

## ĐÁNH GIÁ *IN VITRO* KHẢ NĂNG KHÁNG VI-RÚT GÂY BỆNH ĐÓM TRẮNG CỦA CÁC LOẠI CAO CHIẾT TRÊN MÔ HÌNH TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)

Bùi Thị Thanh Tịnh<sup>1\*</sup>, Trần Phạm Vũ Linh<sup>1</sup>, Trần Thị Thanh Hương<sup>1</sup>, Liêu Bảo Nam<sup>2</sup>,  
Lại Minh Tín<sup>2</sup>, Nguyễn Đăng Quân<sup>1</sup>, Ngô Huỳnh Phương Thảo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh;

<sup>2</sup>Trường Đại học Tôn Đức Thắng Thành phố Hồ Chí Minh.

\*Tác giả liên hệ: tudo\_dhnl@yahoo.com

Nhận bài: 23/05/2021 Hoàn thành phản biện: 13/08/2021 Chấp nhận bài: 17/08/2021

### TÓM TẮT

Vi-rút gây bệnh đốm trắng (WSSV) là tác nhân lây nhiễm và gây tử vong hàng loạt trên tôm nuôi nước lợ. Nghề nuôi tôm hiện nay thường sử dụng hóa chất và kháng sinh để điều trị và kiểm soát nhiều loại bệnh trong đó có bệnh đốm trắng, việc này gây nhiều trở ngại cho xuất khẩu và tiêu dùng. Có rất nhiều nghiên cứu đã cho thấy tác dụng của nhiều loại thảo dược giúp phòng trị bệnh đốm trắng trên tôm. Trong nghiên cứu này, 15 loại cao chiết thảo dược đã được đánh giá độ độc tính và khảo sát *in vitro* khả năng kháng WSSV trên mô hình tôm thẻ chân trắng bằng phương pháp tiêm. Kết quả khảo sát độ độc tính cho thấy, hầu hết các cao chiết là an toàn khi tiêm vào tôm ở nồng độ 0,25 mg/mL, trong đó 5 loại thể hiện độc tính cao, 4 loại thể hiện độc tính trung bình và 6 loại an toàn với tôm. Kết quả đánh giá *in vitro* cho thấy đưng, dà vôi, ôi, mấm trắng, cỏ mực, đước, cóc trắng và điệp hạ châu có hoạt tính kháng WSSV tốt nhất ở nồng độ khảo sát 0,0025 mg/mL. Những kết quả này tạo tiền đề cho các khảo sát *in vivo* khả năng kháng WSSV của 8 loại cao chiết thảo dược nhằm tìm ra các loại cây thảo dược tiềm năng trong phòng trị bệnh đốm trắng trên tôm.

**Từ khóa:** Vi-rút gây bệnh đốm trắng, White Spot Syndrome-WSSV, Cao chiết thảo dược, Tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*)

## IN VITRO ASSESSMENT OF THE RESISTANCE TO WHITE SPOT SYNDROME VIRUS OF HERBAL EXTRACTS ON WHITE LEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)

Bui Thi Thanh Tinh<sup>1\*</sup>, Tran Pham Vu Linh<sup>1</sup>, Tran Thi Thanh Huong<sup>1</sup>, Lieu Bao Nam<sup>2</sup>,  
Lai Minh Tin<sup>2</sup>, Nguyen Dang Quan<sup>1</sup>, Ngo Huynh Phuong Thao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Center of Ho Chi Minh City;

<sup>2</sup>Ton Duc Thang University.

### ABSTRACT

White Spot Syndrome Virus (WSSV) is a highly infectious agent and causes mass mortality in farmed shrimp. In shrimp farming nowadays, farmers often use chemicals and antibiotics to treat and control many diseases, including white spot disease, thus resulting in many obstacles for shrimp export and consumption. Many studies have shown the effects of herbs on preventing white spot disease. In this study, 15 types of herbal extracts were evaluated for their toxicity and the *in vitro* resistance to WSSV in white leg shrimp injection models. The results of the toxicity showed that all the herbal extracts were safe when being injected into shrimp at a concentration of 0.25 mg/mL. Five of the herbs were highly toxic, four had medium toxicity, and six were safe for shrimp. The *in vitro* WSSV resistance testing showed that there were eight herbal extracts (*Rhizophora mucronata*, *Cerriops tagal*, *Psidium guajava*, *Avicennia marina*, *Eclipta prostrata*, *Lumnitzera racemosa*, *Phyllanthus urinaria* and *Rhizophora apiculata*) having the highest activity against WSSV at the concentration of 0.0025 mg/mL. These initial results suggest the *in vivo* investigations on the resistance to WSSV of these eight herbal extracts to find potential herbal plants for aquaculture use, instead of antibiotics, in the prevention and treatment of white spot disease in shrimp.

**Keywords:** White Spot Syndrome Virus, WSSV, Herbal Extracts, White leg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

## 1. MỞ ĐẦU

Từ những năm đầu thập niên 90, Việt Nam đã xác định thủy sản là ngành kinh tế mũi nhọn của đất nước. Thủy sản Việt Nam đứng thứ ba thế giới về nuôi trồng, đứng thứ tư thế giới về xuất khẩu, với 165 thị trường trên thế giới. Theo Tổng cục Hải quan, kim ngạch xuất khẩu thủy sản năm 2020 đạt trên 8,4 tỷ USD, giảm 1,9% so với năm 2019. Theo Hiệp hội Chế biến và xuất khẩu thủy sản Việt Nam (VASEP), năm 2020 xuất khẩu tôm của Việt Nam ước đạt gần 3,7 tỉ USD, tăng gần 11% so với năm 2019.

Theo Chou và cs. (1995), bệnh đốm trắng xuất hiện đầu tiên tại Đài Loan vào năm 1992, sau đó lan rộng ra nhiều nước trên thế giới, bệnh do vi rút đốm trắng (WSSV) gây ra. Với khả năng lan truyền bệnh và gây chết tôm hàng loạt, bệnh đốm trắng đã gây thiệt hại lớn và gây ảnh hưởng không nhỏ đến nền công nghiệp nuôi tôm của nhiều nước trên thế giới trong đó có Việt Nam.

Giải pháp phổ biến để phòng và trị bệnh vi khuẩn và vi rút trên tôm là sử dụng kháng sinh hay hóa chất. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh và hóa chất bộc lộ nhiều bất cập như hiện tượng kháng thuốc và tồn lưu trong tôm gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến điều trị bệnh khi dịch bùng phát và phần nào hạn chế tiềm năng xuất khẩu tôm của Việt Nam. Trong thời gian gần đây, việc sử dụng thảo dược trong phòng và trị bệnh trong thủy sản đang ngày càng trở nên phổ biến. Hiện nay, đã có một số nghiên cứu trong và ngoài nước cũng cho thấy có một số loại thảo dược có hiệu quả kháng với vi rút gây bệnh đốm trắng trên tôm. Citarasu và cs. (2006) sử dụng hỗn hợp dịch ly trích từ cỏ đuôi gà (*C. dactylon*), bầu nâu *Aegle marmelos*, *Tinospora cordifolia*, *Picrorrhiza kurooa* và cỏ mực (*Eclipta alba*) trộn vào thức ăn với liều lượng 800 mg/kg và cho ăn trong 15 ngày, sau đó công độc lại với

WSSV cho thấy RPS lên đến 74% (Citarasu và cs., 2006). Cũng trong năm 2006, Balasubramania dùng Rong mơ như chất đối kháng với WSSV ở liều lượng 3 mg/tôm, cho tỷ lệ sống của tôm lên tới 60% (Balasubramania và cs., 2006). Trong khi đó, Yogeewaran (2012) dùng hỗn hợp thảo dược: Tai tượng Ấn Độ (*Acalypha indica*), Cỏ đuôi gà (*C. dactylon*), *Picrorrhiza kurrooa*, Sâm Ấn Độ và Gừng (*Zingiber officinalis*) trộn vào thức ăn với liều lượng là 2.000 mg kg<sup>-1</sup> và công cường độc lại với WSSV cho thấy RPS tới 60% (Yogeewaran và cs., 2012).

Trong nghiên cứu này, 15 loại cao chiết thảo dược được đánh giá độc tính đối với tôm và khả năng kháng WSSV *in vitro* trên mô hình tôm thẻ chân trắng bằng phương pháp tiêm.

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

15 loại thảo dược dùng (*Rhizophora mucronate*), dứa dại (*Cerriops tagal*), ôi (*Psidium guajava*), cỏ mực (*Eclipta prostrata*), diệp hạ châu (*Phyllanthus urinaria*), trầu không (*Piper betle* L), mầm trắng (*Avicennia marina*), cóc trắng (*Lumnitzera racemosa*), đước (*Rhizophora apiculata*), cỏ đuôi gà (*Cyanodon dactylon*), bạch chỉ (*Angelica dahurica*), khổ qua (*Monordica charanita*), ô rô hoa tím (*Acanthus ilicifolius*), xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), riềng (*Alpinia officinarum*) được mua tại Công ty trách nhiệm hữu hạn Tấn Phát (thành phố Hồ Chí Minh). Cao chiết được tạo ra theo phương pháp chiết ngâm của Vongsak và cs. (2013) và được bảo quản ở 4°C.

Tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) 15 ngày tuổi được chuyển từ Vũng Tàu (Việt Nam) về phòng thí nghiệm của Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Tôm nuôi thí nghiệm

được kiểm tra mầm bệnh của một số bệnh phổ biến trên tôm như bệnh đốm trắng (WSSV), bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND), bệnh hoại tử dưới vỏ và cơ quan tạo máu (IHHNV) và bệnh Taura (TSV) trước khi thả nuôi trong hệ thống lọc tuần hoàn, với mật độ thả là 1.500 con/m<sup>3</sup>. Tôm được cho ăn 4 lần/ngày với các loại thức ăn phù hợp theo từng độ tuổi. Các chỉ tiêu môi trường được theo dõi nhằm đảm bảo luôn nằm trong khoảng tiêu chuẩn cho phép như pH 7,8 - 8,0; độ mặn 10 - 20 ‰; độ kiềm 50 - 120 mg L<sup>-1</sup>; NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ~ 5 mg L<sup>-1</sup>). Khi tôm đạt trọng lượng từ 1 đến 1,5 g sẽ được sử dụng cho thử nghiệm (Vu Linh và cs., 2018).

Dịch vi rút đốm trắng được thu nhận theo phương pháp của Sudheer và cs. (2011b). Mẫu tôm bị bệnh đốm trắng được thu phần mang và phần mềm của đầu ngực, tương đương 500 mg và được đồng nhất với 1,5 mL PBS (8 g NaCl/0,2 g KCl/1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/100 ml nước vô khuẩn) bằng chày và cối trong điều kiện đá lạnh. Dịch đồng nhất trên được ly tâm bằng máy (5424R, Eppendorf, Đức) ở thông số 8200xg/4°C/20 phút, sau đó dịch nổi sau ly tâm chứa vi rút đốm trắng được lọc qua màng lọc Φ 0,22 μm (Whatman, Anh) và bảo quản ở tủ -20°C (Panasonic Healthcare, MDF-U334, Nhật Bản). Dịch vi rút đốm trắng được định lượng bằng phương pháp pha loãng với đệm PBS trước khi được tiêm vào tôm (Sudheer và cs., 2011b).

## 2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Cao thảo dược được đánh giá hoạt tính *in vitro* thông qua đánh giá tác động lên vi rút đốm trắng ở bên trong cơ thể tôm dựa theo mô hình đánh giá hoạt tính *in vitro* kháng vi rút WSSV của dịch chiết Cỏ đuôi gà của nhóm nghiên cứu Balasubramanian và cs. (2008). Vật chủ tôm lúc này được xem là công cụ để theo dõi tác động của cao thảo dược lên vi rút đốm trắng. Do đó, liều

gây chết trung bình LD<sub>50</sub> của vi rút đốm trắng trên tôm được đánh giá bằng phương pháp tiêm để từ đó xác định được liều lượng vi rút phù hợp cho các thử nghiệm liên quan đến cảm nhiễm vi rút đốm trắng. Vi rút đốm trắng ở liều LD<sub>50</sub> được trộn chung với cao thảo dược ở các nồng độ khác nhau và ủ trong 3 giờ ở 29°C, sau đó được tiêm vào tôm nhằm khảo sát *in vitro* tác động của cao thảo dược lên vi rút đốm trắng (Balasubramanian và cs., 2008).

### 2.2.1. Xác định LD<sub>50</sub> của vi rút đốm trắng bằng phương pháp tiêm

Thí nghiệm đánh giá liều gây chết trung bình LD<sub>50</sub> bao gồm 4 nghiệm thức: đối chứng âm – tôm được tiêm với PBS và 3 nghiệm thức còn lại là tôm được tiêm với dịch vi rút đốm trắng sau khi được pha loãng với PBS ở các bậc pha loãng là 1/10.000, 1/50.000, 1/250.000. Mỗi nghiệm thức gồm 5 con tôm và lặp lại 3 lần. Dịch vi rút được pha loãng trong PBS và đối chứng âm - PBS được ủ ở nhiệt độ 29°C trong 3 giờ, và sau đó 50 μL dịch được tiêm vào đốt bụng thứ 2 của tôm. Tôm được thả nuôi riêng từng con trong hũ nhựa 1L và được cho ăn đều đặn 2 lần mỗi ngày. Theo dõi triệu chứng và ghi nhận tỷ lệ chết của tôm trong thời gian 7 ngày, những mẫu tôm chết được kiểm tra sự hiện diện của vi rút đốm trắng bằng phương pháp PCR với cặp mồi W2aF (5'-CTTATCGCCGATCTTGGAAA-3') và W474inR (5'-CCGGAAATTAGTGTGTGATAG-3') với kích thước sản phẩm khuếch đại khoảng ~250 bp (Trung tâm CNSH Tp. HCM, Việt Nam).

Dựa trên tỷ lệ chết của tôm và kết quả kiểm tra PCR các mẫu tôm chết trong thí nghiệm để đánh giá liều gây chết LD<sub>50</sub> của vi rút đốm trắng bằng phương pháp tiêm.

### 2.2.2. Khảo sát độc tính của các cao loại thảo dược trên tôm thẻ chân trắng

Cao chiết thảo dược được pha loãng về nồng độ gốc 100 mg/mL trong DMSO (BioBasic, Canada) và bảo quản ở tủ 4°C. Sau đó, độc tính của các cao chiết này trên tôm thẻ chân trắng được khảo sát ở các nồng độ: 6,25; 1,25; và 0,25 mg/mL (pha loãng bằng PBS và được ủ ở 29°C trong 3 giờ) (Balasubramanian và cs., 2008). Sau đó, 50  $\mu$ L dịch pha loãng của các cao thảo dược được tiêm vào đốt bụng thứ 2 của tôm. Tôm được thả nuôi riêng từng con trong hũ nhựa 1L và được cho ăn đều đặn 2 lần mỗi ngày, mỗi nghiệm thức gồm 15 hũ nhựa/nghiệm thức. Thử nghiệm được thực hiện ở 28°C trong vòng 7 ngày, tỷ lệ chết của tôm được theo dõi và ghi nhận hàng ngày.

### 2.2.3. Đánh giá in vitro khả năng kháng vi rút đốm trắng của cao thảo dược

Hoạt tính kháng vi rút đốm trắng của cao thảo dược được khảo sát bằng phương pháp tiêm trực tiếp dịch vi rút ở liều gây chết trung bình LD<sub>50</sub> (xác định được ở mục 2.2.1) sau khi đã trộn chung với cao thảo dược ở các nồng độ pha loãng khác nhau. Sau đó, dựa vào tỷ lệ sống của tôm nhiễm vi rút đốm trắng để đánh giá hoạt tính bảo vệ tôm trước WSSV của cao thảo dược.

Thí nghiệm được bố trí gồm 5 nghiệm thức bao gồm: đối chứng âm – tôm được tiêm với PBS, đối chứng dương – tôm được tiêm với dịch vi rút đốm trắng liều gây chết LD<sub>50</sub>, ba nghiệm thức còn lại – tôm được tiêm với dịch vi rút đốm trắng (LD<sub>50</sub>) trộn với cao thảo dược ở 3 nồng độ 0,25; 0,025 và 0,0025 mg/mL và ủ ở 29°C trong 3 giờ. Sau đó, 50  $\mu$ L dịch sau phối trộn được tiêm vào đốt bụng thứ 2 của tôm, mỗi nghiệm thức gồm 5 con tôm và được lặp lại 3 lần. Tôm được thả nuôi từng con trong hũ nhựa 1L và theo dõi ở 28°C trong vòng 7 ngày. Tỷ lệ chết của tôm được ghi nhận hàng ngày. Những mẫu tôm chết được kiểm tra sự hiện diện của vi rút đốm trắng bằng phương pháp PCR với cặp mồi W2aF - W474inR với kích thước sản phẩm khuếch đại ~250 bp.

Căn cứ vào tỷ lệ sống của tôm tại các nồng độ thảo dược khác nhau, cùng với kết quả kiểm tra PCR sự hiện diện của vi rút đốm trắng trên các mẫu tôm này để đánh giá hoạt tính bảo vệ tôm trước vi rút đốm trắng của cao thảo dược.

### 2.2.4. Phương pháp xử lý thống kê

Tất cả các số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) với phân tích ANOVA một yếu tố, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được xác định thông qua giá trị  $p < 0,05$ .

## 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Tất cả các nội dung được thực hiện từ tháng 01/2019 đến tháng 12/2020 tại phòng thí nghiệm, Phòng Công nghệ Sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Xác định LD<sub>50</sub> của vi rút đốm trắng bằng phương pháp tiêm

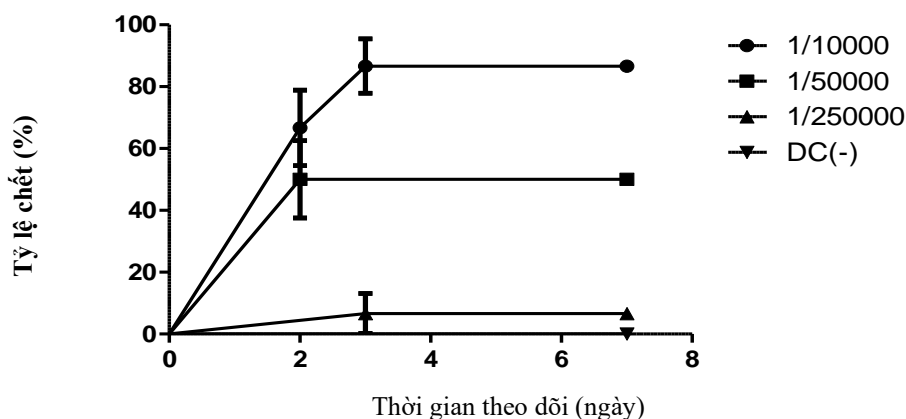
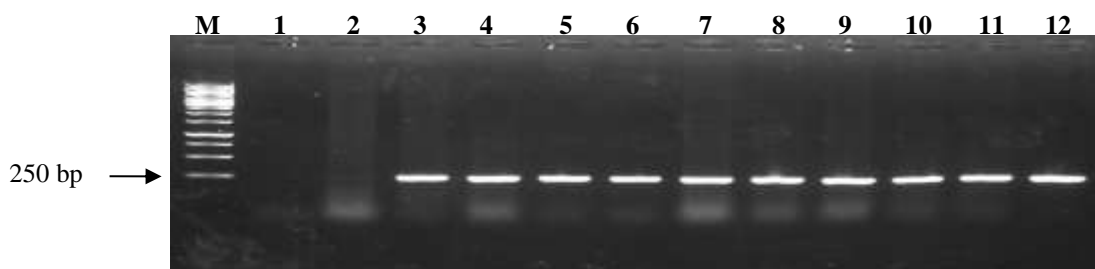
Kết quả xác định liều công độc (LD<sub>50</sub>) của vi rút đốm trắng trên tôm thẻ chân trắng bằng phương pháp tiêm cho thấy, vi rút có khả năng xâm nhiễm và gây chết tôm. Với nồng độ pha loãng 1/10.000, 1/50.000, 1/250.000, tỷ lệ tôm chết lần lượt là 86,67%; 53,33%; 6,67%. Tôm bắt đầu tập trung chết vào ngày thứ 2 sau lây nhiễm, kéo dài đến ngày thứ 3, sau đó tôm ngừng chết. Tỷ lệ chết tăng dần ở nồng độ pha loãng giảm dần thể hiện ở Bảng 1 và Hình 1 ( $p < 0,0001$ ). Tôm chết có biểu hiện rõ của bệnh đốm trắng: lơ dờ, bỏ ăn. Tôm ở nghiệm thức đối chứng âm (tiêm PBS) vẫn khỏe mạnh, bắt mồi tốt và không có dấu hiệu bệnh chết sớm. Giá trị LD<sub>50</sub> được xác định ở liều pha loãng 1/50.000.

Kết quả PCR cho thấy, tôm chết sau quá trình lây nhiễm đều dương tính với cặp mồi W2aF - W474inR theo quy trình của Trung tâm CNSH Thành phố Hồ Chí Minh (với kích thước sản phẩm PCR là 250 bp) (Hình 2).

**Bảng 1.** Tỷ lệ tôm chết (%) khi cảm nhiễm vi rút đốm trắng WSSV

Nghiem thức	1/10.000	1/50.000	1/250.000	Đ/C (-)
Tỷ lệ chết (%)	86,67 ± 11,55*** <sup>1</sup>	53,33 ± 30,55***	6,67 ± 11,55 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00

*p* < 0,0001; ns: không có ý nghĩa thống kê; Trắc nghiệm phân hạng Dunnett với đối chứng âm; <sup>1</sup>Độ lệch chuẩn; n = 15 tôm/nghiem thức

**Hình 1.** Tỷ lệ tôm chết tích lũy (%) khi được lây nhiễm bởi vi rút đốm trắng bằng phương pháp tiêm**Hình 2.** Kết quả PCR kiểm tra tôm sau lây nhiễm vi rút đốm trắng bằng phương pháp tiêm  
M. Thang DNA 100bp; Giếng 1. Chứng (-); Giếng 2: mẫu tôm sống sau khi kết thúc thí nghiệm ở đối chứng âm; Giếng 3-5: mẫu tôm chết ở độ pha loãng 1/10000; Giếng 6-10: mẫu tôm chết ở độ pha loãng 1/50.000, Giếng 11: mẫu tôm chết ở độ pha loãng 1/250.000; 12: Chứng (+)

### 3.2. Khảo sát độc tính của các cao chiết thảo dược trên tôm thẻ chân trắng

Kết quả khảo sát độc tính của các cao thảo dược ở các nồng độ 6,25; 1,25; và 0,25 mg/mL được thể hiện ở Bảng 2. Từ kết quả trên cho thấy, 5 loại thảo dược có độc tính cao với tỷ lệ gây chết cá trên 50% ở liều 6,25 mg/mL là đưng, dà vôi, ôi, cỏ mực và diệp hạ châu. 4 loại cao có độc tính trung bình với tỷ lệ gây chết cá dưới 50% ở liều

6,25 mg/mL là tràu không, mắm trắng, cóc trắng và đước. 6 loại cao thảo dược hoàn toàn an toàn với tôm ở cả 3 liều thử nghiệm là cỏ đuôi gà, bạch chỉ, khô qua, ô rô hoa tím, xuyên tâm liên và riềng. Tuy nhiên, các cao chiết thảo dược không gây chết tôm khi tiêm ở nồng độ 0,25 mg/mL. Vì vậy, liều cao thảo dược ≤0,25 mg/mL được chọn để khảo sát hoạt tính kháng vi rút đốm trắng *in vitro* của thảo dược trên mô hình tôm thẻ chân trắng.

**Bảng 2.** Tỷ lệ tôm chết (%) ở thí nghiệm khảo sát độc tính của thảo dược trên tôm

Tên thảo dược	Tỷ lệ chết (%)		
	6,25 mg/mL	1,25 mg/mL	0,25 mg/mL
Cò đuôi gà	0 ± 0,00 <sup>ns1</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>
Đung	100 ± 0,00 <sup>****</sup>	100 ± 0,00 <sup>****</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>
Dà vôi	100 ± 0,00 <sup>****</sup>	46,67±30,55 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>
Ôi	100 ± 0,00 <sup>****</sup>	53,33 ± 23,09 <sup>****</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>
Bạch chi	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>
Khổ qua	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>
Trầu không	20,00±34,64 <sup>ns</sup>	6,67±11,55 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>
Mắm trắng	13,33±11,55 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>
Cò mực	60,00±0,00 <sup>****</sup>	20,00±20,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>
Cóc trắng	46,67±11,55 <sup>**</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>
Diệp hạ châu	53,33±11,55 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>
Ô rô hoa tím	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>
Đước	26,67±11,55 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>
Xuyên tâm liên	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>
Riềng	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>	0 ± 0,00 <sup>ns</sup>
ĐC(-)	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00

$p < 0.0001$ ; ns: không có ý nghĩa thống kê Trắc nghiệm phân hạng Dunnet với đối chứng âm;

<sup>1</sup>Độ lệch chuẩn; n = 15 tôm/nghiệm thức

### 3.1.3. Đánh giá *in vitro* khả năng kháng vi rút đốm trắng WSSV

Cao thảo dược có khả năng kháng vi rút WSSV được lựa chọn trên các tiêu chí bao gồm tính an toàn đối với tôm và có hoạt tính kháng WSSV tốt nhất ở liều sử dụng thấp nhất. Nồng độ 0,25 mg/mL là liều cao nhất được chọn để khảo sát hoạt tính của các cao thảo dược kháng với vi rút WSSV trên tôm thẻ chân trắng. Sau đó, những cao có hoạt tính kháng vi rút được tiếp tục khảo sát ở nồng độ pha loãng thấp hơn 10 lần để chọn ra những cao chiết có nồng độ sử dụng thấp nhất nhưng vẫn duy trì được hoạt tính kháng cao.

Kết quả khảo sát hoạt tính của các cao thảo dược kháng vi rút đốm trắng WSSV ở nồng độ 0,25 mg/mL (Bảng 3) cho thấy, chỉ có cao Bạch chi không có khả năng kháng với vi rút đốm trắng WSSV trong khi các cao còn lại đều có hiệu quả bảo vệ tôm trước WSSV. Do đó, chỉ có 14/15 loại cao thảo dược được khảo sát tiếp hoạt tính kháng WSSV ở liều pha loãng thấp hơn 10 lần (0,025 mg/mL). Ở nồng độ 0,025 mg/mL, cò đuôi gà, khổ qua, ô rô hoa tím, xuyên tâm liên và riềng không có khả năng kháng với vi rút WSSV trong khi 9 loại cao còn lại có hoạt tính kháng WSSV. Tương

tự, ở nồng độ 0,0025 mg/mL, 8/9 loại cao thảo dược (trừ trầu không) có khả năng kháng với vi rút WSSV (Bảng 3).

Kết quả này cũng tương tự với kết quả nhóm nghiên cứu của Balasubramanian và cs. (2008), ở nhóm tiêm hỗn hợp dịch chiết thảo dược cò đuôi gà và vi rút đốm trắng vào tôm sú cho thấy, tôm hoàn toàn không chết cho đến khi kết thúc thí nghiệm trong khi ở nhóm chỉ tiêm dịch vi rút đốm trắng, tôm chết sau 48h tiêm với các dấu hiệu lơ đờ, kém ăn, hơi đỏ ở mặt lưng và xuất hiện các đốm trắng ở vùng đầu ngực. Dịch chiết kháng vi rút này chứng tỏ có hoạt tính kháng mạnh đối với WSSV ở nồng độ 2 mg trên tôm với tỷ lệ sống 100%. Một nghiên cứu khác về hoạt tính *in vitro* kháng vi rút WSSV của cao chiết cây Bông bông quý (*Calotropis procera*) của nhóm nghiên cứu Velmurugan và cs. (2012) trên tôm sú cho thấy, dịch chiết ethyl axetate của cây này trộn với WSSV đã không thể nhân lên trong hệ thống *in vivo* của tôm sú. Tất cả tôm ở nhóm đối chứng chỉ tiêm với dịch vi rút không thể sống sót sau 5 ngày trong khi nhóm tiêm với dịch chiết từ cây này ủ với dịch vi rút có tỷ lệ sống 80%.

Nghiên cứu về hoạt tính kháng vi rút đốm trắng WSSV của nhóm Sudheer và cs.

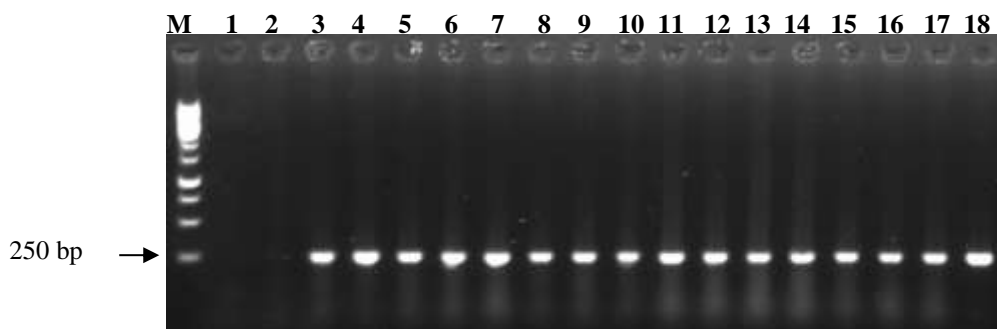
(2011) khi sàng lọc hoạt tính của 7 loài cây được tại Ấn Độ, cũng cho thấy cây dã vôi có hoạt tính kháng vi rút cao nhất. Bên cạnh đó, Citarasu và cs. (2006) sử dụng hỗn hợp dịch ly trích từ cỏ đuôi gà (*C. dactylon*), Bàu nâu (*Aegle marmelos*), (*Tinospora cordifolia*), (*Picrorhiza kurooa*) và cỏ mực (*Eclipta alba*) trộn vào thức ăn với liều lượng 800 mg/kg và cho ăn trong 15 ngày, sau đó công độc lại với WSSV cho thấy RPS lên đến 74%.

Kết quả PCR cho thấy, tôm chết sau thử nghiệm đều dương tính với cặp mồi W2aF - W474inR (theo quy trình của Trung tâm CNSH Thành phố Hồ Chí Minh) với kích thước sản phẩm PCR là 250 bp (Hình 3). Trong khi đó, kiểm tra PCR trên tôm sống sót sau thử nghiệm đều âm tính hoặc một số cho kết quả dương tính với cặp mồi W2aF - W474inR (Hình 4). Điều này chứng tỏ, cao thảo dược có khả năng ức chế và tiêu diệt vi rút WSSV.

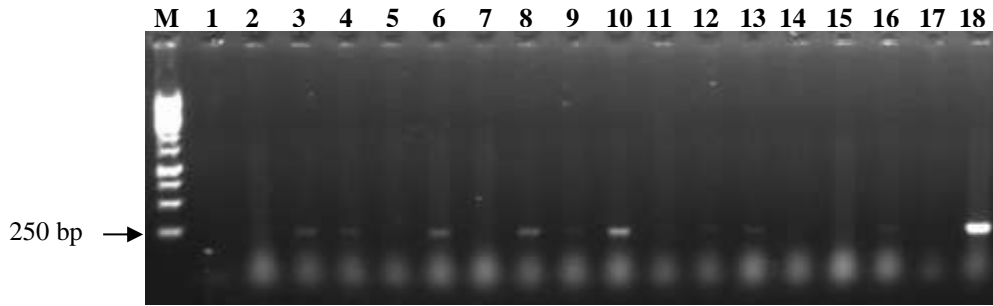
**Bảng 3.** Tỷ lệ tôm chết (%) ở thí nghiệm khảo sát hoạt tính của các cao thảo dược kháng vi rút WSSV trên tôm

Tên thảo dược	Tỷ lệ chết (%)		
	0,25 mg/mL	0,025 mg/mL	0,0025 mg/mL
Cỏ đuôi gà	0 ± 0,00 <sup>***1</sup>	86,67 ± 11,55 <sup>ns</sup>	-
Đung	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>**</sup>
Dã vôi	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	6,667 ± 11,55 <sup>*</sup>
Ồi	20,00 ± 20,00 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	6,667 ± 11,55 <sup>*</sup>
Bạch chỉ	100 ± 0,00 <sup>ns</sup>	-	-
Khô qua	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	100 ± 0,00 <sup>ns</sup>	-
Trầu không	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	60 ± 0,00 <sup>ns</sup>
Mắm trắng	6,667 ± 11,55 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>**</sup>
Cỏ mực	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>**</sup>
Cóc trắng	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	6,667 ± 11,55 <sup>***</sup>	6,667 ± 11,55 <sup>*</sup>
Diệp hạ châu	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	6,667 ± 11,55 <sup>*</sup>
Ô rô hoa tím	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	73,33 ± 30,55 <sup>ns</sup>	-
Đước	6,667 ± 11,55 <sup>***</sup>	6,667 ± 11,55 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>**</sup>
Xuyên tâm liên	13,33 ± 23,09 <sup>***</sup>	93,33 ± 11,55 <sup>ns</sup>	-
Riềng	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	73,33 ± 11,55 <sup>ns</sup>	-
ĐC(+)	100 ± 0,00	100 ± 0,00	53,33 ± 41,63
ĐC(-)	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>***</sup>	0 ± 0,00 <sup>**</sup>

$p < 0,0001$ ; Thử nghiệm phân hạng Tukey với đối chứng dương;  
<sup>1</sup>Độ lệch chuẩn;  $n = 15$  tôm/nghiệm thức; - : không khảo sát



**Hình 3.** Kết quả PCR kiểm tra tôm chết sau thử nghiệm đánh giá hoạt tính kháng vi rút WSSV. M. Thang DNA 100bp; Giếng 1. Chứng (-); Giếng 2: mẫu tôm chết ở đối chứng âm; Giếng 3– 17: Mẫu tôm chết ngẫu nhiên ở các nghiệm thức sau khi cảm nhiễm với vi rút WSSV; 18. Chứng (+)



**Hình 4.** Kết quả PCR kiểm tra tôm sống sau thử nghiệm đánh giá hoạt tính kháng vi rút WSSV *M. Thang DNA 100bp*; Giếng 1. Chứng (-); Giếng 2 – 17: Mẫu tôm sống ngẫu nhiên ở các nghiệm thức sau khi cảm nhiễm với vi rút WSSV; 18. Chứng (+)

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã khảo sát độc tính của 15 loại cao chiết thảo dược có tiềm năng kháng vi rút đốm trắng. Kết quả cho thấy, có 5 loại cao có độc tính cao trên tôm (đưng, dà vôi, ổi, cỏ mực, diệp hạ châu), 4 loại độc tính trung bình (trầu không, mắm trắng, cóc trắng, đước) và có 6 loại độc tính thấp (cỏ đuôi gà, bạch chỉ, khổ qua, ô rô hoa tím, xuyên tâm liên, riềng).

Trong 15 loại cao chiết khảo sát, có 8 loại cao (đưng, dà vôi, ổi, mắm trắng, cỏ mực, cóc trắng, diệp hạ châu, đước) có khả năng kháng *in vitro* mạnh với vi rút đốm trắng ở nồng độ 0,0025 mg/mL trên mô hình tôm thẻ chân trắng, trong khi 7 loại cao còn lại không kháng hoặc kháng yếu với vi rút WSSV.

#### LỜI CẢM ƠN

Kết quả nghiên cứu này thuộc nội dung của đề tài khoa học và công nghệ cấp cơ sở “Khảo sát một số thảo dược kháng *Vibrio parahaemolyticus* và *White spot syndrome* vi rút trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) do Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh chủ trì thực hiện.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

##### 1. Tài liệu tiếng Việt

Trần Phạm Vũ Linh, Mai Thu Thảo và Nguyễn

Quốc Bình. (2018.). Đánh giá khả năng kháng vi rút đốm trắng của chủng *Vibrio harveyi* đột biến chứa DNA vector mang gen mã hóa protein vỏ Vp28 trên đối tượng tôm thẻ chân trắng. *Khoa Học Công Nghệ Nông Nghiệp Việt Nam*, 57–61.

##### 2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Balasubramanian, G., Sudhakaran, R., Syed Musthaq, S., Sarathi, M., & Sahul Hameed, A. S. (2006). Studies on the inactivation of white spot syndrome virus of shrimp by physical and chemical treatments, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models. *Journal of Fish Diseases*, 29(9), 569–572

Balasubramanian, G., Sarathi, M., Venkatesan, C., Thomas, J., Famed, A.S. (2008). Studies on the immunomodulatory effect of extract of *Cyanodon dactylon* in shrimp, *Penaeus monodon*, and its efficacy to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). *Fish & Shellfish Immunology*, 25(6), 820–828

Chou, H.Y., Huang, C.Y., Wang, C.H., Chiang H.C. (1995). Pathogenicity of a baculovirus infection causing White Spot Syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*. 23(3), 165-173

Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Rout, N., & Murugan, V. (2006). Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. *Fish and Shellfish Immunology*, 21(4), 372–384.



- Sudheer, N. S., Philip, R., & Singh, I. S. B. (2011). *In vivo* screening of mangrove plants for anti WSSV activity in *Penaeus monodon*, and evaluation of *Ceriops tagal* as a potential source of antiviral molecules. *Aquaculture*, 311(1–4), 36–41.
- Velmurugan, S., Viji, V.T., Babu, M.M., Punitha, M.J., Citarasu, T. (2012). Antimicrobial effect of *Calotropis procera* active principles against aquatic microbial pathogens isolated from shrimp and fishes. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedecine*, 2(2), 812-817
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44, 566–571.
- Yogeeswaran, A., Velmurugan, S., Punitha, S.M., Babu, M.M., Selvaraj, T., Kumaran, T., Citarasu, T. (2012). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by inactivated vaccine and herbal immunostimulants. *Fish Shellfish Immunol*, 32(6), 1058-67.