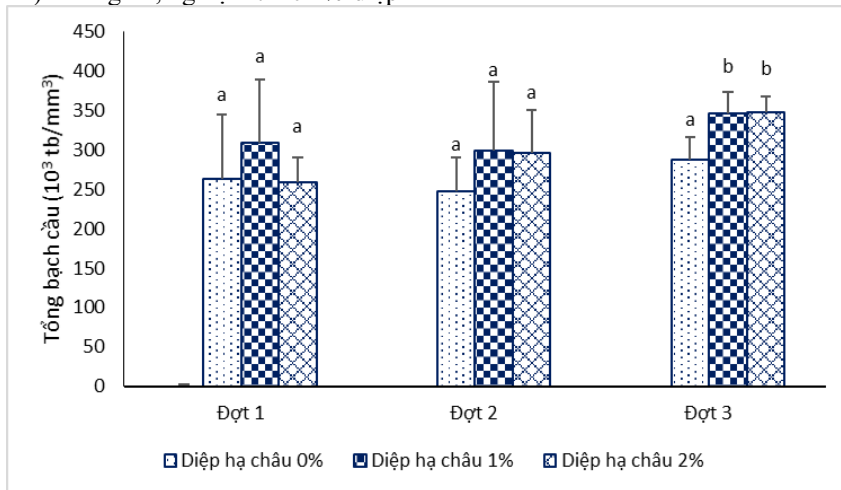
có sự tác động lên một số chỉ tiêu huyết học của cá. Binaii *et al.* (2014), sử dụng chất chiết từ lá và thân cây tầm ma (*Urtica dioica*) bổ sung vào thức ăn cho cá tầm (*Huso huso*) với các nồng độ 0, 3, 6 và 12% trong 8 tuần và ghi nhận số lượng hồng cầu của nghiệm thức bổ sung 12% đạt cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng ($p < 0,05$) ở cả hai lần

thu mẫu (sau 4 tuần và 8 tuần). Thí nghiệm bổ sung chất chiết từ nước ép quả bứa (*Garcinia gummi-gutta*) với nhiều nồng độ 0, 500, 1.000, 2.000 và 3.000 mg/kg vào thức ăn cho cá tra làm gia tăng mật độ hồng cầu trong cá (Prasad and Priyaka, 2011). Sahu *et al.* (2007) cũng ghi nhận có sự gia tăng tế bào hồng cầu khi cho cá trôi Ấn Độ (*Labeo rohita*) sử dụng thức ăn có chứa xoài (*Magnifera indica*). Chất chiết từ lá bàng (*Terminalia catappa*) cũng làm mật độ hồng cầu, hàm lượng hemoglobin trong máu cá tăng (Nugroho *et al.*, 2016)

Tổng bạch cầu

Sau 2 tuần thí nghiệm, mật độ tổng bạch cầu của các nghiệm thức bổ sung chất chiết xuất diệp hạ châu dao động từ $258,60 \times 10^3$ – $309,10 \times 10^3$ tế bào/mm³ (Hình 2). Trong đó, nghiệm thức 1% diệp

hạ châu cho mật độ tổng bạch cầu tăng cao ($309,10 \times 10^3$ tế bào/mm³), cao hơn so với nghiệm thức đối chứng ($263,92 \times 10^3$ tế bào/mm³) nhưng không có ý nghĩa thống kê. Sau 4 tuần, mật độ bạch cầu của các nghiệm thức có sự tăng nhẹ so với tuần thứ 2, đặc biệt tăng cao ở nghiệm thức bổ sung 2% diệp hạ châu. Tổng bạch cầu ở nghiệm thức 1% và 2% diệp hạ châu có giá trị lần lượt $299,87 \times 10^3$ và $295,84 \times 10^3$ tế bào/mm³, cao hơn nghiệm thức đối chứng ($247,36 \times 10^3$ tế bào/mm³) nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Sau 3 ngày cảm nhiễm, kết quả tổng bạch cầu của cá đều gia tăng. Nghiệm thức bổ sung 1 và 2% diệp hạ châu tăng rất cao ($346,58 \times 10^3$ và $348,35 \times 10^3$ tế bào/mm³) và cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($287,69 \times 10^3$ tế bào/mm³) ($p < 0,05$).



Hình 2: Ảnh hưởng của diệp hạ châu lên mật độ tổng bạch cầu của cá tra

(Ghi chú: Các giá trị trong cùng một đợt có các chữ cái khác nhau (a,b), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Kết quả nghiên cứu này cho thấy diệp hạ châu có thể kích hoạt bạch cầu trong máu cá tra. Kết quả này cũng tương đồng với các nghiên cứu trước như Binaii *et al.* (2014) bổ sung chất chiết từ cây tầm ma (*Urtica dioica*) vào thức ăn cá tầm (*Huso huso*) sau 8 tuần, mật độ tổng bạch cầu tăng cao nhất ở nghiệm thức 6%, khác biệt so với đối chứng ($p < 0,05$). Cá tra sử dụng thức ăn có bổ sung chất chiết từ hoa môi (*Zhumeria majdae*) với nhiều nồng độ khác nhau 0; 150; 300; 600 mg/kg thức ăn trong 45 ngày thì nghiệm thức bổ sung 600 mg/kg chất chiết hoa môi có mật độ hồng cầu ($3,1 \times 10^6$ tb/mm³) và bạch cầu ($7,4 \times 10^3$ tb/mm³) tăng cao nhất (Mohammad *et al.*, 2013). Uthayakumar *et al.* (2014) bổ sung chiết xuất sần đầu (0; 0,2; 2 và 200mg/kg) vào thức ăn cho cá lóc (*Channa striata*) sau 1 tháng cho kết quả cá ở nghiệm thức 200 mg/kg thức ăn có hồng cầu

($2,68 \times 10^6$ tb/mm³) và bạch cầu ($146,6 \times 10^3$ tb/mm³) cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê với đối chứng ($p < 0,05$). Sử dụng 3.000 mg/kg chất chiết từ nước ép quả bứa (*Garcinia gummi-gutta*) bổ sung vào thức ăn cá tra, kết quả số lượng bạch cầu của cá tăng gấp 2 lần so với nghiệm thức đối chứng và các nghiệm thức khác (Prasad and Priyanka, 2011).

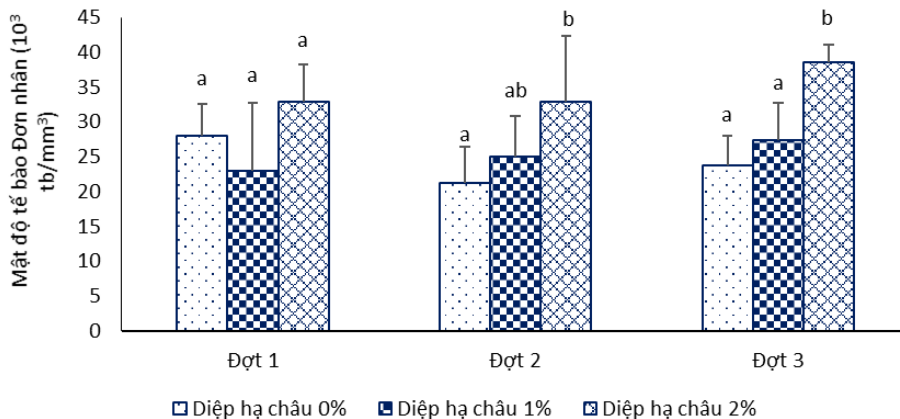
Bạch cầu đơn nhân

Kết quả sau 2 tuần thí nghiệm cho thấy chiết xuất diệp hạ châu có khả năng kích thích làm gia tăng tế bào đơn nhân. Đặc biệt, nghiệm thức bổ sung 2% diệp hạ châu có mật độ tế bào đơn nhân $32,89 \times 10^3$ tế bào/mm³ đạt giá trị cao nhất, nhưng khác biệt không ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng ($28,06 \times 10^3$ tế bào/mm³) ($p > 0,05$). Sau 4 tuần, tế bào

đơn nhân của các nghiệm thức bổ sung chiết xuất diệp hạ châu 1%, 2% có giá trị lần lượt là $24,93 \times 10^3$ và $32,92 \times 10^3$ tế bào/mm³ tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng nhưng chỉ nghiệm thức 2% diệp hạ châu khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Sau 3 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn gây bệnh gan thận mù, mật độ tế bào đơn nhân ở nghiệm thức bổ sung 1% và 2% diệp hạ châu tiếp tục gia tăng, đạt giá trị lần lượt là $27,34 \times 10^3$ và $38,61 \times 10^3$ tế bào/mm³, cao hơn so với nghiệm thức đối chứng ($23,79 \times 10^3$ tế bào/mm³). Trong đó, nghiệm thức bổ sung 2% diệp hạ châu khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$).

Tế bào đơn nhân là một trong những thành phần quan trọng của hệ miễn dịch, là tiền thân của đại thực bào, giữ chức năng quan trọng trong việc nhận dạng và thực bào kháng nguyên bảo vệ cơ thể khỏi các vật lạ xâm nhập (Đỗ Ngọc Liên, 2004). Sự gia tăng tổng bạch cầu cũng được ghi nhận trong thí nghiệm ở cá chép ngấm 10 phút/ngày trong liên tục 30 ngày với chiết xuất lá sấu đầu liều lượng 1 g/L (Harikrishnan *et al.*, 2003). Một vài chiết xuất từ *Ocimum sanctum*, *Emblca officinalis*, *Cynodon*

dactylon, và *Adhatoda vasica* cũng cho thấy có khả năng kích thích làm gia tăng tế bào bạch cầu và hoạt động thực bào ở cá vàng (*Carassius auratis*) (Selviraj *et al.*, 2005). Yeganeh *et al.* (2015) cũng phát hiện hồng cầu, tổng bạch cầu và huyết sắc tố tăng đáng kể ở cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*) sau khi bổ sung tảo *Spirulina platensis* vào thức ăn trong 10 tuần. Một số nghiên cứu bổ sung chất điều biến miễn dịch vào thức ăn cho cá cũng làm gia tăng mật độ bạch cầu đơn nhân trong máu của cá. Bổ sung vitamin C cho cá tra thông qua phương pháp cho ăn ghi nhận được sự gia tăng rõ rệt số lượng tế bào máu bao gồm tổng bạch cầu và các loại tế bào bạch cầu như tế bào lympho, tế bào đơn nhân và bạch cầu trung tính ở nhóm cá được bổ sung vitamin C sau 4 tuần (Bùi Thị Bích Hằng và *ctv.*, 2015). Bùi Thị Bích Hằng và *ctv.* (2017) cũng nhận thấy sau 4 tuần bổ sung levamisole, mật độ bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, tế bào lympho và tiểu cầu tăng cao ở các nghiệm thức có bổ sung levamisole. Tuy nhiên, chỉ có nghiệm thức 300 mg/kg thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với đối chứng ở chỉ tiêu bạch cầu đơn nhân.



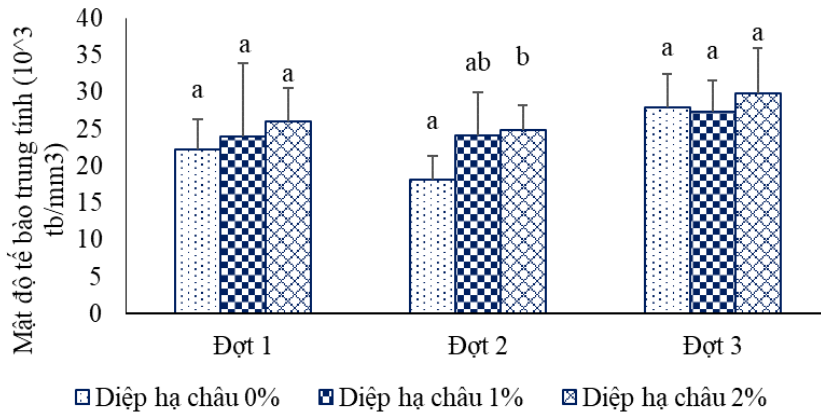
Hình 3: Ảnh hưởng của diệp hạ châu lên mật độ bạch cầu đơn nhân của cá tra

(Ghi chú: Các giá trị trong cùng một đợt có các chữ cái khác nhau (a,b) thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Bạch cầu trung tính

Kết quả sau 2 tuần thí nghiệm cho thấy mật độ bạch cầu trung tính ở các nghiệm thức dao động trong khoảng $22,29 \times 10^3$ - $25,96 \times 10^3$ tế bào/mm³ (Hình 4). Nghiệm thức bổ sung 1 và 2% chất chiết diệp hạ châu có mật độ bạch cầu trung tính lần lượt là $24,03 \times 10^3$ và $25,96 \times 10^3$ tế bào/mm³, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với đối chứng ($22,29 \times 10^3$ tế bào/mm³). Sau 4 tuần thí

nghiệm, số lượng tế bào trung tính ở các nghiệm thức bổ sung diệp hạ châu ($24,09 \times 10^3$ và $24,82 \times 10^3$ tế bào/mm³) cao hơn so với nghiệm thức đối chứng ($18,07 \times 10^3$ tế bào/mm³), chỉ có nghiệm thức 2% diệp hạ châu cho giá trị khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Sau 3 ngày cảm nhiễm cho thấy tế bào trung tính ở 1% và 2% diệp hạ châu tăng cao ($27,35 \times 10^3$ và $29,77 \times 10^3$ tế bào/mm³) nhưng vẫn khác biệt không có ý nghĩa so với đối chứng.



Hình 4: Ảnh hưởng của diệp hạ châu lên mật độ bạch cầu trung tính của cá tra

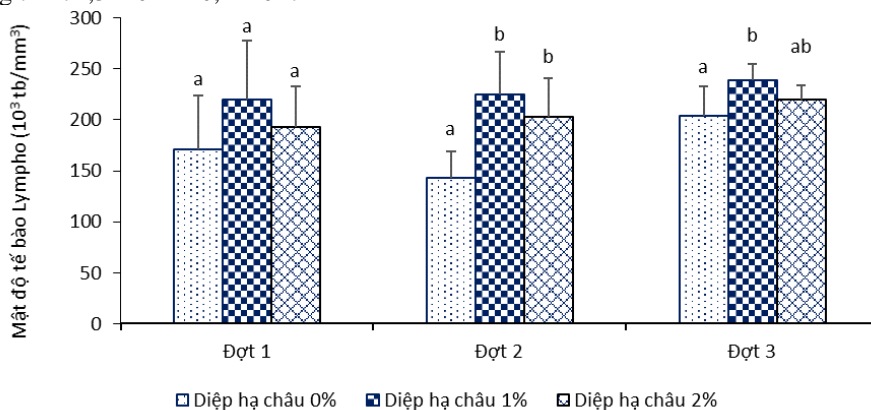
(Ghi chú: Các giá trị trong cùng một đợt có các chữ cái khác nhau (a,b), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Bạch cầu trung tính thực hiện chức năng thực bào và hỗ trợ hoạt động của đại thực bào, tế bào này thường tập trung và tiến hành thực bào tại những nơi có phản ứng viêm. Đặng Thị Hoàng Oanh và Trần Thị Yến Nhi (2011) cho biết dịch chiết từ Hoàng kỳ được bổ sung với liều lượng 0,5% vào thức ăn cho cá tra (20-30 g/con) trong 5 tuần cho kết quả số lượng hồng cầu, tế bào lympho, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, tiểu cầu tăng so với cá ăn thức ăn không bổ sung (đối chứng).

Mật độ tế bào lympho

Ở tuần thứ 2, mật độ tế bào lympho ở các nghiệm thức dao động từ $171,3 \times 10^3$ - $220,4 \times 10^3$ tế bào/mm³

(Hình 5). Nghiệm thức bổ sung 1% và 2% chất chiết diệp hạ châu có mật độ tế bào lympho lần lượt đạt giá trị $220,4 \times 10^3$ và $193,4 \times 10^3$ tế bào/mm³, cao hơn so với nghiệm thức đối chứng ($171,3 \times 10^3$ tế bào/mm³). Ở tuần thứ 4, mật độ tế bào lympho ở các nghiệm thức 1% và 2% chất chiết diệp hạ châu đạt $224,7 \times 10^3$ và $202,81 \times 10^3$ tế bào/mm³, tăng cao có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($143,56 \times 10^3$ tế bào/mm³) ($p < 0,05$). Sau 3 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn, tế bào lympho ở nghiệm thức bổ sung 1% diệp hạ châu là ($238,47 \times 10^3$ tế bào/mm³) tăng cao có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$).



Hình 5: Ảnh hưởng của diệp hạ châu lên mật độ tế bào lympho của cá tra

(Ghi chú: Các giá trị trong cùng một đợt có các chữ cái khác nhau (a, b), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Kết quả thí nghiệm trên cũng tương đồng với các nghiên cứu trước đây, Fazlolahzadeh *et al.* (2011) ghi nhận, mật độ tế bào lympho của cá hồi vân tăng cao ở các nghiệm thức sử dụng thức ăn có bổ sung

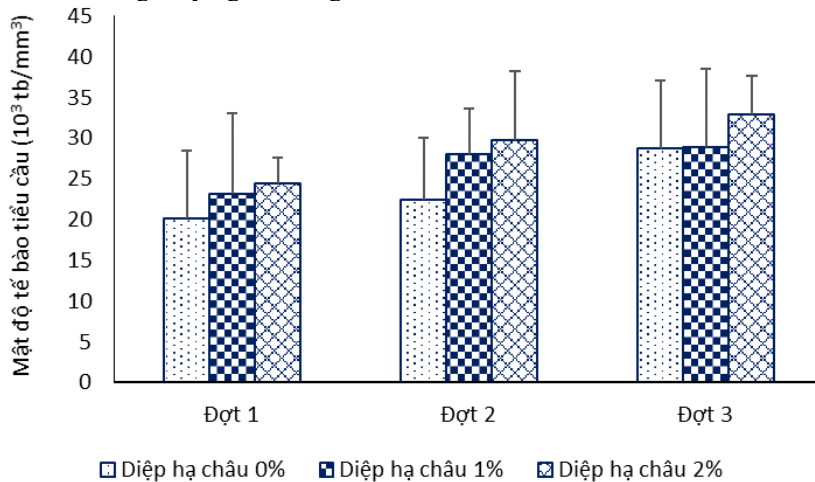
0,45 g và 0,6 g bột tỏi/kg thức ăn so với nghiệm thức đối chứng. Mai Thanh Thanh và Bùi Thị Bích Hằng (2018) cho biết bổ sung tỏi vào thức ăn cá tra cũng kích thích làm gia tăng mật độ tế bào lympho của cá.

Thí nghiệm bổ sung chất chiết cây kể sừa vào thức ăn cá hồi cũng cho thấy số lượng tế bào lympho tăng lên nhưng chỉ có nghiệm thức bổ sung 0,4 g/kg tăng có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng (Ahmadi *et al.*, 2012).

Tiểu cầu

Sau 2 tuần thí nghiệm, mật độ tiểu cầu dao động trong khoảng $20,17 \times 10^3$ – $24,45 \times 10^3$ tế bào/mm³ (hình 3). Nghiệm thức bổ sung chất chiết xuất diệp hạ châu lần lượt là tăng cao hơn so với đối chứng nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê

($p > 0,05$). Sau 4 tuần, các nghiệm thức bổ sung 1% và 2% chiết xuất diệp hạ châu tiếp tục tăng và cho kết quả tương đương nhau ($27,97 \times 10^3$ và $29,77 \times 10^3$ tế bào/mm³), tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng ($22,39 \times 10^3$ tế bào/mm³). Sau 3 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn, tiểu cầu ở các nghiệm thức bổ sung 1% và 2% chất chiết diệp hạ châu tương ứng đạt $28,91 \times 10^3$ và $32,97 \times 10^3$ tế bào/mm³, cao hơn so với nghiệm thức đối chứng ($18,55 \times 10^3$ tế bào/mm³). Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).



Hình 6: Ảnh hưởng của diệp hạ châu lên tiểu cầu của cá tra sau thí nghiệm

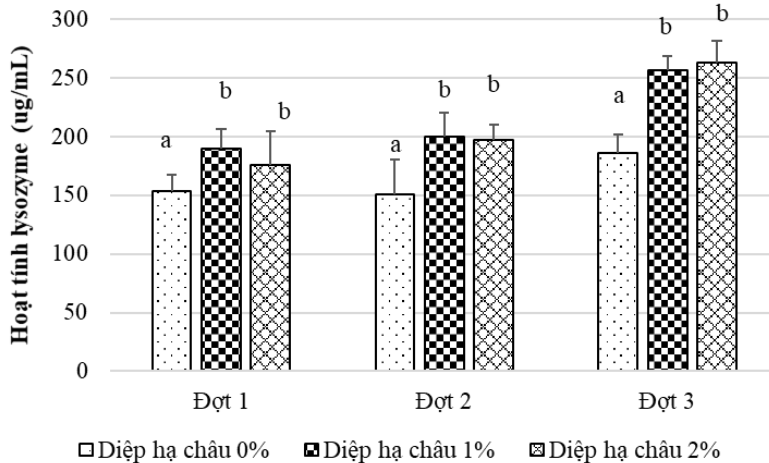
(Ghi chú: Các giá trị trong cùng một đợt có các chữ cái khác nhau (a,b), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Prasad and Priyanka (2011) khi bổ sung chất chiết từ nước ép quả bứa (*G.gummi-gutta*) vào thức ăn cá trôi thì số lượng tiểu cầu tăng lên nhưng khác biệt không có ý nghĩa giữa các nghiệm thức. Bùi Thị Bích Hằng (2017) sử dụng vitamin C kích thích miễn dịch không đặc hiệu trên cá tra cũng cho thấy số lượng tế bào này không có khác biệt giữa các nghiệm thức sau 2 và 4 tuần thí nghiệm. Nghiên cứu bổ sung tỏi vào thức ăn cá tra cũng không ảnh hưởng đến mật độ tế bào tiểu cầu của cá tra (Mai Thanh Thanh và Bùi Thị Bích Hằng, 2018).

Hoạt tính lysozyme

Sau 2 tuần sử dụng thức ăn có bổ sung chất chiết thảo dược, hoạt tính lysozyme của cá ở các nghiệm thức dao động từ 153,67 đến 189,83 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 7). Nghiệm thức bổ sung 1% chiết xuất diệp hạ châu

có hoạt tính lysozyme cao nhất 189,8 $\mu\text{g/mL}$ và khác biệt có ý nghĩa so với với nghiệm thức đối chứng 153,7 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$). Sau 4 tuần thí nghiệm, hoạt tính lysozyme ở các nghiệm thức bổ sung 1 và 2% diệp hạ châu tăng cao hơn ở tuần thứ 2, lần lượt đạt giá trị 200,3 và 197 $\mu\text{g/mL}$ và cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng. Trong đó, hoạt tính lysozyme ở nghiệm thức bổ sung 1% chiết xuất diệp hạ châu đạt giá trị cao nhất (200,3 $\mu\text{g/mL}$). Sau 3 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, hoạt tính lysozyme ở các nghiệm thức đều tăng cao, dao động trong khoảng 185,9 – 263,3 $\mu\text{g/mL}$. Các nghiệm thức bổ sung 1 và 2% diệp hạ châu có hoạt tính lysozyme lần lượt đạt giá trị 256,3 và 263,3 $\mu\text{g/mL}$ cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (185,91 $\mu\text{g/mL}$) gấp 1,37 và 1,42 lần, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 7: Ảnh hưởng của diệp hạ châu lên hoạt tính lysozyme của cá tra

(Ghi chú: Các giá trị trong cùng một đợt có các chữ cái khác nhau (a,b) thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

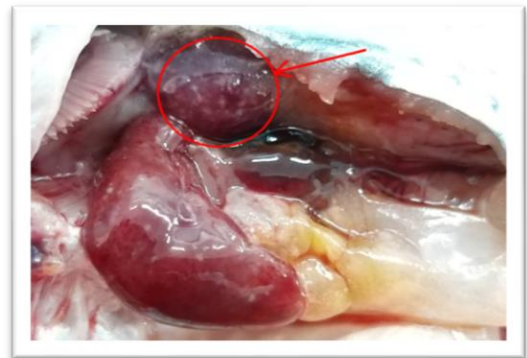
Lysozyme là một enzyme có khả năng cắt cầu nối giữa phân tử N-acetyl glucosamine và N-acetyl muramin có trong cấu tạo của màng vi khuẩn. Chính nhờ hoạt tính trên mà lysozyme có thể tiêu diệt vi khuẩn Gram dương và một số vi khuẩn Gram âm, vì thế hoạt động của lysozyme càng cao, khả năng kháng bệnh càng cao (Đỗ Ngọc Liên, 2004). Kết quả thí nghiệm này cũng phù hợp với nghiên cứu của Christyapita *et al.* (2007) khi bổ sung chất chiết cỏ mực vào thức ăn cá rô phi trong 3 tuần thì hoạt tính lysozyme tăng cao chỉ sau 1 tuần thí nghiệm. Thí nghiệm trên cá chép (*Cyprinus carpio*) cho ăn chiết xuất sấu đầu (0,25; ,5 và 0,75 g/kg thức ăn) trong 30 ngày thì cá ở nghiệm thức bổ sung chiết xuất sấu đầu (0,25g/kg thức ăn) có hoạt tính lysozyme cao nhất (Valsa and Balasubramanian, 2014). Nghiên cứu của Asadi *et al.* (2012) khi bổ sung 1% cải xoong cho cá hồi vân trong 21 ngày đã làm tăng hoạt tính lysozyme của cá và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng. Tương tự, Ahmadi *et al.* (2012) cũng ghi nhận khi bổ sung chiết xuất cây kê sữa vào thức ăn cá hồi thu được kết quả lysozyme cao hơn có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng ở 2 nồng độ 0,1 và 0,4 g/kg thức ăn.

3.3 Kết quả cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri*

3.3.1 Dấu hiệu bệnh lý và tỉ lệ chết tích lũy

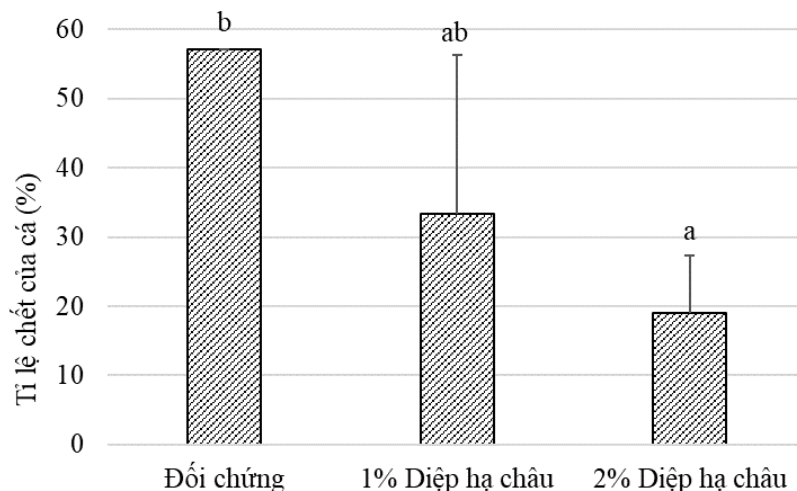
Sau 14 ngày theo dõi thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*. Kết quả cho thấy cá sau khi cảm nhiễm có dấu hiệu bơi lơ đờ, kém ăn, không phản ứng với tiếng động và một số vây cá có dấu hiệu tưa rách, xuất huyết nhẹ. Khi giải phẫu bên trong nội quan thường có dịch trong xoang bụng, gan thận và tỳ tạng xuất hiện nhiều đốm trắng nhỏ li ti nhỏ (Hình 8). Dấu hiệu bệnh lý của cá tra khi cảm nhiễm với

E. ictaluri giống như mô tả dấu hiệu bệnh gan thận mù trên cá tra của Từ Thanh Dung và *ctv.* (2004). Cá ở nghiệm thức đối chứng (tiêm nước muối sinh lý) khỏe mạnh và không có bất cứ dấu hiệu bệnh lý nào.



Hình 8: Thận và gan cá cảm nhiễm có đốm trắng (mũi tên)

Trong 2 ngày đầu sau khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri*, cá ở tất cả các nghiệm thức đều bình thường, đến ngày thứ 3 cá bắt đầu chết và tiếp tục chết nhiều ở các ngày 4 và 5. Tuy nhiên, ngày thứ 6 thì cá chết giảm dần và ngừng chết vào ngày thứ 8. Cá đối chứng ở nghiệm thức tiêm nước muối sinh lý vẫn bình thường, không có biểu hiện bệnh và không có cá chết. Sau 14 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn, kết quả cho thấy tỉ lệ chết ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết diệp hạ châu đều thấp hơn với nghiệm thức đối chứng (Hình 9). Cụ thể nghiệm thức bổ sung 1% và 2% diệp hạ châu có tỉ lệ cá chết lần lượt là 33,3% và 19,1%, thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với cá đối chứng (57,1%).



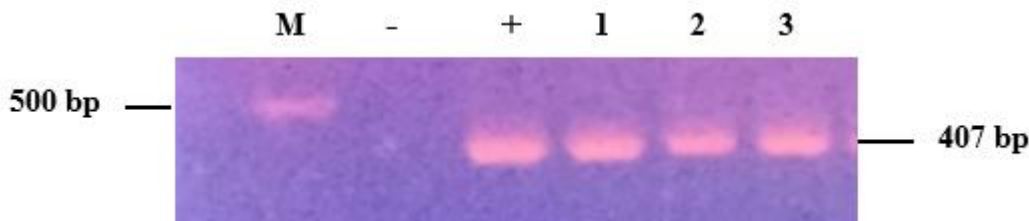
Hình 9: Tỷ lệ chết của cá cảm nhiễm

(Ghi chú: Các giá trị trên đồ thị có các chữ cái khác nhau (a,b), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Tái định danh vi khuẩn *E. ictaluri*

Kết thúc thí nghiệm cảm nhiễm, tiến hành tái định danh vi khuẩn bằng phương pháp PCR trên

mẫu thận cá. Kết quả tái định danh vi khuẩn bằng phương pháp PCR trên mẫu thận cá có biểu hiện bệnh cho thấy các mẫu đều thể hiện ở vạch đặc hiệu của *E. ictaluri* ở 407bp.



Hình 10: Kết quả điện di sản phẩm PCR tái định danh vi khuẩn

(Giếng M: thang đo ADN; Giếng (-): đối chứng âm; Giếng (+): đối chứng dương; Giếng 1: Đối chứng Giếng 2: 1% diệp hạ châu, Giếng 3: 2% diệp hạ châu)

4 KẾT LUẬN

Cá tra giống ăn thức ăn có bổ sung chất chiết diệp hạ châu 4 tuần cho thấy có sự gia tăng một số chỉ tiêu huyết học bao gồm tổng bạch cầu, bạch cầu đơn nhân, tế bào lympho và hoạt tính lysozyme. Sau cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mũ thì tỷ lệ chết của cá ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết diệp hạ châu đều giảm so với đối chứng. Như vậy, nên bổ sung 2% chất chiết diệp hạ châu vào thức ăn cá tra nhằm kích hoạt đáp ứng miễn dịch, tăng cường khả năng phòng bệnh gan thận mũ cho cá.

CẢM TẠ

Đề tài này được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ Chính phủ Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abdel-Hakim, N.F., Lashin, M.M.E., Al-Azab, A.A.M. and Ashry, A.M., 2010. Effect of fresh or dried garlic as a natural feed supplement on growth performance and nutrients utilization of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Egypt J Aquat Biol Fish. 14: 19-38.

Ahmadi, K., Banaee, M., Vosoghei, A.R., Mirvaghefi, A.R. and Ataimehr, B., 2012. Evaluation of the immunomodulatory effects of silymarin extract (*Silybum marianum*) on some immune parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae). Acta Ichthyologica Et Piscatoria, 42 (2): 113-120.

Asadi, M.S., Mirvaghefi, A.R., Nematollahi, M.A., Banaee, M. and Ahmadi, K., 2012. Effects of Watercress (*Nasturtium nasturtium*) extract on

- some immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Open Vet. J., 2(1): 32-39.
- Awad, E. and Awaad, A., 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. Fish Shellfish Immunol. 67: 40-54.
- Balasubramanian, K., Soundharajan, I. and Ravikumar, S., 2011. Growth response, feed conversion ratio and antiprotease activity of *Cynodon dactylon* (L.) mixed diet in *Catla catla* (Ham.). J Ani Vet Adv. 10: 511-517.
- Binaii, M., Ghiasi, M., Farabi, S.M.V., et al., 2014. Biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*). Fish Shellfish Immunol, 36: 46-51.
- 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.
- Bùi Thị Bích Hằng, Phạm Văn Thi, Nguyễn Văn Tân, Trương Quỳnh Như và Nguyễn Thanh Phương, 2015. Ảnh hưởng của vitamin C lên một số yếu tố miễn dịch không đặc hiệu và khả năng kháng khuẩn gây bệnh của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 39B: 85-91.
- Chakraborty, S.B. and Hancz, C. 2011. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. Reviews in Aquaculture, 3: 103-119.
- Chinabut, S., P. Kisawat and C. Limsuwan, 1991. Histology of the walking catfish, *Clarias batrachus*. Int Dev Res Center, Canada, 96 pages.
- Chitmanat, C., Tongdonmuan, K., Khanom, P., Pachontis, P. and Nunsong, W., 2005. Antiparasitic, antibacterial and antifungal activities derived from a *Terminalia catappa* solution against some Tilapia (*Oreochromis niloticus*) pathogens. Acta Horticulturae. 678. 10.17660/ActaHortic.2005.678.25.
- Christyapita, D., Divyagnaneswari, M. and Dinakaran M.R., 2007. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. Fish Shellfish Immunol, 23(4): 840-852.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2009. Phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mù trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng phương pháp PCR. Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 13: 151-159.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Trần Thị Yến Nhi, 2011. Ảnh hưởng của chiết xuất từ cây hoàng kỳ (*Astragalus radix*) lên một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Kỷ yếu Hội nghị khoa học thủy sản lần 4, Trường Đại học Cần Thơ, 278-288.
- Đỗ Ngọc Liên, 2004. Miễn dịch học cơ sở. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội. 340 trang.
- Düğenci, S.K., Arda N. and Candan A., 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. J Ethophar., 88: 99-106.
- El-Dakar, A.Y., Hassanien, G.D.I., Gad, S.S. and Sakr, S.E., 2004a. Use of medical and aromatic plants in fish diets: I. Effect of dried marjoram leaves on performance of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aurochromis*, fingerlings. J. Egypt Acad. Soc. Environ. Dev (B Aquacult), 5:67-83.
- El-Dakar, A.Y., Hassanien, G.D.I., Gad, S.S., and Sakr, S.E., 2004b. Use of medical and aromatic plants in fish diets: 2. Effect of dried basil leaves on performance of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aurochromis*, fingerlings. 3rd Inter. Conf. on Animal Production and Health in Semi-Arid Areas, Suez Canal, Egypt: Suez Canal University 5:265-277.
- Ellis, A.E., 1990. Lysozyme activity. In: Stolen TC, Fletcher PD, Anderson BS, Roberson BS, Muiswinkel WB, editors. *Technique in Fish Immunology*. New York: SOS Publications; pp.101-103.
- Fazlolahzadeh, F., Keramati, K., Nazifi, S., Shirian, S. and Seifi, S., 2011. Effect of garlic (*Allium sativum*) on hematological parameters and plasma activities of ALT and AST of Rainbow trout in temperature stress. Aust. J. Basic Appl. Sci. 5: 84-90.
- Harikrishnan, R. and C. Balasundaram, 2009. Protective effect of probiotics enriched diet and tri-herbal dip treatment on haematological and biochemical profiles of goldfish, *Carassius auratus* and common carp, *Cyprinus carpio* artificially infected with *Aeromonas hydrophila*. Exp Tox Pathol, 61: 293
- Hrubec, T.C., J.L. Cardinale. and S.A.Smith., 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). Vet Clin Pathol, 29:7-12.
- Huỳnh Bảo Tuân, Hồ Phương Hoàng, Trần Thị Cẩm, Nguyễn Ngọc Kiều Chinh, 2013. Nghiên cứu chuỗi giá trị dược liệu-cây Diệp Hạ Châu. Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ, 18 (Q2): 37-45.
- Immanuel, G., Uma, R., Palanisamy, I., Citarasu, T., Punitha, M., Babu, M. and Palavesam, A., 2009. Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromis mossambicus*. J. Fish biol.. 74: 1462-75.

- irubakaran, C.J.W., Alexander, C.P. and Michael, R.D., 2010. Enhancement of non-specific immune responses and disease resistance on oral administration of *Nyctanthes arbortristis* seed extract in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquac. Res.* 41: 1630-1639
- Kirubakaran, J., Aiya S., Parasuraman and Michael, D., 2016. Methanol extract of *Nyctanthes arbortristis* seeds enhances non-specific immune responses and protects *Oreochromis mossambicus* (Peters) against *Aeromonas hydrophila* infection. *Research in Veterinary Science.* 105: 243-248.
- Lee, J.Y. and Gao, Y., 2012. Review of the application of garlic, *Allium sativum*, in aquaculture. *J. World Aquac. Soc.*, 43: 447-458.
- Mai Thanh Thanh và Bùi Thị Bích Hằng, 2018. Ảnh hưởng của việc bổ sung tỏi (*Allium sativum*) vào thức ăn lên một số chỉ tiêu miễn dịch và khả năng kháng khuẩn của cá điêu hồng (*Oreochromis sp.*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54(2): 168-176.
- Mohammad, H.R, Iman, S., Siavash, S. and Morteza, Y., 2013. The effects of dietary *Zhumeria majdae* extract on growth indices, hematology and immunology of catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *J. Aqu. Eco.* 3(1): 19-28.
- Natt, M. P., C. A. Herrick, 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poult Sci.* 31:735 – 738.
- Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007. Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh
- Nugroho, R., Manurung, H., Saraswati, D., Ladyescha, D. and Nur, F., 2016. The effects of *Terminalia catappa* L. leaves extract on the water quality properties, survival and blood profile of ornamental fish (*Betta sp*) cultured. *Biosaintifika*, 8:241-248.
- Nya, E.J. and Austin, B. 2009. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 32: 971-977.
- Prasad, G., and Priyanka, G. L., 2011. Effect of fruit rind extract of *Garcinia gummi-gutta* on haematology and plasma biochemistry of catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Asian J. Biochem.* 6, 240–251.
- Yeganeh, S., Teimouri, M., Amirkolaie, A.K., 2015. Dietary effects of *Spirulina platensis* on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Res. Vet. Sci.*, 101: 84-88.
- Sarter, S., Kha, N.H.N., Hung, L.T., Lazard, J., Didier, M., 2007. Antibiotic resistance in Gram negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control* 18:1391-1396
- Sajid, M., Samoon, M.H., Singh, P., 2009. Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*. *Turk. J. Fish. Aquat. Sc.* 9:111-120.
- Shalaby, S.M.M., 2004. Response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fingerlings to diets supplemented with different levels of fenugreek seeds (Hulba). *J Agric Mansoura Univ.* 29: 2231-2242.
- Sivaram, V., Babu, M.M., Immanuel, G., Murugadass, S., Citarasu, T. and Marian, M.P., 2004. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquacult.* 237: 9-20.
- Smit, A.J., 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. *J. Appl. Phycol.* 16: 245-262.
- Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M. and Bolong, A.A., 2013. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 400-401: 46-52.
- Từ Thanh Dung, Freddy Haesebrouck, Nguyễn Anh Tuấn, Partrick Sorgeloos, Margo Baelc và Annemie Decostere, 2010. Hiện trạng kháng thuốc kháng sinh trên vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan, thận mũ trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng sông Cửu long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 15a: 162-171.
- Từ Thanh Dung, M.Crumlish, Nguyễn Thị Như Ngọc, Nguyễn Quốc Thịnh và Đặng Thụy MaiThy, 2004. Xác định vi khuẩn gây bệnh trắng gan trên cá tra (*Pangasius hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Chuyên ngành thủy sản.* 137-142.
- Uthayakumar, V., Senthilkumar, D., Jayakumar, R., Sreedevi, P.R., Satheeskumar, P. and Ramasubramanian, R., 2014. Effect of *Azadirachta indica* leaf soluble fraction on Immune response and disease resistance *Channa striatus* against Tropical freshwater fungal parasite *Aphanomyces invadans* (EUS). *Glob Vet* 13 (3): 355-364.
- Valsa, J.A.A. and Balasubramanian, V., 2014. Immunological students of disease induced carp *Cyprinus carpio* fed with neem extract added feed. *Department of Zoology. Ingia.* 3:124-126.