

**XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG SINH KHÁNG THỂ
CỦA CÁ TRÁ (*PANGASIANODON HYPOPHthalmus*)
CẢM NHIỄM VI KHUẨN *EDWARDSIELLA ICTALURI* NHƯỢC ĐỘC**

Đặng Thị Hoàng Oanh¹, Nguyễn Hoàng Nhật Uyên¹, Huỳnh Kim Nguyễn² và Jung Tae Sung³

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

² Lớp Bệnh học Thủy sản khóa 36, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

³ Khoa Thú y, Đại học Quốc gia Gyeongsang, Hàn Quốc

Thông tin chung:

Ngày nhận: 10/05/2014

Ngày chấp nhận: 30/10/2014

Title:

Determination of the possibility to produce antibody of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) infected by attenuated *Edwardsiella ictaluri* bacteria

Từ khóa:

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*), đáp ứng miễn dịch, *Edwardsiella ictaluri*, vaccine nhược độc

Keywords:

Pangasianodon hypophthalmus, immune response, *Edwardsiella ictaluri*, attenuated vaccine

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the immune response of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) to attenuated *Edwardsiella ictaluri* bacteria. Agglutination test was used to quantify the level of specific antibody from striped catfish weekly after soaking with different concentrations of the attenuated bacteria ($2 \times 10^{4-8}$ CFU/mL) and control group. The challenge test by injecting virulent *E. ictaluri* (1.5×10^5 CFU/fish) were done at 2 weeks post exposure. The results showed that specific antibody against *E. ictaluri* of all experimented fishes were detected at 2nd week after soaking. Antibody titers increased quickly at the 3rd week, following by a gradual rise. In 6th week, the highest titer from treatments was found in treatment 1×10^8 with level 9.0 which was significant difference ($p < 0.05$) from the control group (2.0). In addition, group soaking with 1×10^8 CFU/mL of the attenuated bacteria showed significant lower mortality (25%) ($p < 0.05$) compared to control group (70%). These results demonstrated that using attenuated *E. ictaluri* at concentration of 1×10^8 CFU/mL can stimulate striped catfish generate specific antibody against *E. ictaluri* infection in experimental condition.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định khả năng sinh kháng thể đặc hiệu của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) cảm nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* nhược độc. Phương pháp ngưng kết được sử dụng để xác định hiệu giá(?) kháng thể đặc hiệu của cá tra sau mỗi tuần ngâm cá với vi khuẩn *E. ictaluri* nhược độc ở các nồng độ 2×10^4 , $1,5 \times 10^5$, 2×10^6 , 2×10^7 , 1×10^8 CFU/mL và đối chứng. Sau 2 tuần, cá tra được cảm nhiễm với chủng *E. ictaluri* có độc lực với nồng độ $1,5 \times 10^5$ CFU/mL. Kết quả cho thấy mức kháng thể của cá ở tất cả các nghiệm thức tăng dần từ tuần thứ 2, tăng nhanh đến tuần thứ 3 sau khi ngâm vi khuẩn nhược độc và cao nhất đến cuối giai đoạn khảo sát. Trong đó, cá ở nghiệm thức ngâm vi khuẩn nhược độc 1×10^8 CFU/mL có hiệu giá kháng thể trung bình tăng cao nhất (gần 9,0), khác biệt có ý nghĩa so với nhóm đối chứng (chỉ 2,0) ($p < 0,05$). Ngoài ra, cá tra ở nghiệm thức ngâm vi khuẩn nhược độc 1×10^8 CFU/mL có tỉ lệ chết thấp nhất (25%) trong khi đó ở nhóm đối chứng tỉ lệ cá chết là 70% ($p < 0,05$). Qua những kết quả trên cho thấy cá tra trong điều kiện thí nghiệm khi ngâm *E. ictaluri* nhược độc nồng độ 1×10^8 CFU/mL có khả năng tạo kháng thể đặc hiệu chống lại vi khuẩn *E. ictaluri*.

1 GIỚI THIỆU

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là loài cá nuôi và chế biến xuất khẩu đạt thế mạnh kinh tế thứ hai của nền kinh tế thủy sản Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) nên diện tích nuôi không ngừng được mở rộng và mật độ nuôi cũng được tăng cao. Tuy nhiên, những năm gần đây do việc sử dụng hóa chất và kháng sinh không đúng qui định, không kiểm soát làm tác động đến môi trường, hệ sinh thái của khu vực hoặc để lại dư lượng trong sản phẩm thủy sản và dẫn đến hiện tượng kháng kháng sinh trong các loài vi khuẩn gây bệnh trên cá (Aoki, 1988; Sarter và *ctv.*, 2007; Dung và *ctv.*, 2009) làm bệnh ngày càng xuất hiện nhiều là nguy cơ đối với người nuôi dẫn đến tình trạng giảm năng suất giảm chất lượng và kéo theo là diện tích nuôi giảm. Theo Nguyễn Trọng Bình (2008) bệnh mù gan xuất hiện cao nhất ảnh hưởng nghiêm trọng đến cá tra. Tác nhân gây bệnh mù gan được đa số các nghiên cứu khoa học công bố là do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* (Crumlish và *ctv.*, 2002; Yuasa và *ctv.*, 2003; Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2004; Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2009). Để khắc phục tình trạng trên cũng như khắc phục các nhược điểm của phương pháp dùng kháng sinh, ở nước ta đã có một số nghiên cứu về vaccine bước đầu thử nghiệm trên các đối tượng nuôi thủy sản nhưng vẫn chưa được ứng dụng rộng rãi. Vaccine từ vi khuẩn *E.ictaluri* nhược độc có nhiều ưu điểm là kích thích sinh kháng thể miễn dịch đặc hiệu nhanh và kéo dài, dễ sản xuất, chi phí thấp, ... được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm. Do đó, đề tài được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm nhằm cung cấp thêm thông tin về miễn dịch cũng như vaccine trên cá làm cơ sở cho việc sản xuất vaccine nhược độc phòng bệnh ở cá tra sau này.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Cá thí nghiệm: Cá tra giống (*Pangasianodon hypophthalmus*) có kích cỡ khoảng 20-25 g/con, cá khỏe. Thuận dưỡng cá khoảng 1-2 tuần trước khi tiến hành thí nghiệm để cho cá ổn định và quen với điều kiện sống trong bể.

Vi khuẩn *E.ictaluri*: Chúng vi khuẩn *E.ictaluri* được phân lập và định danh từ mẫu cá bệnh thu tại ao. Chúng vi khuẩn *E.ictaluri* nhược độc DeltaE3 được tạo bằng phương pháp biến đổi gen do phòng thí nghiệm Bệnh Thủy sản, Khoa Thú y, Đại học Quốc gia Gyeongsang, Hàn Quốc cung cấp. Hai chủng này được trữ trong tủ -80°C tại Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

Vi khuẩn gây cảm nhiễm được phục hồi trên môi trường tryptic soy agar (TSA. Merck) và giữ trong tủ ẩm 48 giờ ở 28°C, sau đó chọn một khuẩn lạc nuôi tăng sinh trong môi trường tryptic soy broth (TSB. Merck) từ 24-30 giờ, ly tâm 4000 vòng/phút trong 3 phút, rửa 2 lần bằng dung dịch 0,85% NaCl và xác định mật độ vi khuẩn bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 590 nm kết hợp với phương pháp đếm số khuẩn lạc phát triển trên môi trường TSA (CFU/mL).

2.2 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm ngâm vaccine vi khuẩn *E.ictaluri* nhược độc: bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức (NT) ngâm vi khuẩn (VK) *E.ictaluri* nhược độc DeltaE3 ở nồng độ 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 CFU/mL, đối chứng ngâm nước muối sinh lý (0,85% NaCl) (ĐC NaCl 0,85%) và đối chứng âm không ngâm vi khuẩn hay nước muối sinh lý (ĐC (-)). Mỗi NT gồm 40 con, lặp lại 2 lần, thí nghiệm được bố trí như ở Bảng 1 (Hình 1B). Sau khi ngâm trong vòng 3 giờ có sục khí, cá ở mỗi NT được chuyển sang bể 250 L (Mỗi bể cấp nước khoảng 2/3 bể) (Hình 1A) để theo dõi trong 2 tuần.

Bảng 1: Bố trí thí nghiệm ngâm vi khuẩn *E.ictaluri* nhược độc

Nghiệm thức	2×10^4 CFU/mL	$1,5 \times 10^5$ CFU/mL	2×10^6 CFU/mL	2×10^7 CFU/mL	1×10^8 CFU/mL	Đối chứng	Đối chứng
Số cá	40	40	40	40	40	40	40
Chất ngâm	<i>E.ictaluri</i> nhược độc	<i>E.ictaluri</i> nhược độc	<i>E.ictaluri</i> nhược độc	<i>E.ictaluri</i> nhược độc	<i>E.ictaluri</i> nhược độc	NaCl 0.85%	không
Cảm nhiễm	<i>E.ictaluri</i>	<i>E.ictaluri</i>	<i>E.ictaluri</i>	<i>E.ictaluri</i>	<i>E.ictaluri</i>	<i>E.ictaluri</i>	không
Liều tiêm cảm nhiễm	$1,5 \times 10^5$ CFU/mL	$1,5 \times 10^5$ CFU/mL	$1,5 \times 10^5$ CFU/mL	$1,5 \times 10^5$ CFU/mL	$1,5 \times 10^5$ CFU/mL	$1,5 \times 10^5$ CFU/mL	không

Thí nghiệm xác định khả năng bảo hộ của vaccine: Sau 2 tuần ngâm với vi khuẩn nhược độc, cá tra được tiêm cảm nhiễm với chủng vi khuẩn *E.*

ictaluri có độc lực HL3 với nồng độ $1,5 \times 10^5$ CFU/mL (tiêm ở gốc vi ngực 0,1 mL/cá) (Hình 1C). Cá được thu mẫu máu trước khi ngâm và định

kỳ mỗi tuần sau ngâm vi khuẩn nhược độc và thu trong 4 tuần. Mỗi lần thu 3 con/nghiệm thức lặp lại 2 lần. Cá chết sau khi tiêm cảm nhiễm với vi khuẩn

E. ictaluri có độc lực được ghi nhận và thu lấy thận trừ trong ethanol (Merck) để kiểm tra sự hiện diện của vi khuẩn bằng phương pháp PCR.



Hình 1: A) Hệ thống bể thí nghiệm; B) Cá tra được ngâm vi khuẩn *E.ictaluri* nhược độc; C) Cá tra được gây nhiễm bằng phương pháp tiêm

Số cá chết trong đợt cảm nhiễm được ghi nhận và tính tỉ lệ bảo hộ (TLBH) của vaccine theo công thức của Amend (1981):

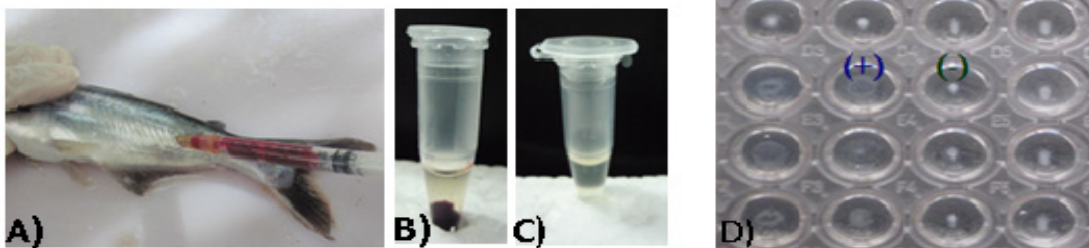
$$TLBH\ RPS = [1 - (\% \text{ cá chết có vaccine} / \% \text{ cá chết nhóm đối chứng})] \times 100\%$$

2.3 Phản ứng ngưng kết kháng nguyên-kháng thể

Phương pháp ly trích huyết thanh: Sử dụng benzocain (Merck) nồng độ 100 ppm để gây mê cá 1-2 phút. Vệ sinh vùng gần cuống đuôi, dùng kim tiêm 1 mL châm nhẹ vào phần cuống đuôi để lấy máu từ động mạch chủ ở cột sống (Houston, 1990). Cho máu vào ống eppendorf 1,5 mL và để yên 2-3 giờ trong ngăn mát tủ lạnh, tiếp theo, ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy phần huyết thanh phía trên cho vào ống eppendorf khác và đem xác định hàm lượng kháng thể hoặc trữ lạnh (Hình 2).

Phương pháp bất hoạt vi khuẩn bằng formaline: Chủng vi khuẩn *E.ictaluri* có độc lực HL3 sau khi nuôi tăng sinh được bất hoạt bằng formalin (37%). Xác vi khuẩn được rửa sạch formaline bằng nước muối sinh lý và bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh hoặc ở -20°C.

Phản ứng ngưng kết kháng nguyên-kháng thể: Phản ứng được thực hiện trên các đĩa nhựa (microplate) 96 giếng theo phương pháp vi ngưng kết kháng nguyên-kháng thể của Roberson (1990). Cho 25 µL huyết thanh vào giếng số 1 và 2. Từ giếng số 2 trở đi pha loãng huyết thanh bằng nước muối sinh lý với nồng độ pha loãng bằng ½. Cuối cùng cho 25 µL huyền dịch xác vi khuẩn vào giếng rồi trộn đều. Để yên 4-5 giờ ở nhiệt độ phòng rồi đọc kết quả. Mỗi đĩa 96 giếng có sử dụng 1 đối chứng dương (mẫu huyết thanh cho được có hiệu quả kháng thể cao nhất) và 1 đối chứng âm (nước muối sinh lý).



Hình 2: A) Phương pháp lấy máu cá tra, B) Máu cá đã ly tâm, C) Huyết thanh đã được ly trích, D) Đọc kết quả phản ứng ngưng kết miễn dịch

Sau 4-5 giờ, khảo sát hiệu giá kháng thể trung bình ở các nghiệm thức từ 10⁴ đến 10⁸ để xác định khả năng đáp ứng kháng thể của cá tra. Nếu đáy

giếng tạo thành một lớp ngưng kết trái rộng là dương tính (+), nếu đáy giếng chỉ có một chấm tròn nhỏ màu trắng là âm tính (-) (Hình 2D).

2.4 Kiểm tra sự hiện diện của vi khuẩn *E. ictaluri* bằng phương pháp PCR

Chiết tách DNA: DNA từ mô thận được chiết tách theo phương pháp của Đặng Thị Hoàng Oanh và ctv. (2009). DNA từ vi khuẩn được chiết tách theo phương pháp của Bartie và đồng tác giả (2006). Vi khuẩn được nuôi tăng sinh từ 16-18 giờ trong 5 mL môi trường NB ở nhiệt độ 28°C, sau đó được sử dụng để ly trích DNA bằng cách cho 1,5 mL dung dịch vi khuẩn vào ống ly tâm cùng với 100 µL 10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8,0 (TE). Hỗn hợp được đun nóng ở 95°C trong 15 phút, rồi được làm lạnh trong nước đá và ly tâm 2 phút ở vận tốc 14.000 vòng/phút để tách dung dịch DNA và trữ ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Khuyếch đại DNA: Thành phần hóa chất phản ứng PCR được thực hiện dựa theo qui trình của Panangala và đồng tác giả (2007, có chỉnh sửa) gồm 1 X dung dịch đệm 10 X; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 5 U Taq DNA polymerase; 0,4 µM mỗi xuôi (EiFd-1); 0,4 µM mỗi ngược (EiRs) và 20 ng mẫu DNA. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 4 phút; sau đó 95°C trong 30 giây, 53°C trong 45 giây, 72°C trong 30 giây; lặp lại chu kỳ trên 35 lần; 72°C trong 10 phút; giữ ở 20°C.

Điện di: 10 µL sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel 1,5% agarose (ABgene, UK) trong dung dịch đệm ×1 TAE (10 mM Tris, 5 mM acetate, 0,1 mM EDTA). Kết quả điện di được ghi nhận bằng máy đọc gel Vilber Lourmat (Pháp). Thang DNA 1 kb plus (Invitrogen) được chạy chung với mẫu để xác định kích thước của các vạch DNA. Trọng lượng phân tử đoạn DNA của vi khuẩn *E. ictaluri* cần phát hiện là 407bp.

Bảng 2: Hiệu giá kháng thể trung bình của cá tra trong giai đoạn khảo sát

Nghiệm thức/ tuần	I	II	III	IV	V	VI
10 ⁴	0,0 ^a	0,3 ± 0,5 ^a	3,5 ± 1,1 ^b	3,7 ± 1,0 ^a	4,5 ± 0,7 ^a	-
10 ⁵	0,0 ^a	1,7 ± 0,8 ^b	4,2 ± 1,5 ^{bc}	5,8 ± 1,3 ^c	6,4 ± 1,1 ^a	-
10 ⁶	0,2 ± 0,4 ^a	2,0 ± 1,4 ^b	4,2 ± 1,8 ^{bc}	6,2 ± 1,8 ^c	6,0 ± 2,0 ^a	7,0 ± 0,0 ^a
10 ⁷	0,3 ± 0,8 ^a	2,3 ± 2,3 ^b	5,8 ± 1,5 ^{cd}	6,2 ± 1,2 ^c	6,6 ± 0,9 ^a	8,0 ± 0,0 ^{ab}
10 ⁸	0,5 ± 0,6 ^a	3,5 ± 0,8 ^{bc}	6,3 ± 2,6 ^d	6,7 ± 1,2 ^d	7,3 ± 1,2 ^b	8,7 ± 2,1 ^b
Đối chứng	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	1,7 ± 0,6 ^b	-	-

Các giá trị trong bảng thể hiện giá trị trung bình và độ lệch chuẩn; Các giá trị trong cùng cột mang chữ cái mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê (p<0,05)

Theo nghiên cứu thăm dò đặc tính gây đáp ứng miễn dịch của tác nhân gây bệnh đốm trắng mũ trên cá tra của Nguyễn Thị Mộng Hoàng và ctv. (2009) đã chỉ ra rằng việc tiêm nhắc vào ngày thứ 14 kích thích đáp ứng miễn dịch thứ phát nên kháng thể hình thành sớm, cao hơn và duy trì lâu

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả kiểm tra hàm lượng kháng thể đặc hiệu của cá tra

Mẫu máu của cá trước khi ngâm vi khuẩn *E. ictaluri* nhược độc đều có hiệu giá kháng thể bằng 0. Giống như Thune *et al.* (1997) những cá thể khỏe sống trong môi trường sạch bệnh sẽ có hiệu giá kháng thể bằng 0. Sau khi ngâm vi khuẩn *E. ictaluri* nhược độc hàm lượng kháng thể xuất hiện và khác nhau ở mỗi nghiệm thức, đặc biệt tăng nhanh kể từ tuần thứ 2 (Bảng 2). Tuy nhiên, ở nhóm đối chứng vẫn chưa có sự đáp ứng miễn dịch, cho đến tuần thứ 4 sau khi ngâm vi khuẩn *E. ictaluri* nhược độc, cá ở nhóm đối chứng (NaCl 0,85%) xuất hiện kháng thể trong máu với hiệu giá kháng thể trung bình (HGKT_{TB}) là 1,67. Vì nhóm này có tỉ lệ chết cao nhất (71,43%) nên không có mẫu máu để tiếp tục quan sát hàm lượng kháng thể. Theo Vinitnantharat và Plumb (1993) cho thấy những cá sống sót sau khi tiếp xúc với mầm bệnh có hàm lượng kháng thể cao và bảo vệ được cơ thể kháng lại vi khuẩn *E. ictaluri*.

Sự khác biệt về hàm lượng kháng thể giữa nhóm đối chứng và các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn được thể hiện rõ từ tuần thứ 3: trong khi nhóm đối chứng vẫn ở mức 0,00 thì HGKT_{TB} ở các nghiệm thức còn lại đều tăng vọt có ý nghĩa (p<0,05), và đạt mức cao nhất là 6,33 ở nghiệm thức 10⁸ và không khác biệt nhiều với mức 5,83 của nghiệm thức 10⁷. Ngược lại, nghiệm thức 10⁴ có sự đáp ứng miễn dịch thấp nhất (mức 3,50) trong số các nghiệm thức được cảm nhiễm vi khuẩn.

hơn so kháng thể nguyên phát. Bên cạnh đó, những thí nghiệm của Phạm Công Thành (2010) cũng cho thấy trên cá tra khi tiêm nhắc với vi khuẩn *E. ictaluri* bất hoạt thì nhận thấy lượng kháng thể tăng lên đáng kể so với khi tiêm lần đầu. Bởi vậy, kháng thể đặc hiệu tăng nhanh là do cá sau khi ngâm (tiếp

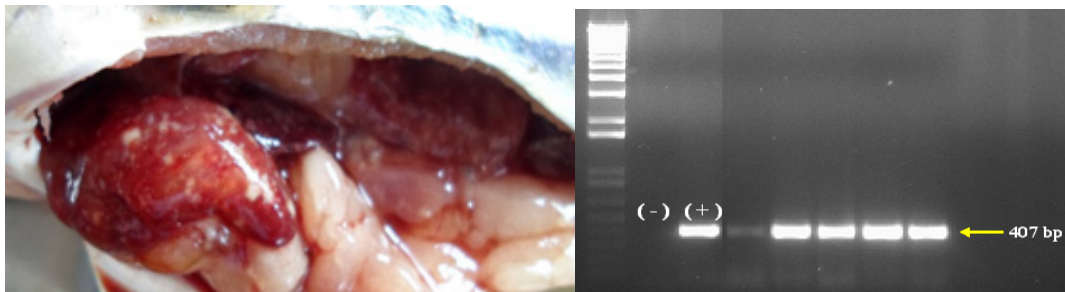
xúc với *E.ictaluri* lần thứ nhất) đã hình thành kháng thể nguyên phát; sau 2 tuần lại được gây cảm nhiễm (tiếp xúc lần 2) hình thành kháng thể thứ phát.

Do đó HGKT_{TB} của cá ở các nghiệm thức tiếp tục tăng cao ở các tuần tiếp theo và đạt mức cao nhất vào cuối giai đoạn khảo sát (tuần thứ 6). Nghiệm thức 10⁸ là nghiệm thức có đáp ứng miễn dịch cao nhất, HGKT_{TB} là 8,67 và vẫn không khác biệt nhiều so với nghiệm thức 10⁷ (mức 8,00) nhưng khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức 10⁶ (mức 7,00). Đối với nghiệm thức 10⁴, 10⁵ và đối chứng (NaCl 0,85%) có tỉ lệ chết cao nên không còn mẫu thu. Cho nên, có thể thấy rõ rằng sự đáp

ứng kháng thể của cá tra ở tất cả nghiệm thức đều diễn ra đến cuối giai đoạn khảo sát.

3.2 Kết quả cảm nhiễm

Cá tra bệnh mũ gan bên ngoài bình thường, một số cá bị xuất huyết ở da và vây, mang tái nhạt. Giải phẫu bên trong, nội quan có màu nhạt một số cá có dịch trong xoang bụng. Gan, thận và tỷ tạng xuất hiện nhiều đốm trắng có đường kính từ 1-2 mm (Hình 3A). Một vài cá bệnh có hiện tượng thận sưng to và bị nhũn. Dấu hiệu bệnh lý của cá tra sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* tương tự như mô tả của Ferguson *et al.* (2001), Từ Thanh Dung và *ctv.* (2004). Cá bệnh trong những ngày đầu và chết vào ngày thứ 4 đến ngày thứ 9 sau khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* độc lực.



Hình 3: (A) Cá tra sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri*. (B) Kết quả điện di sản phẩm PCR

Kết quả định danh vi khuẩn bằng phương pháp PCR cho thấy các mẫu thận thu được từ cá chết đều dương tính (+) với *E.ictaluri* (Hình 3B). Như vậy có thể nói cá chết trong đợt gây nhiễm này nguyên nhân chính là do vi khuẩn *E.ictaluri* gây ra.

Bên cạnh đó, có sự khác biệt đáng kể về tỉ lệ chết và tỉ lệ bảo hộ vaccine ở các nghiệm thức được trình bày ở Bảng 3, Hình 5, nghiệm thức đối chứng NaCl 0,85% có tỉ lệ chết cao nhất (71,43%), tỉ lệ bảo hộ vaccine thấp nhất (30%) và cũng là nghiệm thức có HGKT_{TB} thấp nhất. Trong số các nghiệm thức được ngâm vi khuẩn *E.ictaluri* nhược

độc có số cá chết giảm khi liều ngâm tăng, tương ứng với tỉ lệ bảo hộ tăng dần và với nồng độ ngâm 10⁸ CFU/mL đạt tỉ lệ bảo hộ cao nhất (65%) (Bảng 3).

Hầu hết các thử nghiệm về ngâm vaccine, kết quả cho thấy, kháng thể sinh ra không được phát hiện trong huyết thanh, ngay khi có sự xuất hiện thì cũng không có liên quan tới việc bảo hộ (Nakanishi và Ootake, 1997). Nhưng sau khi tiêm sẽ kích thích đáp ứng miễn dịch hoặc tạo ra miễn dịch bảo hộ trong môi trường tối ưu (Muiswinkel và Wiegertjes, 1997).

Bảng 3: Tỉ lệ chết và tỉ lệ bảo hộ của cá tra ở các nghiệm thức

Nghiệm thức	ĐC (-)	ĐC (NaCl 0,85%)	NT1	NT2	NT3	NT4	NT5
			10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
Tỉ lệ chết (%)	0,00	71,43	50,00	39,29	39,29	28,57	25,00
Tỉ lệ bảo hộ (%)	-	-	30,00	45,00	45,00	60,00	65,00

Như vậy, có sự liên quan giữa hàm lượng kháng thể trong máu và tỉ lệ chết của cá tra thí nghiệm. Lượng kháng thể càng cao thì tỉ lệ chết càng thấp, ngược lại, lượng kháng thể càng thấp thì tỉ lệ chết càng cao. Đối với các nghiệm thức thí nghiệm có sự cảm nhiễm của vaccine nhược độc: tỉ lệ chết càng thấp thì tỉ lệ bảo hộ của vaccine càng

cao, ngược lại, tỉ lệ chết càng cao thì tỉ lệ bảo hộ vaccine càng thấp.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Cá tra có đáp ứng miễn dịch đặc hiệu đối với vi khuẩn *E.ictaluri* nhược độc. Đáp ứng miễn dịch mạnh nhất khi được ngâm vi khuẩn *E.ictaluri*

nhược độc ở nồng độ 1×10^8 CFU/mL và gây nhiễm ở liều $1,5 \times 10^5$ CFU/mL (HGKT_{TB} là 8,7, tỉ lệ bảo hộ 65%). Việc tiêm cảm nhiễm ở tuần thứ 2 còn có vai trò như mũi tiêm nhắc giúp kích thích quá trình sinh kháng thể diễn ra nhanh, mạnh hơn và mức HGKT_{TB} ở tất cả các nghiệm thức vẫn tiếp tục tăng nhanh từ tuần thứ 3 đến cuối giai đoạn khảo sát.

Cần thử nghiệm vaccine *E.ictaluri* nhược độc với số lượng cá tra lớn hơn, thời gian khảo sát dài hơn nhằm tìm ra quy luật biến động của lượng kháng thể trong máu cá. Đồng thời tiến hành thử nghiệm vaccine trong môi trường ao nuôi thực nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Amend, D.F., 1981. Potency testing of fish vaccines. *Dev. Biol. Standard.*, 49, 447-454.
2. Aoki, T. 1988. Drug resistance plasmids from fish pathogens. *Microbiol. Sci.* 5:219-223.
3. Bartie, K., D. T. H. Oanh, G. Huys, C. Dickson, M. Cnockaert, J. Swings, N. T. Phuong and A. Teale, 2006. Ứng dụng REP-PCR và PFGE để định tít vi khuẩn kháng chloramphenicol phân lập tại các trại nuôi thủy sản ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Công nghệ Sinh học.* 4 (1): 31-40.
4. Crumlish, M., T.T. Dung, J.F. Turnbull, N.T.N. Ngoc, and H.W. Ferguson. 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *J. Fish Dis.* 25:733-736.
5. Dung, T.T., Haesebrouck, F., Sorgeloos, P., Tuan, N.A., Baelem M., Smet, A., Decostere, A., 2009. IncK plasmid-mediated tetracycline resistance in *Edwardsiella ictaluri* isolates from diseased freshwater catfish in Vietnam. *Aquaculture.* Volumn 295. Isuess 3-4. 16 October 2009, Pages 157-159.
6. Đặng Thị Hoàng Oanh và Đặng Thụy Mai Thy (2009). Nghiên cứu ứng dụng qui trình PCR chẩn đoán vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trên thận cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Báo cáo hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc. Công nghệ sinh học phục vụ Nông-Lâm nghiệp, Thủy sản, Công nghiệp, Y-Dược và bảo vệ môi trường. Thái Nguyên, ngày 26-27 tháng 11, 2009. Mã số 04-09/ĐHTN-2009.
7. Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2009. Phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh mù gan trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng phương pháp PCR. *Tạp chí khoa học. Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ.* 151-159.
8. Ferguson, H.W., J.F. Turnbull, A. Shinn, K. Thompson, T.T. Dung, and M. Crumlish, 2001. Bacillary necrosis in farmed *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage) from the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases* 24:509-513.
9. Houston, H.A., 1990. Blood and circulation. In: C.B. Schreck and P.B. Moyle. *Method for biology.* American Fish society Bethesda, Maryland, USA. 665: 273-322.
10. Muiswinkel W. B., Wiegertjes G. F., 1997. Immune responses after injection vaccination of fish. *Fish vaccinology* 90: 55-57.
11. Nakanishi T., Ootake M., 1997. Antigen uptake and immune response after immersion vaccination. *Fish vaccinology* 90: 59-68.
12. Nguyễn Thị Mộng Hoàng, Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Diễm Thu, Nguyễn Mạnh Thắng, 2009. Định danh và thăm dò đặc tính gây đáp ứng miễn dịch của tác nhân gây bệnh đốm trắng mù trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tuyển tập nghề cá sông Cửu Long.*
13. Nguyễn Trọng Bình, 2008. Tác nhân gây bệnh đốm trắng trên gan, thận (bệnh mù gan) và hướng ngăn ngừa bệnh. http://www.hcmbioech.com.vn/Salient_new_detail.php?id=19. Ngày truy cập 09/5/2013.
14. Panangala V. S., Craig A. Shoemaker, Vicky L. van Santen, Kevin Dybvig, Phillip H. Klesius, 2007. Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogen, *Favobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophyla*. *Dieases of aquatic organisms* 74: 199-208.
15. Phạm Thành Công, 2010. Khảo sát đáp ứng miễn dịch của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*. *Luận văn cao học.* Khoa Thủy Sản, Đại học Nông Lâm.
16. Roberson, B.S., Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and

- Muiswinkel, W.B., 1990. Bacterial agglutination. In: Techniques in Fish Immunology, 81–86.
17. Sarter, S., Kha, N.H.N., Hung, L.T., Lazard, J. and Didier Montet., 2007. Antibiotic Resistace in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control* 18 (2007) p.1391-1396.
18. Thune R. L., Hawke J. P., Ferandez D. H. And Lawrence M. L., 1997. In: Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J., Brown, F.(Eds), Fish Vaccinology, Dev. Biol. Stand. Karger Basel P. 125-134.
19. Từ Thanh Dung, M.Crumlish, Nguyễn Thị Như Ngọc, Nguyễn Quốc Thịnh và Đặng Thị Mai Thy, 2004. Xác định vi khuẩn gây bệnh trắng gan trên cá tra (*Pangasius hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học, khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. 137-142.
20. Vinitnantharat S and Plumb, 1993. Dis. Aquat. Org. 15: 31-34. Wise, D.J., T.E. Schwedler and D.L. Otis, 1993. Effects of stress on susceptibility of naive channel catfish in immersion challenge with *Edwardsiella ictaluri*. Journal of Aquatic Animal Health 5:92-97.
21. Yuasa, K., E. B. Kholidin, N. Panigoro, K. Hatai, 2003. First isolation of *Edwardsiella ictaluri* from cultured striped catfish *Pangasius hypophthalmus* in Indonesia. Fish Pathology 38(4): 181-183.