

Đánh giá đáp ứng miễn dịch của các gia đình cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) kháng bệnh gan thận mù và xác định các chỉ thị miễn dịch phục vụ chọn giống

Trần Thị Phương Dung^{1,2*}, Nguyễn Văn Sáng³, Võ Hồng Phụng³,
Trần Hữu Phúc³, Huỳnh Thị Trúc Quân², Nguyễn Hữu Thịnh²

¹Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh, 280 An Dương Vương, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2, 116 Nguyễn Đình Chiểu, phường Đa Kao, quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 6/9/2021; ngày chuyển phản biện 9/9/2021; ngày nhận phản biện 11/10/2021; ngày chấp nhận đăng 15/10/2021

Tóm tắt:

Chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch bao gồm tổng hồng cầu (THC), tổng bạch cầu (TBC), số lượng bạch cầu trung tính (NEU), đơn nhân (MONO), lympho (LYM), trung tâm đại thực bào (TTĐTB) trong mô gan, thận, lách và hiệu giá kháng thể (HGKT) kháng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* của 2 nhóm gia đình cá tra chọn giống kháng bệnh gan thận mù cao (KBC) và thấp (KBT) được đánh giá trong nghiên cứu này. Các mẫu cá được thu tại 5 thời điểm: trước thời điểm cảm nhiễm, 24, 48, 264 và 312 giờ sau cảm nhiễm (hpi). Khả năng đáp ứng miễn dịch của nhóm KBC hiệu quả hơn KBT thể hiện qua các chỉ tiêu: (1) Số lượng THC giảm ít hơn trong các giai đoạn cảm nhiễm; (2) Số lượng các TBC, NEU, MONO, LYM tăng nhanh hơn, đặc biệt trong giai đoạn 24-48 hpi; (3) Số lượng TTĐTB ở gan, thận, lách nhóm KBC tăng nhanh đến 48 hpi, trong khi nhóm KBT tăng chậm hơn và chỉ tăng đến giai đoạn 24 hpi; (4) HGKT cao hơn trong tất cả giai đoạn cảm nhiễm. Nghiên cứu đã phát triển mô hình hồi quy logistic đa biến với các chỉ thị miễn dịch là NEU, HGKT và TTĐTB ở gan tại giai đoạn 24-48 hpi nhằm xác định cá thể kháng bệnh gan thận mù với độ nhạy và đặc hiệu lần lượt là 91,7 và 95,0%.

Từ khóa: cá tra, chọn giống, đáp ứng miễn dịch, *Edwardsiella ictaluri*, kháng bệnh.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Đặt vấn đề

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là một trong những loài cá da trơn nước ngọt có giá trị kinh tế cao được nuôi phổ biến ở Đồng bằng sông Cửu Long. Theo báo cáo của Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam (VASEP), sản lượng nuôi trồng cá tra đạt 1,56 triệu tấn và giá trị xuất khẩu đạt 1,5 tỷ USD trong năm 2020 [1]. Tuy nhiên, một trong những khó khăn của nghề nuôi cá tra hiện nay là dịch bệnh gan thận mù bùng phát hầu như ở mọi kích cỡ cá và nhiều nhất ở cá nuôi dưới 4 tháng tuổi. Các phương pháp phòng và trị bệnh trên cơ sở tăng khả năng kháng bệnh tự nhiên và chọn giống cá kháng bệnh hiện nay là một trong các giải pháp phù hợp cho hướng phát triển bền vững các đối tượng cá nuôi thông qua tăng tỷ lệ sống [2, 3]. Chọn giống kháng bệnh có thể cải thiện được khả năng đáp ứng miễn dịch tự nhiên của cá [3]. Chương trình chọn giống kháng bệnh gan thận mù trên cá tra tại Việt Nam đã được nghiên cứu [4]. Trong đó, tính trạng sống/chết khi kết thúc mô hình gây bệnh thực nghiệm là một trong những tiêu chí để xác định mức độ kháng bệnh. Bên cạnh tính trạng sống/chết, một số nghiên cứu đã cho thấy một số yếu tố chỉ thị đáp ứng miễn dịch như nồng độ ceruloplasmin trong huyết thanh cá chép rohu, lysozyme và cortisol trên cá hồi vân là những tính trạng hữu ích phục vụ chọn giống kháng bệnh [5, 6]. Tuy nhiên, các tính trạng miễn dịch để phục vụ chọn giống cần được xem xét mức độ tương quan với khả năng kháng bệnh, để đo lường trên số lượng lớn các gia đình và chi phí thấp [7].

Hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh gan thận mù ở quần thể cá tra chọn giống thế hệ thứ nhất (G1) trong quá trình cảm nhiễm đối với vi khuẩn *E. ictaluri* đã được công bố [8]. Tuy nhiên, sự khác biệt trong đáp ứng miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu giữa các gia đình cá tra kháng bệnh chưa được đề cập. Nghiên cứu này có mục đích đánh giá sự khác biệt về đáp ứng miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu thông qua so sánh về số lượng THC, TBC, NEU, MONO, TTĐTB ở mô gan, thận, lách, HGKT kháng *E. ictaluri* của 2 nhóm gia đình cá tra chọn giống G1. Qua đó, nghiên cứu phát triển các chỉ thị miễn dịch để xác định cá thể thuộc các nhóm kháng bệnh cao hay thấp nhằm kết hợp với tỷ lệ sống/chết trong quá trình cảm nhiễm giúp chọn giống có hiệu quả hơn.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Cá thí nghiệm và chủng vi khuẩn dùng cảm nhiễm

Cá tra G1 được sử dụng trong nghiên cứu là quần đàn cá tra chọn giống kháng bệnh gan thận mù thế hệ thứ nhất được thành lập trong đề tài “Ứng dụng công nghệ sinh học chọn giống cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) kháng bệnh gan thận mù” giai đoạn 2019-2020 tại Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2. Chủng vi khuẩn dùng cho các thí nghiệm cảm nhiễm là *E. ictaluri* Gly09M phân lập từ cá tra bệnh gan thận mù nuôi tại tỉnh An Giang năm 2009.

*Tác giả liên hệ: Email: dungttp@hcmue.edu.vn

Evaluation of the immune responses against enteric septicemia and determination of immune markers for selective breeding of pangasius families (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Thi Phuong Dung Tran^{1,2*}, Van Sang Nguyen³,
Hong Phuong Vo³, Huu Phuc Tran³,
Thi Truc Quan Huynh², Huu Thinh Nguyen²

¹Ho Chi Minh City University of Education,
280 An Duong Vuong Street, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Nong Lam University - Ho Chi Minh City,
Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Research Institute for Aquaculture No.2,
116 Nguyen Dinh Chieu Street, Da Kao Ward, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 6 September 2021; revised 11 October 2021; accepted 15 October 2021

Abstract:

The immune response of two groups of selective breeding pangasius families: susceptible (or sensitive) (S) and resistant (R) family groups, including red blood cell count (RBC count), white blood cell count (WBC count), neutrophil (NEU), monocyte (MONO), lymphocyte (LYM), and melano-macrophage centers (MMCs) count in liver, kidney and spleen tissue and antibody titers (ABT) against the bacteria *Edwardsiella ictaluri* were evaluated in this research. Fish were sampled at five truncated points after infection with the bacteria *Edwardsiella ictaluri* including before the challenge, 24, 48, 264, and 312 hpi. The immune response of the R group was more effective than that of the S group, showing: (1) RBC decreased less during the challenge; (2) WBC, NEU, MONO, LYM increased more rapidly, especially at the truncated point 24-48 hpi; (3) MMCs in liver, kidney, and spleen of the R group increased faster up to the truncated point 48 hpi while the S group increased more slowly and only up to the truncated point 24 hpi; (4) ABT were higher in all stages of the challenge. The research developed a multivariable logistic regression model with immune markers such as NEU, ABT and MMCs in the liver at the truncated point of 24-48 hpi to identify individuals which were resistant to Enteric Septicemia of Catfish (ESC), with sensitivity and specificity of 91.7, 95.0%, respectively.

Keywords: disease resistance, *Edwardsiella ictaluri*, immune response, *Pangasianodon hypophthalmus*, selection.

Classification number: 4.5

2.2. Thí nghiệm cảm nhiễm *E. ictaluri* 2 nhóm gia đình cá tra KBC và KBT

Hai nhóm gia đình cá tra kháng bệnh cao và thấp, gồm 3 gia đình kháng bệnh cao (giá trị EBV tại giai đoạn cá hương, cá giống lần lượt là 0,18, 0,03, -0,05 và 0,07, 0,05, 0,06) và 3 gia đình kháng bệnh thấp (giá trị EBV tại giai đoạn cá hương, cá giống lần lượt là -0,24, -0,26, 0,04 và -0,05, 0,03, -0,03) từ kết quả nghiên cứu của T.T.P. Dung và cs (2021) [9] được sử dụng để phục vụ trong nghiên cứu này. Sau khi xác định và lựa chọn được 2 nhóm cá kháng bệnh, tiến hành đưa các cá thể cá giống của các gia đình này (30 cá thể/gia đình) đến phòng thí nghiệm để thực hiện thí nghiệm nhằm thu thập các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch.

Thí nghiệm cảm nhiễm gia đình cá giống G1: 6 gia đình cá giống G1 có khối lượng trung bình là 25 g được bố trí cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* trong bể nhựa (70×30×30 cm), thể tích nước khi tiến hành thí nghiệm là 25 l theo phương pháp Cohabitant [9]. Tổng 119 cá thể (58 cá thể thuộc gia đình KBC và 61 cá thể thuộc gia đình KBT) được thu mẫu để phân tích qua các thời điểm: ngay trước khi cảm nhiễm, 24, 48, 264 và 312 hpi, 1.547 mẫu (THC, TBC, MONO, NEU, LYM, TTĐTB gan, thận và lách), bao gồm 793 mẫu của cá thuộc nhóm gia đình KBC và 754 mẫu cá thuộc nhóm gia đình KBT.

Phương pháp phân tích các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch: phương pháp xác định THC được tiến hành theo N.T.T. Lieu và cs (2011) [10], TBC và số lượng từng loại bạch cầu được tiến hành theo C.T. Hrubec và cs (2000) [11], HGKT trong huyết thanh được tiến hành theo phương pháp của M. Thrusfield và cs (2018) [12] và số lượng TTĐTB ở trên mẫu mô gan, thận và lách được xác định theo K.L. Camp và cs (2000) [3].

Sơ sánh đáp ứng miễn dịch 2 nhóm gia đình cá tra G1 và phát triển chỉ thị miễn dịch xác định khả năng kháng bệnh

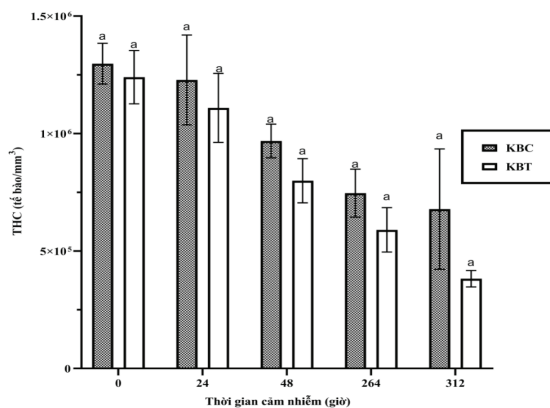
Số liệu chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch của 2 nhóm gia đình KBC và KBT tại mỗi thời điểm được kiểm tra xác suất của phân phối chuẩn bằng thử nghiệm Skewness và Kurtosis. Kiểm định trung bình t-test 2 nhóm độc lập được sử dụng để so sánh giá trị trung bình của các biến (các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch) tại mỗi thời điểm giữa 2 nhóm. Số liệu được trình bày dưới dạng Mean ± SE. Phân tích sự khác biệt về các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch giữa 2 nhóm gia đình kháng bệnh được thực hiện trên SPSS kiểm định sai khác có ý nghĩa ở xác suất $p < 0,05$. Mô hình dự đoán cho việc phân biệt khả năng kháng bệnh được thiết lập từ các số liệu chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch của 2 nhóm cá. Số liệu mã hóa của cá thuộc gia đình KBC và KBT là 1 và 0. Số liệu chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch tại các thời điểm thu mẫu máu đều là biến liên tục. Xác suất (%) liên quan đến việc xác định các cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT được mô phỏng bằng mô hình hồi quy logistic Bayes đa biến với các tính trạng miễn dịch thực hiện trên R 3.5.2 [13]. Phân tích hồi quy logistic đơn biến và đa biến được sử dụng để xác định các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch có ý nghĩa trong việc xác định cá thể thuộc

gia đình KBC hay KBT. Mô hình hồi quy được kiểm định với giá trị AIC (Akaike information criterion), Pseudo R^2 , tính đa cộng tuyến qua hệ số VIF (Variance inflation factor). Ngoài ra, tỷ số ODD (xác suất xác định được cá thể KBC/xác suất xác định được cá thể KBT) của các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch cũng được tính toán trong mô hình. Đánh giá các giá trị để xác định hiệu quả của mô hình phân biệt cá thể thuộc gia đình KBC hay KBT tối ưu bao gồm: (1) Độ nhạy (Sen - xác suất phân biệt được cá KBC chính xác); (2) Độ đặc hiệu (Spe - xác suất phân biệt được cá KBT chính xác); (3) Biểu đồ ROC có trục tung (y) là độ nhạy và trục hoành (x) là tỷ lệ KBC là giả khi xét nghiệm chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch lại cho kết quả là KBC (1 trừ cho độ đặc hiệu). Diện tích dưới đường biểu diễn ROC (đường nối giữa các điểm có độ nhạy và độ đặc hiệu) gọi là AUC. Mô hình có giá trị AUC cao có thể xác định cá thể thuộc gia đình KBC hay KBT tốt; (4) Giá trị ngưỡng phân biệt tối ưu là ngưỡng giá trị miễn dịch có độ nhạy và độ đặc hiệu cao nhất. Các mô hình và phân tích mô hình thực hiện trên STATA 14.0 [14].

3. Kết quả và bàn luận

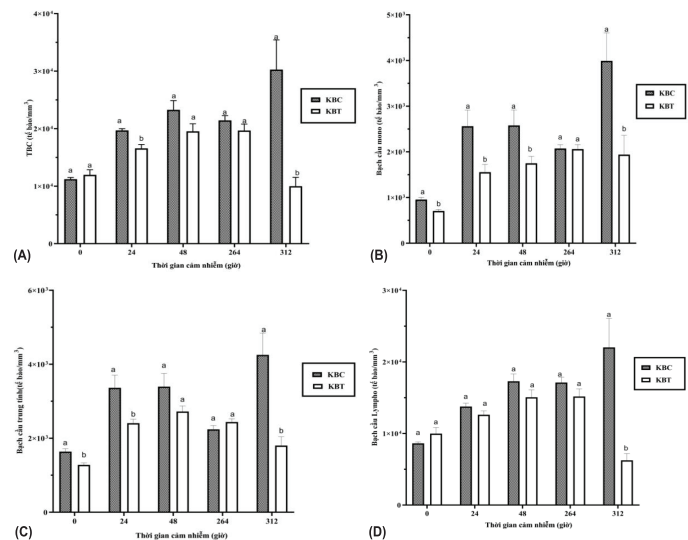
3.1. Kết quả đáp ứng miễn dịch của các gia đình KBC và KBT

Số lượng THC của cả 2 nhóm KBC và KBT đều có xu hướng giảm dần từ trước cảm nhiễm đến 312 hpi được thể hiện ở hình 1. Tuy nhiên, THC nhóm cá KBT giảm nhiều hơn KBC (nhóm KBT giảm nhiều tại 48 hpi, trong khi KBC chỉ giảm nhiều tại 264 hpi). THC nhóm KBC luôn cao hơn KBT tại tất cả các giai đoạn cảm nhiễm nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).



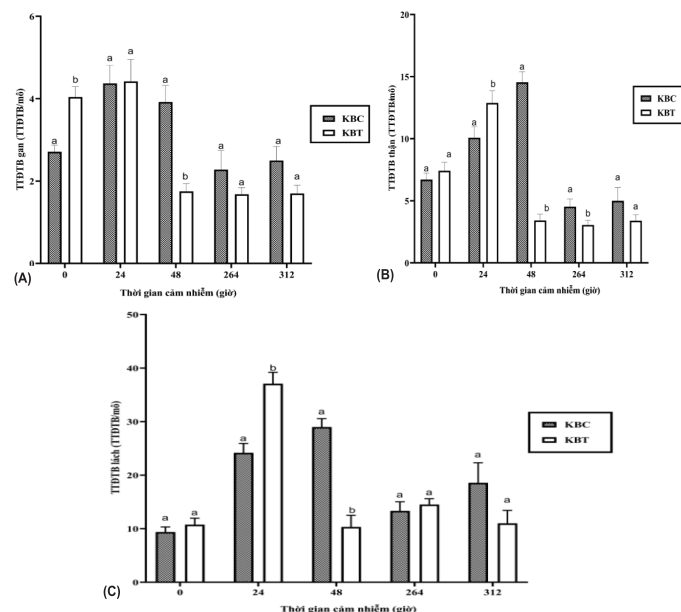
Hình 1. So sánh THC và các loại bạch cầu sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* của 2 nhóm gia đình cá tra KBC và KBT.

Số lượng TBC, NEU, MONO, LYM của 2 nhóm KBC và KBT có xu hướng tăng từ trước cảm nhiễm đến 48 hpi (hình 2), Cụ thể nhóm KBC lần lượt từ $1,1 \times 10^4$, $1,6 \times 10^3$, $0,9 \times 10^3$, $8,6 \times 10^3$ tế bào/mm³ tăng lên $2,3 \times 10^4$, $3,4 \times 10^3$, $0,6 \times 10^3$, $17,3 \times 10^3$ tế bào/mm³ và nhóm KBT tăng lần lượt từ $1,2 \times 10^3$, $1,3 \times 10^3$, $0,7 \times 10^3$, $9,9 \times 10^3$ tế bào/mm³ lên $1,9 \times 10^4$, $2,7 \times 10^3$, $1,7 \times 10^3$, $15,1 \times 10^3$ tế bào/mm³. Tuy nhiên, TBC, MONO, NEU, LYM của nhóm KBC luôn cao hơn nhóm KBT tại tất cả các giai đoạn cảm nhiễm, đặc biệt, TBC, MONO, NEU của nhóm KBC cao hơn có ý nghĩa thống kê so với KBT tại 24 và 312 hpi ($p<0,05$).



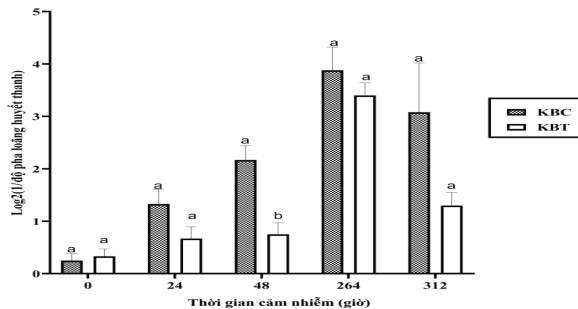
Hình 2. So sánh TBC và các loại bạch cầu sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* của 2 nhóm gia đình cá tra KBC và KBT. (A) Số lượng TBC; (B) các loại MONO; (C) NEU; (D) LYM.

Số lượng TTĐTB ở gan, thận và lách nhóm KBC thấp hơn nhóm KBT từ trước cảm nhiễm đến 24 hpi, nhưng từ giai đoạn 48-312 hpi thì TTĐTB ở gan, thận và lách nhóm KBC luôn cao hơn KBT (hình 3). Nguyên nhân do TTĐTB của nhóm KBC ở gan, thận và lách tăng cao từ trước cảm nhiễm đến giai đoạn sau 48 hpi (lần lượt từ 2,7, 6,7, 9,4 tăng lên 3,9, 14,5 và 29,0 TTĐTB/mô, riêng tại TTĐTB ở gan tăng cao đến 4,4 TTĐTB/mô tại 24 hpi), sau đó giảm, nhưng nhóm KBT tăng ít số lượng TTĐTB ở gan, thận, lách hơn nhóm KBC và chỉ tăng đến giai đoạn sau 24 hpi (lần lượt từ 4,0, 7,4, 10,8 trước cảm nhiễm tăng lên 4,42, 12,5, 37,1 TTĐTB/mô) và sau đó cũng giảm.



Hình 3. So sánh số lượng TTĐTB sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* của 2 nhóm gia đình cá tra KBC và KBT. (A) Số lượng đại thực bào ở gan; (B) Thận và (C) Lách.

HGKT của huyết thanh cá thuộc 2 nhóm KBC, KBT có xu hướng tăng nhanh từ trước cảm nhiễm đến giai đoạn 264 hpi, sau đó giảm tại thời điểm 312 hpi được thể hiện ở hình 4. Tuy nhiên, HGKT nhóm KBC luôn cao hơn KBT trong toàn bộ quá trình cảm nhiễm, đặc biệt sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại thời điểm 48 hpi ($p < 0,05$).



Hình 4. So sánh HGKT sau khi cảm nhiễm *E. ictaluri* của 2 nhóm gia đình cá tra KBC và KBT.

Nhìn chung, đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và đặc hiệu của cá thuộc các gia đình KBC và KBT trong quá trình cảm nhiễm có các đặc điểm giống nhau bao gồm: (1) Sự sụt giảm số lượng THC do vi khuẩn xâm nhập vào tế bào hồng cầu làm một số lượng lớn các tế bào hồng cầu bị vỡ, dẫn đến giảm khả năng vận chuyển oxy của tế bào hồng cầu, thiếu oxy tế bào ở mô, giảm chuyển hóa vật chất [15]; (2) Các loại bạch cầu của 2 nhóm gia đình cá có xu hướng tăng qua các thời điểm cảm nhiễm nhằm chống lại sự xâm nhiễm của vi khuẩn [16]. Bạch cầu NEU và MONO tăng đáng kể, đặc biệt trong giai đoạn đầu đáp ứng miễn dịch quá trình viêm nhằm tạo ra phản ứng phòng vệ khẩn cấp cho cơ thể cá [15], tham gia vào quá trình xử lý và trình diện kháng nguyên tạo ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu của cơ thể [17, 18]; (3) Sự tăng số lượng TTĐTB trong quá trình cảm nhiễm của cá thuộc 2 nhóm gia đình kháng bệnh nhằm diệt khuẩn trong phản ứng viêm hệ thống và đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu [19]; (4) HGKT tăng ở các gia đình KBC và KBT trong quá trình cảm nhiễm nhằm tiêu diệt vi khuẩn [7]. Tuy nhiên, đáp ứng miễn dịch nhóm KBC có hiệu quả hơn KBT trong quá trình cảm nhiễm, đặc biệt ở giai đoạn đầu 24-48 hpi: (1) Số lượng hồng cầu nhóm KBC giảm ít hơn KBT; (2) Số lượng TBC, NEU, MONO, LYM của nhóm KBC tăng nhiều hơn KBT; (3) TTĐTB ở gan, thận và lách nhóm KBC cao hơn KBT; (4) HGKT nhóm KBC cao hơn KBT trong các giai đoạn cảm nhiễm. Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của K.L. Camp và cs (2000) [3], điều này cho thấy sự khác biệt trong đáp ứng miễn dịch (đặc biệt bạch cầu LYM T, TTĐTB chủ yếu ở lách và thận) của nhóm gia đình cá da trơn (*Ictalurus punctatus*) kháng bệnh cao hơn so với các gia đình mẫn cảm với vi khuẩn *E. ictaluri* trong giai đoạn 3-14 ngày cảm nhiễm. Ngoài ra, nghiên cứu của E.B. Flemming và cs (2009) [20] cho thấy, giai đoạn 48-72 giờ sau cảm nhiễm rất quan trọng trong mô hình để đánh giá hiệu quả của đáp ứng miễn dịch tự nhiên của cá nheo Mỹ thông qua tăng phản ứng của các tế bào đáp ứng miễn dịch bẩm sinh, ức chế sự phát triển của vi khuẩn và cảm ứng phản ứng giai đoạn đáp ứng cấp tính tiếp theo. Kết quả tương đồng với nghiên cứu này cho thấy,

giai đoạn đầu cảm nhiễm 48 hpi có vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch của cá. Do đó, các gia đình nhóm KBT có đáp ứng miễn dịch kém hiệu quả hơn KBC giai đoạn đầu cảm nhiễm có thể là một nguyên nhân dẫn đến số lượng cá chết ở nhóm KBT nhiều hơn KBC trong quá trình cảm nhiễm.

3.2. Xác suất liên quan đến việc xác định cá thể kháng bệnh qua các giai đoạn cảm nhiễm của các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch

Các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch đều có thể xác định được các cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT tại tất cả thời điểm trong quá trình cảm nhiễm với xác suất liên quan $\geq 4,80\%$ được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Xác suất (%) các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch xác định được cá thể thuộc gia đình KBC hay KBT.

Chỉ tiêu	Đơn vị	24-48 hpi	264-312 hpi	24-312 hpi
THC	10^3 tế bào/mm ³	11,2	26,5	12,4
TBC	10^4 tế bào/mm ³	19,5	41,3	23,7
NEU	10^3 tế bào/mm ³	88,6	9,1	25,3
MONO	10^3 tế bào/mm ³	11	15,3	69,1
LYM	10^3 tế bào/mm ³	17,9	39,2	18,1
HGKT	Độ pha loãng huyết thanh	100	19	100
TTĐTB ở gan	TTĐTB/mô	100	22,2	63,1
TTĐTB ở thận	TTĐTB/mô	4,8	63	95,1
TTĐTB ở lách	TTĐTB/mô	12,3	5,8	41,8

Các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch liên quan nhất giúp xác định các cá thể KBC hay KBT trong giai đoạn 24-48 hpi là NEU, HGKT và TTĐTB ở gan với xác suất lần lượt là 88,6, 100, 100%; trong giai đoạn 264-312 hpi là TTĐTB ở thận, LYM và TBC với xác suất lần lượt là 63, 39,2 và 41,3%. Tuy nhiên, trong toàn bộ giai đoạn cảm nhiễm các yếu tố có ý nghĩa trong việc phân biệt các cá thể kháng bệnh là MONO, HGKT và TTĐTB ở thận.

3.3. Phát triển mô hình xác định khả năng kháng bệnh

Phân tích hồi quy logistic đơn biến cho thấy, chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch như TBC, NEU và LYM, HGKT, TTĐTB ở gan và thận có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) trong việc xác định được cá thể KBC hay KBT tại các thời điểm trong quá trình cảm nhiễm. Phân tích hồi quy logistic đa biến, thông qua việc đánh giá giá trị AIC nhỏ nhất, Pseudo R^2 cao nhất cho thấy mô hình hiệu quả và giá trị đa cộng tuyến VIF < 2 cho thấy sự tồn tại thấp của tính đa cộng tuyến trong mô hình [14]. Nghiên cứu bước đầu xác lập được các mô hình tại những thời điểm cảm nhiễm với một số chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch có ý nghĩa trong việc xác định được các cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT (bảng 2). Ngoài ra, kết quả phân tích tỷ số ODD của các tham số trong mô hình xác định cá thể KBC so với KBT đều cao hơn 1,0. Điều này cho thấy, khi các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch tăng sẽ làm tăng khả năng xác định các cá thể KBC.

Chọn lọc gián tiếp khả năng kháng bệnh dựa trên các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch, thường là chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu được xem như chọn lọc tính trạng kháng bệnh [7]. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch khác nhau có thể xác định các cá thể KBC hay KBT với hiệu quả khác nhau tại từng thời điểm trong quá trình cảm nhiễm. Phân tích hồi quy logistic đa biến trong nghiên cứu này cho thấy, có nhiều mô hình

Bảng 2. Các mô hình xác định khả năng kháng bệnh của các cá thể theo các giai đoạn.

Chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch	Chỉ tiêu	24-48 hpi	264-312 hpi	24-312 hpi
NEU	Tỷ số ODD	1,0024	–	–
MONO	Tỷ số ODD	–	–	1,0010
LYM	Tỷ số ODD	–	1,0001	–
HGKT	Tỷ số ODD	14,0	–	1,76
TTĐTB ở gan	Tỷ số ODD	3,2	1,5096	–
TTĐTB ở thận	Tỷ số ODD	–	1,3747	1,27
Các thông số kiểm định				
Giá trị kiểm định mô hình AIC nhỏ nhất		33,1	58,4	101,9
Giá trị đa cộng tuyến VIF trong mô hình		1,0	1,1	1,1
Pseudo R ²		0,6	0,2	0,3
AUC		0,9	0,8	0,8

có thể xác định cá thể thuộc nhóm KBC hay KBT trong quá trình cảm nhiễm. Cách tiếp cận này phù hợp với nghiên cứu trong thử nghiệm các mô hình chẩn đoán bệnh dựa trên các thông số huyết học [14]. Giá trị AUC của các mô hình xác định cá thể kháng bệnh trong nghiên cứu này tại giai đoạn 24-48 hpi, 264-312 hpi và toàn bộ quá trình cảm nhiễm lần lượt là 0,9, 0,8 và 0,8. Kết quả này cho thấy, ở các thời điểm cắt ngang trong quá trình cảm nhiễm đều có thể xác định được các cá thể kháng bệnh đạt hiệu quả ($AUC \geq 0,8$), đặc biệt tại thời điểm 24-48 hpi với các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch NEU, HGKT và TTĐTB ở gan ($AUC=0,9$).

Bảng 3. Khả năng (%) xác định các cá thể kháng bệnh tại giai đoạn 24-48 hpi.

Chỉ tiêu	Tiêu chí (đơn vị)	Giá trị
NEU	Độ nhạy/độ đặc hiệu (%)	70,8/66,7
	AUC	0,7
	Ngưỡng phân biệt (10^3 tế bào/mm ³)	2.610
HGKT	Độ nhạy/độ đặc hiệu (%)	87,5/45,8
	AUC	0,8
	Ngưỡng phân biệt (log ₁₀ (HGKT))	1,0
TTĐTB ở gan	Độ nhạy/độ đặc hiệu (%)	95,8/50,0
	AUC	0,7
	Ngưỡng phân biệt (TTĐTB/mô)	2,5

Trong mô hình xác định khả năng KBC hay KBT tại giai đoạn 24-48 hpi, độ nhạy của NEU, HGKT và TTĐTB ở gan đạt 70,8-95,8%, độ đặc hiệu đạt 45,8-66,7% với ngưỡng phân biệt tương ứng là 2.610×10^3 tế bào/mm³, 1,0, 2,5 TTĐTB/mô tại bảng 3. Độ nhạy và đặc hiệu của mô hình hồi quy logistic đa biến là 91,7 và 95,7% (số liệu không trình bày chi tiết trong nghiên cứu này). T.T. Phan và cs (2018) [14] cũng xác định rằng, việc sử dụng các thông số huyết học chẩn đoán bệnh là khả thi với độ nhạy và đặc hiệu lần lượt là 74,8 và 87,1%. Tuy nhiên, trong phạm vi nghiên cứu này chỉ thực hiện với 6 gia đình KBC và KBT nên trong tương lai cần phân tích các chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch tại nhiều thời điểm, đặc biệt lưu ý 24-48 hpi ở quy mô quần đàn chọn giống với số lượng gia đình lớn hơn. Ngoài ra, để có thể vận dụng vào chương trình chọn giống dài hạn, cần tính toán tương quan di truyền giữa chỉ tiêu đáp ứng miễn dịch với tính trạng sống/chết của thí nghiệm cảm nhiễm và hệ số di truyền qua các thế hệ với quy mô gia đình lớn như vừa nêu.

4. Kết luận

Cá thuộc gia đình cá tra KBC thể hiện đáp ứng miễn dịch cao hơn cá thuộc gia đình KBT tại hầu hết các thời điểm sau cảm nhiễm. Số lượng NEU, HGKT và TTĐTB ở gan tại thời điểm 24-48 hpi có thể sử dụng như các chỉ thị miễn dịch trong việc xác định cá thể cá tra KBC hay KBT do vi khuẩn *E. ictaluri* gây ra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Directorate of Fisheries (2021), "Many obstacles for pangasius export", <http://vasep.com.vn/san-pham-xuat-khau/ca-tra/nguyen-lieu/nhiều-chông- gai-cho-xuat-khau-ca-tra-20992.html>, accessed 25 August 2021 (in Vietnamese).
- [2] T. Gjedrem, M. Baranski (2009), *Selective Breeding in Aquaculture: an Introduction*, Springer, DOI: 10.1007/978-90-481-2773-3.
- [3] K.L. Camp, W.R. Wolters, C.D. Rice (2000), "Survivability and immune responses after challenge with *Edwardsiella ictaluri* in susceptible and resistant families of channel catfish, *Ictalurus punctatus*", *Fish Shellfish Immunol.*, **10**(6), pp.475-487, DOI: 10.1006/fsim.2000.0261.
- [4] T.V. Nguyen, N.V. Sang, T.H. Phuc, et al. (2019), "Genetic evaluation of a 15-year selection program for high growth in striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*", *Aquaculture*, **509**, pp.221-226, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.05.034.
- [5] S. Das, P.K. Sahoo (2014), "Makers for selection of disease resistance in fish a review", *Aquaculture International*, **22**(6), pp.1793-1812.
- [6] G.M. Weber, R.L. Vallejo (2008), "Cortisol response to a crowding stress: Heritability and association with disease resistance to *Yersinia ruckeri* in rainbow trout", *N. Am. J. Aquacult.*, **70**, pp.425-433, DOI: 10.1577/A07-059.1.
- [7] J. Galina (2017), *Fish Diseases*, Academic Press.
- [8] T.T.P. Dung, T.H. Phuc, N.T. Vu, et al. (2021), "Estimated genetic parameters for resistance to pyogenic liver and kidney disease in fish tra (*Pangasianodon hypophthalmus*)", *Journal of Agriculture and Rural Development*, **20**(1), pp.40-48 (in Vietnamese).
- [9] T.T.P. Dung, N.V. Sang, V.H. Phuong, et al. (2021), "Evaluating the immune response of macrophages in selected pangasius families (*Pangasianodon hypophthalmus*) resistant to purulent liver and kidney disease", *Journal of Agriculture and Rural Development*, **16**(1), pp.1-10 (in Vietnamese).
- [10] N.T.T. Lieu, B.T.B. Hang, D.T.H. Oanh (2011), "Understanding the fluctuations of non-specific immune factors in pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*) infected with *Edwardsiella ictaluri* bacteria", *CTU Journal of Science*, **(17A)**, pp.20-29 (in Vietnamese).
- [11] C.T. Hrubec, J.L. Cardinale, S.A. Smith (2000), "Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*)", *Veterinary Clinical Pathology*, **29**(1), pp.7-12, DOI: 10.1111/j.1939-165X.2000.tb00389.x.
- [12] M. Thrusfield (2018), *Veterinary Epidemiology*, Veterinary Clinical Sciences, University of Edinburgh, pp.422-423.
- [13] N.V. Tuan (2015), *Data Analysis with R*, General Publishing House, pp.360-393 (in Vietnamese).
- [14] T.T. Phan, A.T.T. Nguyen, A.N. Van, et al. (2018), "Neutrophil to lymphocyte with monocyte to lymphocyte ratio and white blood cell count in prediction of lung cancer", *A.M.J.*, **11**(4), pp.231-236, DOI: 10.21767/AMJ.2018.3387.
- [15] H. Chen, G. Yuan, J. Su, et al. (2019), *Hematological and Immune Genes Responses in Yellow Catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) with Septicemia Induced by Edwardsiella ictaluri*, Fish and Shellfish Immunology.
- [16] A.C.K. Benli, H.Y. Yildiz (2004), "Blood parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) spontaneously infected with *Edwardsiella tarda*", *Aquaculture*, **25**, pp.1388-1390, DOI: 10.1111/j.1365-2109.2004.01158.x.
- [17] T.C. Uribe, H. Folch, R. Enriquez, et al. (2011), "Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review", *Veterinari Medicina*, **56**(10), pp.486-503, DOI: 10.17221/3294-VETMED.
- [18] E.F. Petersen (2003), *Monoclonal Antibodies to Leucocytes and Immunoglobulin from Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) - Production, Characterisation and Application*, Department of Fisheries and Marine Biology, University of Bergen.
- [19] C.A. Shoemaker, P.H. Klesius (1997), "Protective immunity against enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), following controlled exposure to *Edwardsiella ictaluri*", *Journal of Fish Diseases*, **20**(5), pp.361-368, DOI: 10.1046/j.1365-2761.1997.00310.x.
- [20] E.B. Flemming, G.C. Waldbieser, W.R. Wolters, et al. (2009), "Expression analysis of selected immune-relevant genes in channel catfish during *Edwardsiella ictaluri* infection", *Journal of Aquatic Animal Health*, **21**(1), pp.23-35, DOI: 10.1577/H08-009.1.