

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.100

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ MIỄN DỊCH CỦA VACCINE PHÒNG BỆNH XUẤT HUYẾT DO VI KHUẨN *Aeromonas hydrophila* TRÊN CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Lê Minh Khôi^{1*}, Từ Thanh Dung¹, Bùi Thị Bích Hằng¹, Eng Khuan Seng², Seah Keng Hian³, Trần Thị Tuyết Hoa¹ và Đặng Thụy Mai Thy¹

¹Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

¹Trường Đại học Nanyang Polytechnic, Singapore

³Công ty TNHH KMP, Singapore

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Lê Minh Khôi (email: lmkhoi@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 30/11/2020

Ngày nhận bài sửa: 06/05/2021

Ngày duyệt đăng: 25/06/2021

Title:

Evaluation of the immunological effectiveness of the vaccine against hemorrhagic disease caused by *Aeromonas hydrophila* on catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Từ khóa:

A. hydrophila, cá tra, formol, nhiệt độ, vaccine bất hoạt

Keywords:

A. hydrophila, formol, inactivated vaccine, temperature, striped catfish

ABSTRACT

Aeromonas hydrophila is a serious pathogen causing hemorrhagic disease, which leads to massive economic losses to inustrial striped catfish culture. Therefore, the development of an effective vaccine to protect the striped catfish against *A. hydrophila* is imperative. The highly virulent of *A. hydrophila* strains was screened to determine LD₅₀ values. The protective capacity of the vaccine was evaluated at 40-day post-vaccination with 4 vaccinated treatments and a control (no vaccination) treatment. The vaccine evaluation results upon challenge showed that the vaccine protected striped catfish with a high relative percentage survival value of up to 90-100% against *A. hydrophila* AH03 strain. The agglutination assay results showed that the specific antibody titers increased in vaccination treatments at 10-day post-inoculation (3.5-7) and decreased slightly (5-8) at 40 dpi. In conclusion, the inactivated *A. hydrophila* vaccine is a promising candidate providing significant protection for farmed striped catfish.

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* là một tác nhân gây bệnh xuất huyết và dẫn đến thiệt hại nghiêm trọng về kinh tế đến nghề nuôi cá tra thâm canh. Vì vậy, việc phát triển một loại vaccine hiệu quả để bảo vệ cá tra chống lại *A. hydrophila* là rất cần thiết. Các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* độc lực cao được sàng lọc để xác định giá trị LD₅₀. Đánh giá khả năng bảo hộ của vaccine sau 40 ngày tiêm chủng với 4 nghiệm thức được tiêm vaccine và 1 nghiệm thức đối chứng (không tiêm vaccine). Kết quả đánh giá vaccine thông qua cảm nhiễm cho thấy vaccine đã bảo vệ cá tra với giá trị tỷ lệ bảo hộ tương đối cao lên đến 90-100% chống lại dòng vi khuẩn *A. hydrophila* AH03. Kết quả phân tích ngưng kết miễn dịch cho thấy mức kháng thể đặc hiệu tăng lên ở các nghiệm thức tiêm vaccine sau 10 ngày (3,5-7) và giảm nhẹ (5-8) sau 40 ngày tiêm vaccine. Tóm lại, vaccine *A. hydrophila* bất hoạt là một sản phẩm đầy hứa hẹn cung cấp khả năng bảo hộ cao cho cá tra nuôi.

1. GIỚI THIỆU

Nuôi trồng thủy sản là một trong những ngành sản xuất thực phẩm thiết yếu. Năm 2018, cung cấp hơn 114 tấn thực phẩm trên toàn thế giới, với sản lượng động vật thủy sản tăng trung bình 5,3% mỗi năm từ 2001 đến 2018 (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2020). Sản lượng cá tra đã tăng từ 1,74 triệu tấn năm 2010 lên đến 2,35 triệu tấn vào năm 2018, chiếm 4,3% tổng sản lượng nuôi trồng thủy sản toàn cầu (FAO, 2020). Vấn đề về giá cả, thị trường xuất khẩu không ổn định và sự thâm canh hóa ngày càng cao làm cho dịch bệnh trên cá tra xảy ra thường xuyên hơn là những thách thức của nghề này (Le & Cheong, 2010). Ngành công nghiệp nuôi cá tra thường xuyên bị ảnh hưởng bởi các mầm bệnh như *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, *Flavobacterium columnare* (Crumlish et al., 2002; Tien et al., 2012; Thi et al., 2015). Tình trạng lạm dụng thuốc kháng sinh trong điều trị dẫn tới sự gia tăng hiện tượng kháng thuốc trên vi khuẩn, làm giảm hiệu quả của thuốc tác động lên vi khuẩn (Preena et al., 2020) và việc tồn dư kháng sinh trong thực phẩm cũng sẽ ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng (Reverter et al., 2020).

Các nghiên cứu hướng đến phát triển các loại vaccine hiệu quả để có thể phòng bệnh một cách chủ động hơn, cũng như đảm bảo an toàn cho sức khỏe con người. Cơ sở của việc sử dụng vaccine trên cá dựa trên hệ miễn dịch của chúng có chứa các tế bào có khả năng ghi nhớ kháng nguyên (mầm bệnh bị bất hoạt hoặc đã mất khả năng gây bệnh) tạo ra các phản ứng miễn dịch đặc hiệu; do đó, vật chủ được bảo vệ chống lại các kháng nguyên có đặc tính tương tự (Secombes & Belmonte, 2016). Vaccine hiện nay trên thế giới đã được thương mại hóa và sử dụng trên cá chủ yếu là vaccine bất hoạt từ vi khuẩn hoặc virus (Ulmer et al., 2012), thường được tạo ra từ việc làm mất khả năng lây nhiễm của mầm bệnh thông qua các quá trình vật lý (nhiệt độ, bức xạ,...), hóa học (formol) không ảnh hưởng đến tính kháng nguyên (Ma et al., 2019; Munang'andu et al., 2014). Vaccine bất hoạt thường được xem là an toàn do kháng nguyên của chúng không có khả năng lây nhiễm, ổn định trong điều kiện thực tế và chi phí sản xuất ít tốn kém so với các loại vaccine khác (Baxter, 2007; Biering et al., 2005). Vaccine ALPHA JECT Panga® 1 & 2 là những sản phẩm thương mại đầu tiên phòng bệnh xuất huyết do *A. hydrophila* và gan thận mũ do *E. ictaluri* trên cá tra được cấp phép lưu hành sử dụng tại Việt Nam (Le et al., 2018). Tuy nhiên, đặc tính sinh học vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh xuất huyết có thể thay đổi theo từng vùng miền

hoặc theo từng năm, cũng như đảm bảo hiệu quả chi phí của việc sử dụng vaccine trong sản xuất cá tra thâm canh. Do đó, cần có các nghiên cứu phát triển vaccine phòng bệnh xuất huyết do *A. hydrophila* trên cá tra nuôi thương phẩm nhằm kiểm soát dịch bệnh một cách hiệu quả, an toàn với con người, nâng cao thu nhập cho người nuôi và giá trị sản phẩm cá tra Việt Nam. Vì vậy, nghiên cứu được tiến hành để đóng góp phát triển vaccine phòng bệnh hiệu quả do *A. hydrophila* nhằm hướng tới một mô hình nuôi cá tra bền vững.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vi khuẩn *A. hydrophila* AH03 và AH04 sử dụng trong nghiên cứu này lần lượt được phân lập từ cá tra bệnh xuất huyết (40-90 g) ở An Giang và Cần Thơ. Vi khuẩn được phân lập từ gan, thận và tỷ tạng của cá tra bệnh trên môi trường dinh dưỡng TSA (Tryptic Soya Agar, Merck) ủ trong 18-24 giờ ở 28°C. Các chủng vi khuẩn thu được sau khi phân lập sẽ được kiểm tra một số chỉ tiêu sinh hóa dựa trên hướng dẫn của Cowan & Steel (Barrow & Feltham, 1993), và Buller (2014). Ngoài ra, nhằm xác định vi khuẩn phân lập được là *A. hydrophila*, kỹ thuật khuếch đại (PCR) vùng đặc hiệu trên gen aerolysin *A. hydrophila* với mỗi xuôi (AeroFd - 5'CCA AGG GGT CTG TGG CGA CA 3') và mỗi ngược (AeroRs - 5' TTT CAC CGG TAA CAG GAT TG 3') (Pollard et al., 1990) được áp dụng với kích thước sản phẩm PCR là 209 bp. Điều kiện chu kỳ nhiệt PCR với giai đoạn biến tính ban đầu ở 95°C trong 4 phút. Sau đó, thực hiện 30 chu kỳ gồm giai đoạn biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn môi ở 60°C trong 45 giây, kéo dài ở 72°C trong 30 giây và giai đoạn kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 10 phút.

Cá tra (12-20 g) có nguồn gốc từ trại cá Lò Gạch, Trường Đại học Cần Thơ và được thuần dưỡng trong bể trữ 1 m³ có sục khí liên tục từ 2-3 tuần trước khi bắt đầu các thí nghiệm. Cá được cho ăn theo nhu cầu và kiểm tra không nhiễm bệnh do vi khuẩn hay ký sinh trùng trước khi được bố trí vào hệ thống thí nghiệm.

2.2. Xác định độc lực vi khuẩn và giá trị LD₅₀

Để xác định khả năng gây bệnh các chủng *A. hydrophila* AH03 và AH04 phân lập được, thí nghiệm xác định độc lực cho từng chủng vi khuẩn được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức (NT) bao gồm: 4 NT tiêm với các nồng độ vi khuẩn 10¹, 10², 10³, 10⁴ CFU/mL và 1 NT đối chứng tiêm nước muối sinh lý (NaCl 0,85%). Cá thí nghiệm được tiêm 0,1 mL dung dịch vi khuẩn/cá ở xoang

bụng. Tất cả các nghiệm thức được lặp lại 2 lần với mật độ 10 con cá/nghiệm thức và tỷ lệ cá chết được theo dõi trong 14 ngày. Giá trị độc lực vi khuẩn LD₅₀ (Lethal dose, 50%) được xác định dựa trên mô tả trước đây (Reed & Muench, 1938) để so sánh độc lực giữa các chủng vi khuẩn.

2.3. Xác định khả năng đáp ứng miễn dịch vaccine của cá tra trong trại thực nghiệm

2.3.1. Bố trí thí nghiệm tiêm vaccine

Các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* AH03 và AH04 được tạo kháng nguyên bằng cách bất hoạt bằng formol và nhiệt độ để tạo vaccine dạng nhũ tương dầu dạng keo sữa màu trắng đục để thực hiện thử nghiệm đánh giá hiệu quả tạo kháng thể.

Cá tra khỏe được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên vào 6 nghiệm thức với một độ 30 con/bể và mỗi nghiệm thức bố trí lặp lại 2 lần. Bốn nghiệm thức được tiêm xoang bụng với liều 0,1 ml/cá vaccine AH03F, AH04F, AH03H, và AH04H và 2 nghiệm thức không tiêm vaccine. Cá thí nghiệm được cho ăn theo nhu cầu, theo dõi tỷ lệ sống trong 40 ngày và mỗi 10 ngày (2 cá/bể) cá được thu mẫu huyết thanh để phân tích ngưng kết miễn dịch và giải phẫu quan sát sự kết hạt của vaccine.

2.3.2. Xác định khả năng bảo hộ của vaccine đối với *A. hydrophila*

Sau 40 ngày tiêm chủng, tất cả các nghiệm thức đã được tiêm vaccine và nghiệm thức không tiêm vaccine (20 con/bể) được bố trí cảm nhiễm với *A. hydrophila* AH03 với mật độ vi khuẩn gấp 100 lần giá trị LD₅₀ nhằm đánh giá hiệu quả của các dòng vaccine bất hoạt bằng formol hoặc nhiệt độ. Ngoài ra, nghiệm thức không tiêm vaccine được tiêm nước muối sinh lý (0,85% NaCl) với liều 0,1 ml/cá. Dấu hiệu bệnh lý và tỷ lệ cá chết tích lũy được ghi nhận sau khi gây cảm nhiễm và tái phân lập định danh vi khuẩn từ cá mới chết hoặc lơ dờ. Sau 10 ngày cảm nhiễm, huyết thanh cá thí nghiệm được thu mẫu để phân tích đánh giá khả năng bảo hộ cá cảm nhiễm của vaccine đối với *A. hydrophila*. Tỷ lệ bảo hộ tương đối RPS (relative percent survival) được xác định dựa trên tỷ lệ cá chết tích lũy theo mô tả của tác giả (Amend, 1981) nhằm đánh giá khả năng bảo hộ của vaccine đối tác nhân gây bệnh: $RPS = [1 - (\% \text{ tỷ lệ chết tích lũy cá tiêm vaccine} / \% \text{ tỷ lệ chết tích lũy cá không tiêm vaccine})] \times 100$.

2.3.3. Xác định mức kháng thể của cá tiêm vaccine

Mức kháng thể đặc hiệu chống lại *A. hydrophila* được xác định bằng phương pháp vi ngưng kết miễn

dịch đã được mô tả trong nghiên cứu trước đây (Dung et al., 2013) trên các đĩa 96 giếng đáy tròn (Thermo Scientific). Tất cả các giếng được thêm vào 25 µL nước muối sinh lý, ngoại trừ các giếng ở cột số 1. Sau đó, 25 µL huyết thanh cho vào các giếng cột số 1 và 2. Huyết thanh được pha loãng với nước muối sinh lý với tỷ lệ 1:1 bằng cách rút lần lượt 25 µL từ cột số 2 đến số 12 (đến cột 12 rút loại bỏ 25 µL). Kháng nguyên *A. hydrophila* bất hoạt (nồng độ OD₆₁₀ = 1) được thêm vào tất cả các giếng và trộn đều, mỗi nghiệm thức được lặp lại 2 lần. Kết quả ngưng kết miễn dịch được xác định sau khi ủ qua đêm ở nhiệt độ từ 4-8°C. Phản ứng dương tính (+) khi đáy giếng tạo thành một lớp ngưng kết trải rộng và âm tính (-) khi vi khuẩn không có sự liên kết với kháng thể tạo thành kết tủa trắng tròn nhỏ dưới đáy giếng. Kết quả được đọc bằng cách ghi nhận hệ số cột còn phản ứng dương tính cao nhất của mỗi hàng.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các dữ liệu được xử lý phân tích ANOVA 1 nhân tố và phép thử Duncan ở mức ý nghĩa $p < 0,05$ bằng chương trình SPSS 20.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và định danh *A. hydrophila*

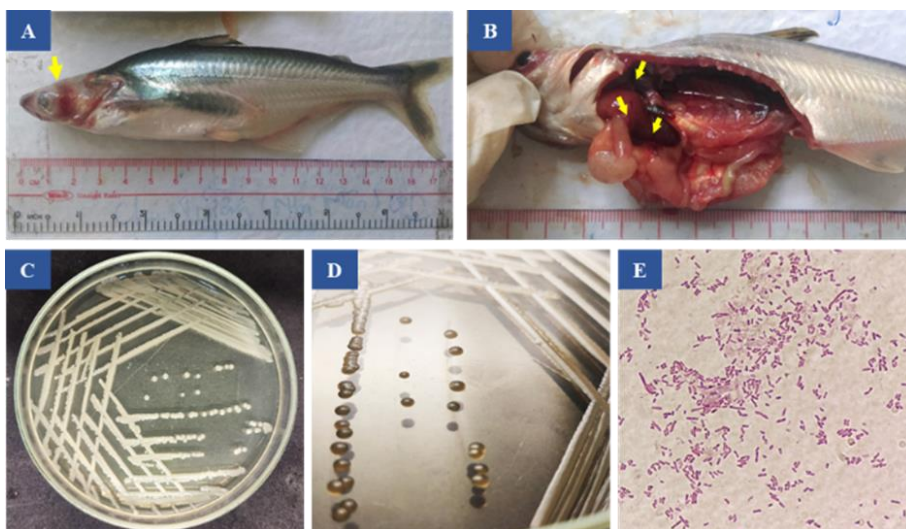
Bệnh xuất huyết trên cá tra với dấu hiệu bệnh lý bên ngoài là xuất huyết (XH) phân đầu và phù mắt hoặc có thể ghi nhận xuất huyết ở góc các vây cá và xoang miệng (Hình 1A). Dấu hiệu bệnh lý bên trong được ghi nhận có dịch máu xoang bụng, đặc biệt là các cơ quan gan, thận và tỷ tạng bị tổn thương và sưng đỏ (Hình 1B). Các chủng vi khuẩn AH03 và AH04 lần lượt được phân lập từ các ao cá tra nuôi thâm canh bị bệnh xuất huyết ở An Giang và Cần Thơ.

Kiểm tra các chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập được thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm (-), hình que ngắn, có khả năng di động và sử dụng glucose cả trong điều kiện hiếu khí và yếm khí (O/F), oxidase và catalase dương tính. Các chủng vi khuẩn này phản ứng dương tính với β-galactosidase (OPNG), arginine dihydrolase (ADH), indole production (IND), acetoin production (VP), gelatinase (GEL). Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn thông qua các chỉ tiêu sinh hóa cho thấy các chủng vi khuẩn AH03 và AH04 tương đồng với đặc điểm chủng *A. hydrophila* ATCC 7966 (Buller, 2014), ngoại trừ các chỉ tiêu tryptophane deaminase, amygdalin, l-arabinose có sự sai khác có thể do khác biệt về vùng địa lý và vật chủ khi phân lập vi khuẩn (Bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm sinh hóa *A. hydrophila* phân lập

Chỉ tiêu	<i>A. hydrophila</i> AH03	<i>A. hydrophila</i> AH04	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966 (Buller, 2014)
Gram	-	-	-
Hình dạng	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn
Di động	+	+	+
Oxidase	+	+	+
Catalase	+	+	+
O/F	+/+	+/+	+/+
ONPG	+	+	+
ADH	+	+	+
LDC	+	+	+/-
ODC	-	-	-
CIT	+	+	-
H ₂ S	-	-	-
URE	-	-	-
TDA	+	+	-
IND	+	+	+
VP	+	+	+
GEL	+	+	+
GLU	+	+	+
MAN	+	+	+
INO	-	-	-
SOR	-	-	-
RHA	-	-	-
SAC	+	+	+
MEL	-	-	-
AMY	+	+	-
ARA	-	-	+

Ghi chú: (+): phản ứng dương tính; (-): phản ứng âm tính



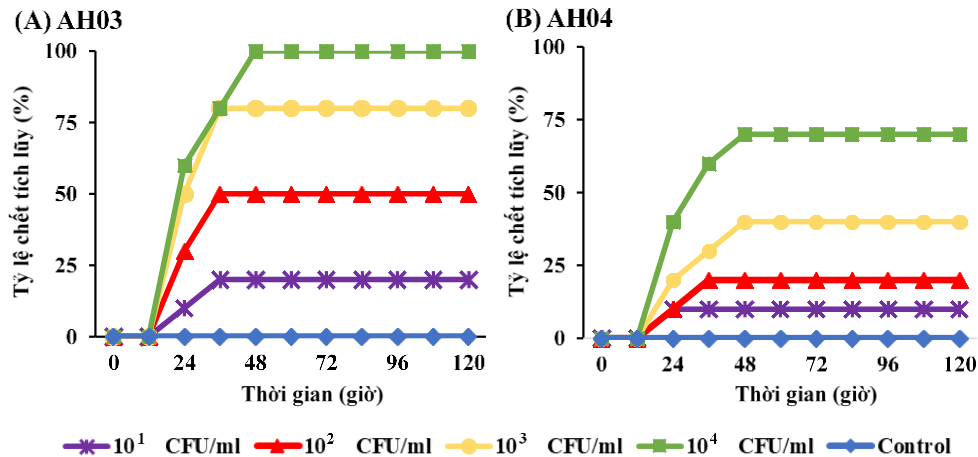
Hình 1. Dấu hiệu bệnh lý cá tra bệnh xuất huyết và đặc điểm *A. hydrophila* phân lập trên cá tra bệnh xuất huyết

A. Cá bị phù mắt XH tại đầu và miệng (mũi tên). B. Bên trong xoang nội quan cá có dịch, tại gan, thận, tỳ tạng XH và sưng to (mũi tên). C. Khuẩn lạc phát triển trên môi trường TSA sau 24 giờ ủ tại 28°C. D. Khuẩn lạc có màu vàng đục, nhẵn bóng và lồi. E. Vi khuẩn khi nhuộm có Gram âm hình que ngắn

3.2. Xác định giá trị độc lực LD50 hai chủng vi khuẩn A. hydrophila AH03 và AH04

Thí nghiệm được bố trí cảm nhiễm ở mật độ vi khuẩn khác nhau để đánh giá độc lực 2 chủng A. hydrophila AH03 và AH04 làm cơ sở cho các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả đánh giá cho thấy có sự khác biệt đáng kể giữa 2 chủng vi khuẩn (Hình 2). Dấu hiệu bệnh lý cá cảm nhiễm được ghi nhận trong đồng các dấu hiệu bệnh lý của cá tra nhiễm bệnh xuất huyết trong điều kiện nuôi thực tế và các mô tả trong các nghiên cứu trước đây (Tư Thanh Dung và ctv., 2015). Hầu hết cá ở tất cả các nghiệm thức đều bắt đầu chết và tập trung sau 24-48 giờ cảm nhiễm, ngưng chết sau 60 giờ cảm nhiễm. Nghiệm thức tiêm mật độ $4,7 \times 10^4$, $4,7 \times 10^3$, $4,7 \times 10^2$, $4,7 \times 10^1$ CFU/mL chủng AH03 có tỷ lệ cá chết tích lũy lần

lượt là 100%, 80%, 50% và 20% và tại nồng độ $1,7 \times 10^4$, $1,7 \times 10^3$, $1,7 \times 10^2$, $1,7 \times 10^1$ của chủng AH04 có tỷ lệ tích lũy thấp hơn 70%, 40%, 20% và 10% sau 48 giờ cảm nhiễm. Qua kết quả cảm nhiễm xác định được giá trị độc lực (LD₅₀) chủng A. hydrophila AH03 ($4,7 \times 10^2$ CFU/mL) và chủng A. hydrophila AH04 ($3,6 \times 10^3$ CFU/mL) sau 120 giờ cảm nhiễm. Nghiên cứu của Quách Văn Cao Thi (2017) đã ghi nhận vi khuẩn A. hydrophila phân lập trên cá tra bệnh xuất huyết có giá trị độc lực cao dao động $1,29 \times 10^3$ - $1,52 \times 10^4$ CFU/mL. Trong nghiên cứu này, chủng A. hydrophila AH03 và AH04 có giá trị độc lực LD₅₀ cao hơn so với các chủng vi khuẩn đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây và do đó sẽ được lựa chọn cho thí nghiệm phát triển vaccine phòng bệnh xuất huyết trên cá tra.



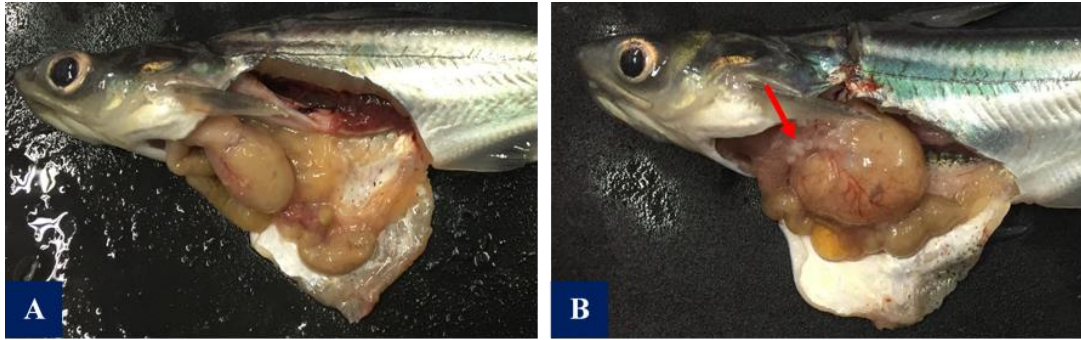
Hình 2. Tỷ lệ cá chết tích lũy của cá tra cảm nhiễm với A. hydrophila

3.3. Đánh giá hiệu quả của vaccine A. hydrophila bất hoạt

3.3.1. Kết quả quan sát giải phẫu nội quan cá tiêm vaccine

Các chỉ tiêu cần xác định tính an toàn trong nội quan cá bằng mắt thường tương tự với nghiên cứu của Tư Thanh Dung (2011). Sau 40 ngày thí nghiệm, không có các dấu hiệu bất thường tại vị trí tiêm và bên trong nội quan cá. Ở nghiệm thức đối chứng, không thấy sự kết dính cơ quan nội tạng, không có các dấu hiệu bất thường trên gan, thận và tỷ tạng và không hình thành sắc tố melanin trong xoang bụng của cá (Hình 3A). Đối với nghiệm thức tiêm vaccine kết quả giải phẫu cho thấy, vào ngày thứ 10 của thí nghiệm xuất hiện các hạt vaccine có màu trắng đục được bao bọc bởi giọt dầu với đường kính hạt từ 1 - 1,5 mm, không thấy sự khác biệt về hình dạng và tỷ lệ hình thành giữa các nghiệm thức tiêm vaccine.

Các hạt vaccine phân bố trong cơ quan nội tạng của cá, tập trung nhiều nhất ở màng treo ruột của xoang bụng (gần vị trí tiêm vaccine) (Hình 3B), hạt vaccine chủ yếu quan sát được vào những ngày đầu sau khi tiêm vaccine và không còn ghi nhận được sự kết hạt sau 20 - 30 ngày tiêm. Tương tự với nghiệm thức đối chứng, các nghiệm thức tiêm vaccine không có sự hình thành sắc tố melanin trong xoang bụng và không kết dính cơ quan nội tạng với thành bụng cá. Kết quả kiểm tra tính an toàn của vaccine trong nội quan cá tương tự với kết quả thử nghiệm vaccine phòng bệnh gan thận mũ trên cá tra (Tư Thanh Dung, 2011). Sự hình thành các hạt vaccine xung quanh vị trí tiêm trong nội tạng cá là tiền đề cho việc hình thành miễn dịch trên cá (Poppe & Breck 1997; Berg et al., 2006). Các chất bổ trợ dầu tạo ra “hiệu ứng lưu trữ” giúp kháng nguyên được từ từ giải phóng vào mô hoặc máu, tăng cường và kéo dài thời gian phản ứng miễn dịch (Anderson, 1992).



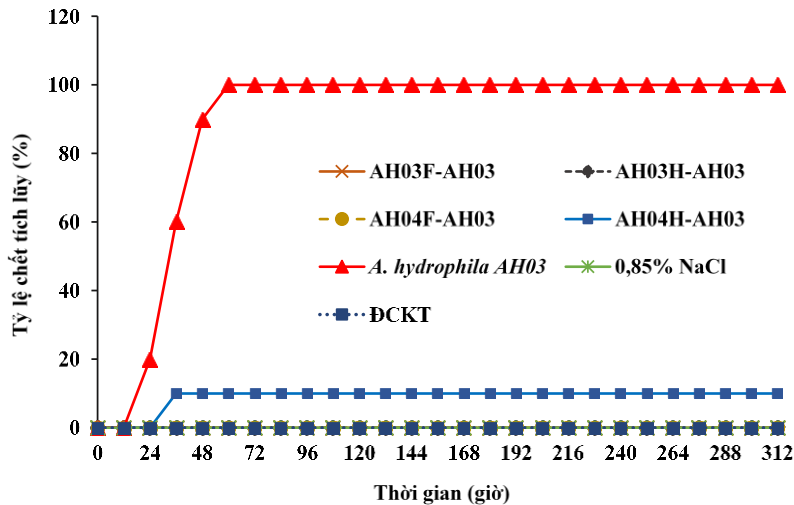
Hình 3. Giải phẫu cá trong thử nghiệm vaccine

A: Nghiệm thức đối chứng không tiêm không thấy sự bất thường; B: Nghiệm thức tiêm vaccine, các hạt vaccine tập trung bên ngoài gan (mũi tên)

3.3.2. Hệ số bảo hộ (RPS) của vaccine

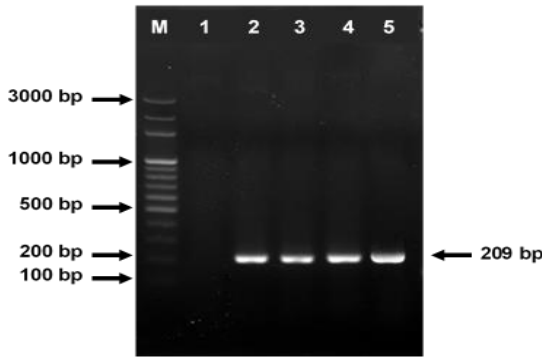
Sau 40 ngày tiêm vaccine, cá thí nghiệm được cảm nhiễm với *A. hydrophila* AH03 để đánh giá khả năng bảo hộ của từng loại vaccine đối với cá tra thí nghiệm. Kết quả cho thấy có sự khác biệt lớn giữa nghiệm thức đối chứng âm và các nghiệm thức tiêm vaccine (Hình 4). Các nghiệm thức đối chứng không tiêm vaccine bắt đầu ghi nhận cá chết sau 24-36 cảm nhiễm với *A. hydrophila* AH03 và tỷ lệ cá chết tích

lũy cao nhất (100%) sau 60 giờ cảm nhiễm. Ngược lại, hầu hết các nghiệm thức tiêm được vaccine đều không ghi nhận được tỷ lệ cá chết sau 14 ngày cảm nhiễm, ngoại trừ nghiệm thức cá tiêm dòng vaccine AH04H ghi nhận tỷ lệ chết rất thấp (10%) sau 36 cảm nhiễm với chủng vi khuẩn AH03. Kết quả tái phân lập và định danh vi khuẩn bằng phương pháp PCR ở các nghiệm thức cho thấy tất cả cá chết đều dương tính với vi khuẩn *A. hydrophila* (Hình 5).



Hình 4. Tỷ lệ chết tích lũy (%) giữa các nghiệm thức sau cảm nhiễm

AH03F và AH04F: vaccine bất hoạt bằng formol; AH03H và AH04H: vaccine bất hoạt bằng nhiệt; *A. hydrophila* AH03: đối chứng tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* AH03; 0,85% NaCl: đối chứng tiêm nước muối sinh lý (NaCl 0,85%); ĐCKT: đối chứng không tiêm



Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR các chủng *A. hydrophila* tái phân lập trong thí nghiệm cảm nhiễm

M: thang chuẩn 100 bp plus; giếng 1: đối chứng âm; giếng 2-3: các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* nghiệm thức DC-AH03; giếng 4: AH04H-AH03; giếng 5: *A. hydrophila* AH03

Hệ số bảo hộ RPS được tính toán dựa trên tỷ lệ chết tích lũy giữa nghiệm thức cá được tiêm và nghiệm thức cá không tiêm vaccine nhằm đánh giá tính hiệu quả bảo vệ vật chủ của vaccine. Vaccine được xem là có hiệu quả khi có hệ số RPS cao hơn 60% (Amend, 1981). Kết quả nghiên cứu cảm nhiễm với *A. hydrophila* cho thấy hệ số bảo hộ RPS của các nghiệm thức tiêm vaccine rất cao (90-100%) trong điều kiện phòng thí nghiệm (Bảng 2), sự khác biệt giữa các nghiệm thức tiêm vaccine là không đáng kể.

Bảng 2. Hệ số bảo hộ (RPS; %) của các dòng vaccine

Nghiệm thức	Tỷ lệ chết (%)	Hệ số RPS (%)
AH03F ^a	0	100
AH03H ^b	0	100
AH04F ^a	0	100
AH04H ^b	10	90
DC-AH03 ^c	100	-

Ghi chú: ^aVaccine bất hoạt bằng formol; ^bVaccine bất hoạt nhiệt độ; ^cĐối chứng không tiêm vaccine.

Kết quả nghiên cứu tương đồng với kết quả của Nguyen et al. (2017) khi sử dụng vaccine bất hoạt cho thấy cá mú được bảo hộ với tỷ lệ sống lần lượt là 100% và 91,7% với *V. harveyi* tương ứng với vaccine ở thời điểm 6 và 12 tuần sau khi tiêm chủng. Tương tự, vaccine này cũng có hiệu quả cao khi cảm nhiễm với chủng *V. harveyi* khác (RPS: 89,5–94,4%). Ảnh hưởng vaccine *S. agalactiae* bất hoạt trên cá rô phi đỏ hay cá điêu hồng được áp dụng thông qua phương pháp cho ăn thấy hệ số bảo hộ cá thí nghiệm chỉ đạt 45% khi cá chỉ được cho ăn

vaccine nhắc lại sau 14 ngày, trong khi hệ số này tăng lên 70% khi cá được cho ăn vaccine nhắc lại sau 14 và 42 ngày thử nghiệm (Ismail et al., 2016). Trong nghiên cứu của Thinh et al. (2009), vaccine *E. ictaluri* bất hoạt phòng bệnh gan thận mũ trên cá tra bằng cách kết hợp phương pháp ngâm và cho ăn nhắc lại nhằm nâng cao hiệu quả vaccine với hệ số RPS đạt 52% sau 48 ngày thử nghiệm, trong khi RPS của phương pháp ngâm hoặc cho ăn đơn lẻ lần lượt là 25, 15%. Tỷ lệ bảo hộ RPS nhóm cá được ngâm và cho ăn vaccine giảm xuống còn 29% sau 121 ngày thử nghiệm, ngược lại tỷ lệ RPS của nhóm cá thí nghiệm được duy trì (47%) nếu được cho ăn vaccine nhắc lại sau 14 tuần thử nghiệm (Thinh et al., 2009).

3.3.3. Xác định khả năng đáp ứng miễn dịch của vaccine

Kháng thể là mối tương quan phổ biến của sự bảo vệ ở mức tế bào và cũng được sử dụng như một thước đo đánh giá hiệu quả của vaccine. Kết quả phân tích mức kháng thể cho thấy các nghiệm thức tiêm vaccine đều đáp ứng miễn dịch và đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với đối chứng sau 10 ngày tiêm vaccine (Bảng 3). Mức kháng thể trung bình nghiệm thức cao nhất ghi nhận được ở nghiệm thức AH03F ($7 \pm 1,15$) và thấp nhất ở nghiệm thức AH04H ($3,5 \pm 1,29$). Ngược lại, mức kháng thể trung bình của nghiệm thức không tiêm vaccine giảm đáng kể ($0,5 \pm 1$) sau 10 ngày. Kết quả phân tích cho thấy, mức kháng thể ở nghiệm thức đối chứng giảm mạnh sau 10 ngày bố trí thí nghiệm và bắt đầu ổn định trở lại sau 40 ngày thí nghiệm ($3,25 \pm 0,5$). Đối với các nghiệm thức tiêm vaccine, hệ số ngưng kết miễn dịch vẫn được ghi nhận tăng dần qua các đợt thu mẫu và duy trì ở mức cao từ ngày 20 cho đến ngày 30 sau khi tiêm vaccine. Tuy nhiên, mức kháng thể giảm duy trì ở mức 4-7 được ghi nhận ở hầu hết các nghiệm thức sau 30 tiêm vaccine.

Ngoài ra, các nghiệm thức tiêm vaccine bất hoạt bằng formol có khả năng sinh kháng thể tốt hơn các nghiệm thức tiêm vaccine bất hoạt bằng nhiệt độ và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Mức kháng thể trung bình đạt cao nhất ở các nghiệm thức AH03F và AH04F lần lượt được ghi nhận $8,5 \pm 0,58$ và $6,75 \pm 1,89$ sau 30 ngày tiêm vaccine và giảm xuống sau 40 ngày tiêm vaccine AH03F ($7 \pm 0,82$) và AH04F ($6,25 \pm 3,1$). Trong khi đó, mức kháng thể nghiệm thức AH03H đạt cao nhất ở mức $6,25 \pm 0,96$ sau 10 ngày tiêm và nghiệm thức AH04H ($5,25 \pm 1,26$) sau 20 ngày tiêm. Hơn thế nữa, kháng thể ở cả hai nghiệm thức được tiêm vaccine bất hoạt bằng nhiệt độ đều ghi nhận giảm sau khi đạt mức

cao ở ngày 10 (AH03H) và ngày 20 (AH04H) sau tiêm vaccine. Mặc dù, mức kháng thể tuy có cao hơn nghiệm thức đối chứng không tiêm nhưng không có sự khác biệt giữa 3 nghiệm thức này ($p>0,05$). Phương pháp bất hoạt bằng nhiệt độ thường tác động trực tiếp đến thành phần kháng nguyên của vi khuẩn, trong khi các kháng nguyên này có khả năng được bảo quản khi bất hoạt bằng formol (Antipa, 1976). Trong cùng nghiên cứu cho thấy cá hồi Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) được tiêm vaccine *V. anguillarum* bất hoạt bằng nhiệt độ có tỷ lệ sống cao

hơn so với nhóm cá được tiêm vaccine bất hoạt bằng formol. Tương tự, nghiên cứu của Song & Kou (1981) cũng ghi nhận nồng độ kháng thể trên cá chình Nhật Bản (*Anguilla japonica*) khi sử dụng dòng vaccine bất hoạt bằng formol thấp hơn không đáng kể so với phương pháp bất hoạt *E. anguillimortifera* (còn được biết đến *E. tarda*) bằng nhiệt độ. Tuy nhiên, cá chốt sọc (*Mystus vittatus*) đáp ứng miễn dịch tốt với *A. hydrophila* bất hoạt bằng formol hơn so với phương pháp bất hoạt bằng nhiệt độ (Anbarasu et al., 1998).

Bảng 3. Hệ số ngưng kết miễn dịch qua từng giai đoạn thu mẫu

Nghiệm thức	Hệ số ngưng kết miễn dịch (ngày)					
	0	10	20	30	40	10 CN*
AH03F	3,38±0,74 ^a	7,00±1,15 ^c	7,00±1,41 ^b	8,50±0,58 ^c	7,00±0,82 ^c	7,25±0,96 ^b
AH04F	3,38±0,74 ^a	4,00±0,82 ^b	6,00±1,41 ^b	6,75±1,89 ^b	6,25±3,10 ^{bc}	7,50±1,91 ^b
AH03H	3,38±0,74 ^a	6,25±0,96 ^c	6,00±2,16 ^b	5,00±0,82 ^a	5,25±1,96 ^{abc}	7,25±1,71 ^b
AH04H	3,38±0,74 ^a	3,50±1,29 ^b	5,25±1,26 ^b	5,00±0,82 ^a	4,25±0,50 ^{ab}	5,75±0,96 ^{ab}
ĐCKT	3,38±0,74 ^a	0,50±1,00 ^a	2,75±0,50 ^a	4,00±0,00 ^a	3,25±0,50 ^a	4,00±0,82 ^a

Ghi chú: *Ngày 10 sau cảm nhiễm. Các số liệu trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Hiệu quả của nhiều loại vaccine cho cá được đánh giá thông qua việc định lượng mức kháng thể và đánh giá tỷ lệ sống của cá tiêm vaccine sau khi cảm nhiễm với tác nhân gây bệnh (Caipang et al., 2009). Sau cảm nhiễm, các nghiệm thức AH03F, AH03H và AH04F có hệ số ngưng kết miễn dịch trung bình tương đối bằng nhau và cao nhất trong tất cả các nghiệm thức, ngoại trừ nghiệm thức AH04H (5,75±0,96). Mặt khác, mức kháng thể thấp nhất ghi nhận được ở nghiệm thức không tiêm vaccine. Kết quả nghiên cứu này tương tự với báo cáo của Abu-Elala et al. (2019) ghi nhận trên cá rô phi, mức kháng thể trung bình ở các nghiệm thức tiêm vaccine được ghi nhận ở mức cao và khác biệt có ý nghĩa thống kê sau 3 tuần sử dụng vaccine so với nhóm đối chứng. Vaccine đóng vai trò như là tác nhân ngoại lai được tiêm vào vật chủ để kích thích hệ miễn dịch đặc hiệu. Mức kháng thể và hoạt tính lysozyme của cá tra gia tăng khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng sau 7 ngày tiêm *A. hydrophila* bất hoạt và lượng kháng thể đặc hiệu (IgM) khác biệt đáng kể sau ngày 21 theo dõi (Sirimanapong et al., 2014). Tương tự, mức kháng thể trên cá trê (*Clarias gariepinus*) tăng khác biệt có ý nghĩa thống kê từ ngày thứ 7, đạt giá trị cao nhất vào ngày 28 và vẫn duy trì mức cao tại ngày 35 sau tiêm vaccine *A. hydrophila* bất hoạt (Yin et al., 1996). Ngoài ra, lượng kháng thể trên cá tra tiêm vaccine phòng bệnh *E. ictaluri* cho thấy luôn duy trì ở mức cao (9-10) so với lượng kháng thể ghi nhận

được ở nhóm cá đối chứng không tiêm vaccine (Dung et al., 2013).

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Mức kháng thể nghiệm thức vaccine bất hoạt bằng formol khác biệt đáng kể so với phương pháp bất hoạt vi khuẩn bằng nhiệt độ. Sự kết hạt vaccine ở xoang bụng cá tra quan sát được sau 10 ngày tiêm chủng. Vaccine *A. hydrophila* bất hoạt đã kích hoạt các đáp ứng miễn dịch đặc hiệu của cá tra, tạo ra kháng thể ở mức cao và có tỷ lệ bảo hộ (90-100%) khi cảm nhiễm với vi khuẩn *A. hydrophila* sau 40 ngày tiêm chủng cũng được ghi nhận.

Mặc dù nghiên cứu này đã thấy rõ hiệu quả của vaccine *A. hydrophila* bất hoạt trên cá tra trong điều kiện thí nghiệm, nhưng vẫn cần có các nghiên cứu khả năng bảo hộ của các dòng vaccine khi triển khai ngoài thực địa nhằm đánh giá được hiệu quả của vaccine trong thực tế.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi dự án "Phát triển vaccines cho cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi thương phẩm", trong khuôn khổ dự án phối hợp giữa tập đoàn KMP, Trường Nanyang Polytechnic -Singapore và Trường Đại học Cần Thơ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abu-Elala, N.M., Samir, A., Wasfy, M. & Elsayed, M. (2019). Efficacy of injectable and immersion

- polyvalent vaccine against streptococcal infections in broodstock and offspring of *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 88, 293-300. [https://doi:10.1016/j.fsi.2019.02.042](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.042).
- Amend, D.F. (1981). Potency testing of fish vaccines. In Hennesen, W., & Andersen, D.P. (Eds), *Developments in Biologicals*, Vol. 49. Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines (pp. 447-454). S Karger AG.
- Anbarasu, K., Thangakrishnan, K., Aruna, B.V. & Chandran, M.R. (1998). Assessment of immune response in freshwater catfish *Mystus vittatus* (Bloch) to different bacterins of *Aeromonas hydrophila*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 36(10), 990-995.
- Anderson, D.P. (1992). Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 281-307. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90067-8](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90067-8).
- Antipa, R. (1976). Field testing of injected *Vibrio anguillarum* bacterins in pen-reared pacific salmon. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 33(6), 1291-1296. <http://dx.doi.org/10.1139/f76-166>.
- Baxter, D.J.O.M. (2007). Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occupational Medicine*, 57(8), 552-556. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqm110>.
- Berg, A., Rodseth, O.M., Tangeras, A. & Hansen, T. (2006). Time of vaccination influences development of adhesions, growth and spinal deformities in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69(2-3), 239-248. <https://doi.org/10.3354/dao069239>.
- Biering, E., Villoing, S., Sommerset, I. & Christie, K.E. (2005). Update on viral vaccines for fish. *Developments in Biologicals*, 121, 97-113.
- Buller, N.B., 2014. Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. CABI. 390 pp.
- Caipang, C.M.A., Brinchmann, M.F., Kiron, V. (2009). Profiling gene expression in the spleen of Atlantic cod, *Gadus morhua* upon vaccination with *Vibrio anguillarum* antigen. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 153(3), 261-267. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.03.005>.
- Crumlish, M., Dung, T.T., Turnbull, J.F., Ngoc, N.T.N. & Ferguson, H.W. (2002). Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases*, 25, 733-736. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00412.x>
- Dung, T.T., Cúc, T.H., Uyên, N.H.N., Trang, M.L.D. (2013). Khả năng đáp ứng miễn dịch của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) chống lại *Edwardsiella ictaluri*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 26, 269-276.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. <http://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.pdf>
- Ismail, M.S., Siti-Zahrah, A., Ridzuan, M.S.M., Azmai, M.N.A., Firdaus-Nawi, M. & Zamri-Saad M. (2016). Feed-based vaccination regime against streptococcosis in red tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 194. [https://doi:10.1186/s12917-016-0834-1](https://doi.org/10.1186/s12917-016-0834-1).
- Le, T.C. & Cheong, F. (2010). Perceptions of risk and risk management in Vietnamese catfish farming: An empirical study. *Aquaculture Economics and Management*. 14(4), 282-314. [https://doi:10.1080/13657305.2010.526019](https://doi.org/10.1080/13657305.2010.526019).
- Le, T.S., Nguyen, T.H., Vo, H.P., Doan, V.C., Nguyen, H.L., Tran, M.T., Tran, T.T., Southgate, P.C. & Kurtböke, D.İ. (2018). Protective effects of bacteriophages against *Aeromonas hydrophila* causing motile Aeromonas septicemia (MAS) in striped catfish. *Antibiotics (Basel)*, 7(1), 16. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7010016>.
- Ma, J., Bruce, T.J., Jones, E.M. & Cain, K.D. (2019). A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches, *Microorganisms*, 7(11), 569. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110569>.
- Munang'andu, H.M., Mutoloki, S. & Evensen, Ø. (2014). Non-replicating vaccines. In Gudding, G., Lillehaug, A., & Evensen, Ø. (Eds), *Fish Vaccination* (pp. 22-32). WILEY Blackwell.
- Nguyen, H.T., Nguyen, T.T.T., Tsai, M.A., Ya-Zhen, E., Wang, P.C. & Chen, S.C. (2017). A formalin-inactivated vaccine provides good protection against *Vibrio harveyi* infection in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish Shellfish Immunol*, 65, 118-126. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.008>.
- Pollard, D.R., Johnson, W.M., Lior, H., Tyler, S.D. & Rozee, K.R. (1990). Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(11), 2477-2481. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.11.2477-2481.1990>.
- Poppe, T.T. & Breck, O. (1997). Pathology of Atlantic salmon (*Salmo salar*) intraperitoneally immunised with oil-vaccine. A case report. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29, 219-226. <https://doi.org/10.3354/DAO029219>.

- Preena, P.G., Swaminathan, T.R., Kumar, V.J.R. & Singh, I.S.B. (2020). Antimicrobial resistance in aquaculture: a crisis for concern. *Biologia*, 75, 1497-1517. <http://dx.doi.org/10.2478/s11756-020-00456-4>.
- Quách Văn Cao Thi, 2017. Nghiên cứu đặc điểm bệnh học và cơ chế đa kháng thuốc của hai loài vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi thâm canh ở Đồng bằng sông Cửu Long. Đại học Cần Thơ.
- Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D., Avarre, J.-C., Combe, M., Pepey, E., Pouyaud, L., Vega-Heredía, S., De Verdal, H. & Gozlan, R.E. (2020). Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. *Nature communications*, 11(1870), 1-8. <https://www.nature.com/articles/s41467-020-15735-6>.
- Secombes, C.J. & Belmonte, R., (2016). Overview of the fish adaptive immune system. In Adams A. (Eds), *Fish Vaccines* (pp. 35-52). Springer.
- Sirimanapong, W., Thompson, K.D., Kledmanee, K., Thaijongrak, P., Collet, B., Ooi, E.L. & Adams, A. (2014). Optimisation and standardisation of functional immune assays for striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) to compare their immune response to live and heat killed *Aeromonas hydrophila* as models of infection and vaccination. *Fish and Shellfish Immunology*, 40(2), 374-383. [https://doi: 10.1016/j.fsi.2014.07.021](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.021).
- Song, Y.L. & Kou, G.H. (1981). The immunoresponses of eel (*Anguilla japonica*) against *Edwardsiella anguillimortifera* as studied by the immersion method. *Fish Pathology*, 15(3-4), 249-255.
- Tien, N.T., Dung, T.T., Tuan, N.A. & Crumlish, M. (2012). First identification of *Flavobacterium columnare* infection in farmed freshwater striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 100(1), 83-88. [https://doi: 10.3354/dao02478](https://doi.org/10.3354/dao02478)
- Từ Thanh Dung. (2011). Thử nghiệm vaccine phòng bệnh gan thận mù cho cá tra thâm canh. *Tạp chí Thương mại Thủy sản ISSN1859 – 1175*, 139, 85-90.
- Từ Thanh Dung, Đặng Thị Hoàng Oanh & Phạm Minh Đức. (2015). Bệnh và quản lý dịch bệnh trong nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Trong Nguyễn Thanh Phương và Nguyễn Anh Tuấn (chủ biên). Nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng sông Cửu Long: Thành công và thách thức trong phát triển bền vững (Trang 156-189). Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ.
- Thinh, N.H., Kuo, T.Y., Hung, L.T., Loc, T.H., Chen, S.C., Evensen, Ø. & Schuurman, H.J. (2009). Combined immersion and oral vaccination of Vietnamese catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) confers protection against mortality caused by *Edwardsiella ictaluri*. *Fish and Shellfish Immunology*, 27(6), 773-776. [https://doi: 10.1016/j.fsi.2009.08.012](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.08.012).
- Ulmer, J.B., Mason, P.W., Geall, A. & Mandl C.W., 2012. RNA-based vaccines. *Vaccine*, 30(30), 4414-4418. [https://doi: 10.1016/j.vaccine.2012.04.060](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.060).
- Yin, Z., Lam, T.J. & Sin Y.M. (1996). The role of specific antiserum of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 6(1), 57-69. <https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0006>.