

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG BẢO HỘ CỦA VẮC-XIN BẤT HOẠT BẰNG FORMALIN *Streptococcus agalactiae* (serotype III) TRÊN CÁ RÔ PHI (*Oreochromis* sp.)

Nguyễn Ngọc Phước¹, Nguyễn Thị Huệ Linh¹,

Nguyễn Thị Xuân Hồng¹, Sandra Adams², Janina Z. Costa³, Kim D. Thompson³

TÓM TẮT

Sản xuất vắc-xin an toàn và hiệu quả cao là rất cấp thiết để kiểm soát bệnh do *Streptococcus agalactiae*, một trong những tác nhân gây bệnh nghiêm trọng nhất ở cá rô phi trên toàn thế giới. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định độc lực của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* NNP 010103_17 nhóm B serotype III được phân lập từ mẫu bệnh phẩm cá rô phi nuôi tại tỉnh Đồng Tháp. Từ đó, chủng vi khuẩn này được sử dụng để gây bệnh thực nghiệm trên cá rô phi và điều chế vắc-xin. Kết quả nghiên cứu đã xác định ngưỡng gây chết LD₅₀ của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* NNP 010103_17 đối với cá thí nghiệm là 10^{4.7} cfu/mL. Vắc-xin bất hoạt *S. agalactiae* bằng formalin với chất bổ trợ Montanide (ISA 763 A VG, Seppic, Pháp) đã được tiêm cho cá rô phi (*Oreochromis* sp.) có tỷ lệ bảo hộ (RPS) là 62,5%. Sau 21 ngày ở nhiệt độ 28°C, cá thí nghiệm được tiêm vắc-xin xuất hiện đáp ứng miễn dịch được thể hiện ở sự gia tăng số lượng tế bào bạch cầu và cao hơn so với số lượng bạch cầu ở cá thí nghiệm không được tiêm vắc-xin hoặc chỉ được tiêm chất bổ trợ sau khi cảm nhiễm với *S. agalactiae*. Như vậy, vắc-xin *S. agalactiae* bất hoạt bằng formalin có hiệu quả tăng đáp ứng miễn dịch và bảo vệ cá rô phi chống lại sự cảm nhiễm của vi khuẩn gây bệnh *S. agalactiae*.

Từ khóa: Cá rô phi, *Oreochromis* sp., *Streptococcus agalactiae*, serotype III, vắc-xin bất hoạt bằng formalin.

1. MỞ ĐẦU

Streptococcus spp. thuộc nhóm lên cầu khuẩn là tác nhân gây bệnh ở động vật thủy sản bao gồm cả động vật thủy sản ngoài tự nhiên và động vật thủy sản nuôi ở các thủy vực ngọt, lợ, mặn. Chúng vi khuẩn này là một trong những tác nhân chính gây bệnh trong hệ thống nuôi thâm canh cá rô phi trên toàn cầu [17, 22]. Dấu hiệu điển hình của cá rô phi khi bị bệnh do vi khuẩn này gây ra là mất bì lợi đục, cá có hiện tượng bơi xoắn ốc hoặc bơi vòng tròn, xuất huyết và viêm màng não, gây ra tỷ lệ chết cao trong thời gian ngắn, đặc biệt khi nhiệt độ trên 15°C [8, 13]. Theo thống kê thì bệnh do liên cầu khuẩn được gây ra chủ yếu bởi hai loài *Streptococcus agalactiae* và *Streptococcus mitis*. Độc lực của hai loài vi khuẩn này có thể gây tỷ lệ chết lên tới 70% trong 3 ngày và 100% trong 6 ngày đối với cá rô phi vân (*Oreochromis niloticus*) trong điều kiện cảm nhiễm thực nghiệm bằng phương pháp tiêm xoang

bụng [3]. Đặc biệt *S. agalactiae* là tác nhân chính gây tổn thất nặng nề về kinh tế trong công nghiệp nuôi cá rô phi [1, 6, 7]. Vi khuẩn này còn là tác nhân gây bệnh trên người [5, 20] và động vật trên cạn như trâu bò [14, 15, 21]. Các chủng vi khuẩn gây bệnh trên người và gia súc khá đa dạng về kiểu hình (biotype) thì các chủng vi khuẩn gây bệnh trên cá tập trung vào các dạng kiểu hình sau: Biotype 2 (Sequence type (ST) 260, ST 552, serotype Ib) phân bố khắp thế giới, biotype 1 (ST 7, serotype Ia) và biotype 3 (ST283, serotype III) phân bố chủ yếu ở Đông Nam Á [12].

Mặc dù vắc-xin phòng bệnh trong nuôi thủy sản được bắt đầu nghiên cứu và phát triển từ năm 1973 nhưng mãi đến cuối những năm 1987 mới được đưa vào sử dụng [16]. Cho đến tháng 7 năm 2005, đã có 35 loại vắc-xin phòng bệnh vi khuẩn và 2 loại vắc-xin phòng bệnh virus được đăng ký bán quyền và sử dụng cho 6 đối tượng nuôi phổ biến trên 41 quốc gia trên thế giới bao gồm cả lợn, cá chình châu Âu, cá chình châu Á, cá rô phi, cá Turbot và cá bơn đuôi vàng [11]. Vắc-xin bất hoạt là loại vắc-xin mà trong đó các vi sinh vật gây bệnh bị giết bằng hóa chất (formalin, cồn) hoặc các yếu tố vật lý (nhiệt độ, UV, tia X). Các yếu tố hóa lý trên có thể làm mất khả năng chết mầm bệnh nhưng không làm biến tính protein do đó

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

² Institute of Aquaculture, University of Stirling, UK

³ Aquaculture Research Group, Moredun Research Institute, UK

Email: nguyenngocthuoc@huan.edu.vn

vẫn giữ được độc tính của mầm bệnh. Đặc tính của vắc-xin bất hoạt khi đưa vào cơ thể thì quá trình sản xuất kháng thể chậm (khoảng 7-14 ngày). Hầu hết các loại vắc-xin bất hoạt chỉ gây đáp ứng miễn dịch không hoàn toàn và có tác dụng trong khoảng thời gian ngắn trên động vật thủy sản nên cần phải tiêm nhắc lại nhiều lần. Tuy vậy, ưu điểm của vắc-xin bất hoạt là có biên độ an toàn rất cao.

Hiện nay vắc-xin đối với vi khuẩn *S. agalactiae* đã được thương mại nhưng hiệu quả phòng bệnh trên cá rô phi nuôi tại Việt Nam không cao do các loại vắc-xin này được sản xuất từ các chủng vi khuẩn gây bệnh trên cá ở châu Mỹ (Serotype Ib). Từ đó "*Nghiên cứu khả năng bảo hộ của vắc-xin bất hoạt Streptococcus agalactiae trên cá rô phi (Oreochromis sp.)*" là cơ sở khoa học cần thiết để điều chế vắc-xin phòng trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi nuôi tại Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn gây bệnh *S. agalactiae* NNP 010103_17 dùng để điều chế vắc-xin và gây bệnh thực nghiệm được phân lập từ mẫu bệnh phẩm cá rô phi nuôi tại tỉnh Đồng Tháp. Chủng vi khuẩn được định danh là *S. agalactiae* group B serotype III bằng phương pháp MLST (Multilocus Sequence Typing) và được bảo quản ở nhiệt độ -20°C.

2.2. Các thí nghiệm

Cá rô phi (*Oreochromis sp.*), khối lượng cơ thể trung bình 30 g được mua từ Trung tâm Giống thủy sản Thừa Thiên - Huế và được nuôi ở trong bể composite 1 m³ tại Phòng thí nghiệm Bệnh học thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Cá được nuôi cách ly trong 14 ngày. Trước khi bố trí thí nghiệm, đàn cá được kiểm tra không bị nhiễm khuẩn bằng cách cấy trực tiếp mẫu nào của 5 cá ngẫu nhiên trong bể lên môi trường Tryptone Soy Agar (TSA, Hi Media, Ấn Độ) và ủ ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp xác định liều gây độc LD₅₀

Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* NNP 010103_17 được nuôi cấy trên môi trường thạch TSA. Lấy 1 khuẩn lạc trên đĩa thạch nuôi cấy tăng sinh trong 10 mL môi trường Tryptone Soya Broth (TSB, HiMedia, Ấn Độ) ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. Dung dịch vi khuẩn được li tâm với tốc độ 3000 vòng trong 10 phút

bằng máy ly tâm (Digisystem Laboratory Instruments Inc., Đài Loan), loại bỏ phần dịch nổi. Dung nước muối sinh lý 0,85% NaCl rửa vi khuẩn hai lần, sau đó cho 10 mL dung dịch nước muối sinh lý vào để tạo huyền phù. Đo mật độ vi khuẩn bằng máy đo mật độ quang học (Spectrophotometer model 4111 RS, Zuzi, Tây Ban Nha) ở bước sóng 620 nm, dùng nước muối sinh lý pha loãng đến giá trị OD₆₂₀ = 1 (tương đương 10⁸ cfu/mL, số liệu không công bố). Sau đó pha loãng vi khuẩn theo các mật độ từ 10⁴-10⁸ cfu/mL.

Thí nghiệm xác định giá trị LD₅₀ được bố trí trên 7 nghiệm thức bao gồm: 6 nghiệm thức thí nghiệm và 1 nghiệm thức đối chứng. Mỗi nghiệm thức gồm 10 con cá được nuôi trong bể nhựa (V = 50 L). Cá trước khi cảm nhiễm được gây mê bằng Anesin (Bayer, Việt Nam) với liều lượng 0,02 mL/L nước. Cá được cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm vào xoang bụng. Trong 6 nghiệm thức thí nghiệm: cá ở mỗi nghiệm thức được tiêm 0,1 mL của một trong sáu mật độ vi khuẩn *S. agalactiae* từ 1 x 10⁴ đến 1 x 10⁹ cfu/mL. Ở nghiệm thức đối chứng, cá được tiêm 0,1 mL nước muối 0,85% vô trùng. Tỷ lệ chết được theo dõi trong 14 ngày. Giá trị LD₅₀ được xác định theo phương pháp của Reed-Muench [2].

Dựa vào số lượng cá chết ở các nghiệm thức để tính LD₅₀ theo công thức sau:

$$LD_{50} = 10^{x \cdot x}$$

Trong đó: a là số lỵ thừa mà tại đó vi khuẩn gây cá chết thấp nhất (trên 60%).

x được tính dựa vào công thức: $x = (P_x - 60) / (P_x - P_0)$.

Với: P_x là tỷ lệ chết cận trên và P₀ là tỷ lệ chết cận dưới của liều gây chết 60%.

2.3.2. Thí nghiệm xác định khả năng bảo hộ của vắc-xin bất hoạt lên cá rô phi (*Oreochromis sp.*)

* Phương pháp điều chế vắc-xin

Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* NNP 010103_17 được nuôi cấy trong 500 mL môi trường Tryptic soya broth (TSB) ở 28°C trong 24 giờ. Kiểm tra mật độ vi khuẩn (10⁹ cfu/mL) bằng phương pháp đo mật độ quang học ở bước sóng 620 nm.

Bất hoạt vi khuẩn *S. agalactiae* bằng cách thêm formalin 37% vào dung dịch nuôi cấy vi khuẩn với tỷ lệ 0,5% và ủ trong 2 giờ ở 28°C, sau đó trong 48 giờ ở 4°C với máy lắc đều liên tục.

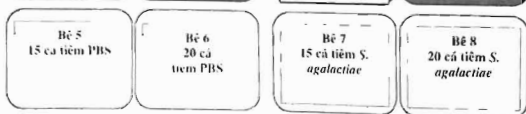
Kiểm tra sự bất hoạt của vi khuẩn bằng cách lấy 1 mL hỗn hợp vi khuẩn *S. agalactiae* và formalin ở trên và cho vào môi trường TSB, nuôi ở 28°C và kiểm tra sự phát triển của vi khuẩn trong 7 ngày bằng cách hàng ngày lấy 1 mL dung dịch trên cây trần trên đĩa thạch chứa môi trường TSA, quan sát sự phát triển vi khuẩn sau 24 - 48 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C.

Điều chế vắc-xin: Lọc tâm dung dịch vi khuẩn đã bất hoạt (4000 vòng/phút) trong 15 phút, loại bỏ phần dung dịch ở phía trên, thêm 100 mL dung dịch muối đệm phosphate (PBS: 0,137 M NaCl, 0,05 M NaH_2PO_4 , pH 7,4) vô trùng vào và trộn đều. Sau đó dung dịch vi khuẩn đã bất hoạt ($\sim 1 \times 10^9$ cfu/mL) được trộn với chất bổ trợ thương mại Montanide (ISA 763 A VG, Seppic, Pháp) theo tỷ lệ 4:6 (v/v) và được nhũ hóa bằng máy trộn Polytron theo chu kỳ 4000 vòng/phút trong 3 phút, 5000 vòng/phút trong 30 giây. Vắc-xin sau đó được bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng.

Nghiệm thức 1.



Nghiệm thức 2.



Hình 1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm cảm nhiễm với *S. agalactiae*

Cụ thể:

Nghiệm thức 1 (Hình 1): cá đối chứng- cá chỉ được tiêm chất bổ trợ Montanide.

Bé 1: gồm 15 con cá sẽ được tiêm 0,1 mL PBS.

Bé 2: gồm 20 con cá sẽ được tiêm 0,1 mL PBS.

Bé 3: gồm 15 con cá sẽ được tiêm 0,1 mL

S. Agalactiae.

Bé 4: 20 con cá sẽ được tiêm 0,1 mL *S. agalactiae*.

Nghiệm thức 2 (Hình 1): cá đã được vắc-xin

Bé 5: gồm 15 con cá sẽ được tiêm 0,1 mL PBS.

Bé 6: gồm 20 con cá sẽ được tiêm 0,1 mL PBS.

Bé 7: gồm 15 con cá sẽ được tiêm 0,1 mL *S. Agalactiae*.

* Phương pháp bố trí thí nghiệm

Cá thí nghiệm sử dụng là 145 con, trong đó 5 con sẽ được thu mẫu để kiểm tra số lượng bạch cầu trước khi tiêm vắc-xin. 140 cá thí nghiệm còn lại được bố trí trên 2 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức gồm 70 cá được nuôi trong bể composite với thể tích 500 L.

Nghiệm thức 1 (nghiệm thức đối chứng): cá được tiêm 0,1 mL dung dịch chất bổ trợ Montanide vào xoang bụng.

Nghiệm thức 2 (nghiệm thức vắc-xin): cá sẽ được tiêm 0,1 mL vắc-xin bất hoạt *S. agalactiae* vào xoang bụng.

Cá được nuôi ở nhiệt độ 28°C trong 21 ngày (đạt 600 độ ngày). Sau đó, từ 70 cá ở mỗi nghiệm thức ban đầu được bố trí vào các bể 50 L theo sơ đồ bố trí thí nghiệm ở hình 1. Cá sau khi bố trí vào các bể 50 L sẽ được cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* với liều LD₅₀ đã được xác định ở thí nghiệm trước đó.

Bé 8: 20 con cá sẽ được tiêm 0,1 mL *S. Agalactiae*.

Thí nghiệm được kéo dài trong 14 ngày ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ở hệ thống nước chảy tốc độ 14 m/s. Cho ăn ở mức duy trì.

Cá ở 4 bé 1, 3, 5, 7 dùng để theo dõi tỷ lệ chết và xác định tỷ lệ bảo hộ (RPS) của vắc-xin.

Cá ở 4 bé 2, 4, 6, 8 được sử dụng để thu mẫu và xác định số lượng bạch cầu trước và sau 5 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*.

Công thức tính tỷ lệ bảo hộ RPS = $1 - (\text{tỉ lệ chết lô vắc xin} / \text{tỉ lệ chết lô đối chứng}) \times 100$.

2.3.3. Phương pháp xác định số lượng bạch cầu

Cá trước lấy mẫu được gây mê bằng Aquis (Bayer, Việt Nam) với liều lượng 0,02 mL/L nước.

*** Phương pháp lấy mẫu máu và lách**

Máu và được thu ở tĩnh mạch bụng bằng xilanh dung tích 1 mL có chứa một lượng nhỏ dung dịch chống đông máu heparin (Sigma, cat no. H3393-50 KU). Máu thu xong được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trước khi nhuộm để xác định số lượng bạch cầu.

Sau khi lấy mẫu, cá được giải phẫu để lấy lách. Đặt khối lách vào đĩa Petri vô trùng có chứa 5 mL dung dịch L-15-FBS (Foetal bovine serum, Gibco, cat no. 31415029)- Hep. Đặt khối lách trên hộp lọc có kích thước mắt lưới 100 μ m (Fisherbrand, cat. no. 22363549); sau đó dùng đầu pipet tổng của xilanh để nghiền nhỏ khối lách, tế bào bạch cầu sẽ lọt qua mắt lưới và các mô liên kết sẽ được giữ lại trên bề mặt lưới.



Hình 2. Lớp tế bào bạch cầu phân tầng màu trắng trong ở giữa ống

Thu lớp tế bào bạch cầu bằng pipet vô trùng (Hình 3). Sau đó thêm L-15- FBS đến thể tích 50 mL và ly tâm trong 10 phút bằng máy ly tâm lạnh với tốc

độ 800 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C. Loại bỏ phần dung dịch và thêm vào 1 mL L15-FBS, dung dịch tế bào bạch cầu được bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

Pha loãng máu và dịch lách với dung dịch L-15-FBS theo tỉ lệ 1:5.

Cho 1,5 mL dung dịch tế bào pha loãng vào 7 mL dung dịch Percoll 51%, li tâm 30 phút ở 400 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C. Lớp tế bào bạch cầu sẽ tập trung ở lớp giữa của cột mẫu và có màu trắng trong (Hình 2).

độ 800 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C. Loại bỏ phần dung dịch và thêm vào 1 mL L15-FBS, dung dịch tế bào bạch cầu được bảo quản ở nhiệt độ 4°C.



Hình 3. Phương pháp thu lớp tế bào bạch cầu

*** Phương pháp đếm tế bào bạch cầu**

Nhuộm tế bào bạch cầu bằng thuốc nhuộm Trypan Blue (0,4%) (tỷ lệ 1:1, v/v), giữ 1 phút. Sau đó lấy 10 μ L hỗn hợp tế bào và thuốc nhuộm và sử dụng buồng đếm hồng cầu Neubauer improved để đếm tế bào bạch cầu.

Công thức tính mật độ tế bào:

$$\text{Mật độ (tế bào/mL)} = \frac{\text{Số lượng tế bào}}{\text{Thể tích (mL)}}$$

Số lượng tế bào: tổng số tế bào đếm được trong tất cả những ô vuông.

Thể tích: tổng thể tích của tất cả các ô vuông đếm.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và SPSS version 22.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả xác định giá trị LD₅₀

Khả năng gây chết của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* NNP 010103_17 trên cá rô phi (*Oreochromis* sp.) ở các mật độ vi khuẩn khác nhau được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ chết cộng dồn ở các lô thí nghiệm khi cảm nhiễm với các mật độ pha loãng khác nhau

Nồng độ pha loãng	Mật độ vi khuẩn (cfu/mL)	Số cá		Tổng số cộng dồn			Tỷ lệ chết cộng dồn (%)
		Chết	Sống	Chết	Sống	Tổng	
0	10^8	10	0	45	0	45	100
10^{-1}	10^7	9	1	35	1	36	97,22
10^{-2}	10^6	9	1	26	2	28	92,86
10^{-3}	10^5	7	3	17	5	22	77,27
10^{-4}	10^4	6	4	10	9	19	52,63
10^{-5}	10^3	4	6	4	15	19	21,05

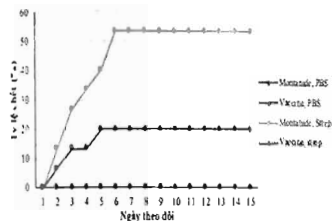
Từ kết quả bảng 1, hiệu gây chết 60% số cá thí nghiệm (I.D.₅₀) của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* NXP 010103_17 được xác định là $10^{1,7}$ cfu/mL.

Tỷ lệ chết ở các nghiệm thức thí nghiệm sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* được thể hiện ở bảng 2 và hình 4.

3.2. Xác định khả năng bảo hộ của vắc-xin

Bảng 2. Tỷ lệ cá chết cộng dồn ở các nghiệm thức thí nghiệm sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae*

Ngày theo dõi	NT 1. Cá tiêm chất bổ trợ Montanide, và không cảm nhiễm <i>S. agalactiae</i>		NT 2. Cá tiêm vắc-xin và PBS và không cảm nhiễm <i>S. agalactiae</i>		NT 3. Cá tiêm chất bổ trợ Montanide và cảm nhiễm <i>S. agalactiae</i>		NT 4. Cá tiêm vắc-xin và cảm nhiễm <i>S. agalactiae</i>	
	Số cá chết cộng dồn (con)	Tỷ lệ cá chết cộng dồn (%)	Số cá chết cộng dồn (con)	Tỷ lệ cá chết cộng dồn (%)	Số cá chết cộng dồn (con)	Tỷ lệ cá chết cộng dồn (%)	Số cá chết cộng dồn (con)	Tỷ lệ cá chết cộng dồn (%)
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	2	13,33	1	6,66
3	0	0	0	0	4	26,66	2	13,33
4	0	0	0	0	5	33,33	2	13,33
5	0	0	0	0	6	40	3	20
6	0	0	0	0	8	53,33	3	20
7	0	0	0	0	8	53,33	3	20
8	0	0	0	0	8	53,33	3	20
9	0	0	0	0	8	53,33	3	20
10	0	0	0	0	8	53,33	3	20
11	0	0	0	0	8	53,33	3	20
12	0	0	0	0	8	53,33	3	20
13	0	0	0	0	8	53,33	3	20
14	0	0	0	0	8	53,33	3	20
15	0	0	0	0	8	53,33	3	20



Hình 4. Tỷ lệ chết của cá sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae*

Theo kết quả thể hiện ở hình 4, tỷ lệ chết không xuất hiện ở hai nghiệm thức đối chứng không cảm nhiễm vi khuẩn. Tỷ lệ chết ở nghiệm thức cá tiêm chất bổ trợ Montanide và cảm nhiễm vi khuẩn lên đến 53,33% trong khi đó tỷ lệ chết chỉ 20% ở nghiệm thức sử dụng vắc-xin trước khi cảm nhiễm. Kết quả này cho thấy vắc-xin có hiệu quả phòng bệnh cao với tỉ lệ bảo hộ (RPS) là 62,5%. Điều chế vắc-xin bất hoạt toàn bộ tế bào là phương pháp đầu tiên để phát triển vắc-xin trong nuôi trồng thủy sản. Loại vắc-xin này đã được chứng minh là một phương pháp phòng ngừa và kiểm soát hiệu quả các bệnh khác nhau. Ưu điểm chính của vắc-xin bất hoạt so với vắc-xin suy yếu sống liên quan đến an toàn, vì mầm bệnh đã chết không thể gây bệnh nhưng chúng có thể tạo ra phản ứng miễn dịch hiệu quả [4]. Evans và cộng sự (2006) đã xác nhận rằng vắc-xin điều chế từ *S. agalactiae* bất hoạt bằng formalin có thể sử dụng trong hạn chế dịch bùng phát theo chu kỳ, và có hiệu quả phòng trị bệnh do liên cầu khuẩn *S. agalactiae* khi tiêm vào xoang bụng cá rô phi (5-30 g) đã cho tỷ lệ bảo hộ 25-80% dẫn cả khi tiến hành thí nghiệm gây bệnh thực nghiệm [9].

Ở các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn, cá bị bệnh thể hiện các dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá: cá hoạt động chậm chạp, bơi lơ dờ, mắt lồi đục, gan sưng to, kích thước thân tăng lên rõ rệt (Hình 5).

Vi khuẩn phân lập từ não và thận cá bệnh trên môi trường TSA cho 1 loại khuẩn lạc hình tròn, nhỏ, màu trắng đục (Hình 6A). Tiến hành nhuộm Gram khuẩn lạc thu được đã xác nhận các chủng vi khuẩn phân lập được từ cá thí nghiệm hấp hối hoặc đã chết thuộc nhóm vi khuẩn Gram (+), hình cầu, có thể ở dạng tế bào riêng lẻ hoặc từng cặp hoặc chuỗi dài

(Hình 6B) và kết quả thử phản ứng ngưng kết Lancefield cho kết quả là *S. agalactiae* nhóm B.



Hình 5. Cá rô phi thí nghiệm mắt lồi đục, có dấu hiệu gan sưng to và chiếm phần lớn khoang bụng



Hình 6. Khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường TSA (A) và hình dạng tế bào vi khuẩn quan sát bằng phương pháp nhuộm Gram (B)

3.3. Ảnh hưởng của vắc-xin lên số lượng tế bào bạch cầu của cá

Số lượng tế bào bạch cầu ở lách và máu cá ở các lô thí nghiệm trước và sau khi tiêm vắc-xin và sau khi cảm nhiễm được thể hiện ở bảng 3, 4, 5.

Bảng 3. Số lượng tế bào bạch cầu ở lách và máu trước khi tiêm vắc-xin hoặc chất bổ trợ

Nghiệm thức	Tế bào bạch cầu (10^6 tế bào/mL)	
	Lách	Máu
Cá trước khi tiêm chất bổ trợ	1,3-1,7	1,3-1,5
Cá trước khi tiêm vắc-xin	1,3-1,7	1,3-1,5

Bảng 4. Số lượng tế bào bạch cầu ở lách và máu sau khi tiêm vắc-xin hoặc chất bổ trợ

Nghiệm thức	Tế bào bạch cầu (10^6 tế bào/mL)	
	Lách	Máu
Cá tiêm chất bổ trợ	5,1-5,6	3,1-3,8
Cá tiêm vắc-xin	7,2-7,8	3,4-4,0

Bảng 5. Số lượng tế bào bạch cầu ở lách và máu sau khi cảm nhiễm *S. agalactiae*

Thí nghiệm thực	Tế bào bạch cầu (10^6 tế bào/mL)	
	Lách	Máu
Cả tiêm chất bổ trợ và không cảm nhiễm <i>S. agalactiae</i>	1,1-1,3	1,3-1,4
Cả tiêm vắc-xin và không cảm nhiễm <i>S. agalactiae</i>	1,7-2,1	1,7-1,9
Cả tiêm chất bổ trợ và cảm nhiễm <i>S. agalactiae</i>	0,3-0,5	0,2-0,6
Cả tiêm vắc-xin và cảm nhiễm <i>S. agalactiae</i>	8-10,5	4,8-5,1

Số lượng tế bào bạch cầu của cá sau khi tiêm chất bổ trợ tăng lên lần lượt từ $1,3 \times 10^6$ tế bào/mL - $1,7 \times 10^6$ tế bào/mL đến $5,1 \times 10^6$ tế bào/mL - $5,6 \times 10^6$ tế bào/mL ở lách và từ $1,3 \times 10^6$ tế bào/mL - $1,5 \times 10^6$ tế bào/mL đến $3,1 \times 10^6$ tế bào/mL - $3,8 \times 10^6$ tế bào/mL ở máu. Số lượng tế bào bạch cầu của cá sau khi tiêm vắc-xin tăng cao lần lượt từ $1,3 \times 10^6$ tế bào/mL - $1,7 \times 10^6$ tế bào/mL đến $7,2 \times 10^6$ tế bào/mL - $7,8 \times 10^6$ tế bào/mL ở lách và từ $1,3 \times 10^6$ tế bào/mL - $1,5 \times 10^6$ tế bào/mL đến $3,4 \times 10^6$ tế bào/mL - $4,0 \times 10^6$ tế bào/mL ở máu. Mặc dù đều có sự tăng lên của tế bào bạch cầu ở cá sau khi tiêm chất bổ trợ hoặc vắc-xin, nhưng tế bào bạch cầu ở cá được tiêm vắc-xin vẫn có số lượng tăng cao hơn so với số lượng tế bào bạch cầu ở cá chỉ được tiêm chất bổ trợ.

Lách là cơ quan tạo máu và biệt hóa tế bào máu do đó khi sử dụng vắc-xin hoặc chất bổ trợ đã kích thích lách sản xuất và biệt hóa nhiều tế bào bạch cầu trước khi đưa vào hệ thống tuần hoàn. Điều này giải thích cho sự cao hơn của số lượng tế bào bạch cầu ở lách so với số lượng bạch cầu ở máu ở cả hai nhóm thí nghiệm. Sự gia tăng tế bào bạch cầu sau khi tiêm vắc-xin và chất bổ trợ cho thấy vắc-xin và chất bổ trợ đã hiệu quả kích thích hệ thống miễn dịch ở cá thí nghiệm.

Từ bảng 5 cho thấy, số lượng bạch cầu ở lách và máu ở hai thí nghiệm không cảm nhiễm vi khuẩn không thay đổi và có số lượng như ban đầu. Trong khi đó, ở thí nghiệm cảm nhiễm vi khuẩn và không sử dụng vắc-xin số lượng tế bào bạch cầu ở máu và lách giảm một cách rõ rệt chỉ còn $0,2 \times 10^6$ tế bào/mL - $0,6 \times 10^6$ tế bào/mL ở máu và $0,3 \times 10^6$ tế

bào/mL - $0,5 \times 10^6$ tế bào/mL ở lách, kết quả này cho thấy cá thí nghiệm đã không có phản ứng phòng vệ đặc hiệu khi bị mầm bệnh tấn công, dẫn đến tế bào bạch cầu giảm. Cá ở thí nghiệm sử dụng vắc-xin, số lượng bạch cầu tăng cao đạt 8×10^6 tế bào/mL - $10,5 \times 10^6$ tế bào/mL ở lách và $4,8 \times 10^6$ tế bào/mL - $5,1 \times 10^6$ tế bào/mL ở máu, điều này cho thấy cá sau khi tiêm vắc-xin đã có phản ứng phòng vệ đặc hiệu biểu hiện bằng sự gia tăng số lượng bạch cầu khi có tác nhân gây bệnh xâm nhập. Sự khác biệt giữa cá đã được tiêm phòng vắc-xin hoặc chất bổ trợ là đáp ứng miễn dịch tế bào và/hoặc đáp ứng miễn dịch bẩm sinh xuất hiện khi cá được tiêm chất bổ trợ [19] và đáp ứng miễn dịch thích nghi được quan sát thấy ở cá đã được tiêm phòng vắc-xin [10; 18].

4. KẾT LUẬN & KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Liều gây chết 60% số cá thí nghiệm (LD₆₀) của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* NNP 010103_17 là $10^{4,7}$ cfu/mL.

Khả năng bảo hộ (RPS) của vắc-xin *S. agalactiae* bất hoạt bằng formalin đối với cá rô phi (*Oreochromis* sp.) là 62,5%.

Cá thí nghiệm được tiêm vắc-xin xuất hiện đáp ứng miễn dịch thích nghi thể hiện ở sự gia tăng số lượng tế bào bạch cầu và cao hơn so với số lượng bạch cầu ở cá thí nghiệm không được tiêm hoặc chỉ được tiêm chất bổ trợ sau khi cảm nhiễm với *S. agalactiae*.

4.2. Kiến nghị

Vắc-xin bất hoạt *S. agalactiae* bằng formalin đã có hiệu quả trong phòng bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* ở cá rô phi (*Oreochromis* sp.). Có thể ứng dụng rộng rãi loại vắc-xin này trong thực tiễn ở quy mô rộng hơn. Tuy nhiên cần có những nghiên cứu thử nghiệm với các phương pháp sử dụng khác nhau để xác định phương pháp sử dụng hợp lý, thuận tiện và giảm giá thành.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al-Harbi, A. H. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Aquaculture*, 464, 515-520.
- Anderson, D. P. (1974). Fish immunology. T. F. H Publications Incorporated.
- Anshary, H., Kumiawan, R. A., Sriwulan, S., Ramli, R., Baxa, D. V. (2014). Isolation and molecular identification of the etiological agents of Streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis*

niloticus) cultured in net cages in Lake Sentani, Papua, Indonesia. SpringerPlus, 3, 627.

4. Austin, B. (2012). Infectious disease in aquaculture: Prevention and control. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Cambridge UK.

5. Chaiwarith, R., Jullaket, W., Bunchoo, M., Nuntachit, N., Sirisanthana, T. & Supparatpinyo, K. (2011). *Streptococcus agalactiae* in adults at Chiang Mai University Hospital: a retrospective study. BMC infectious diseases, 11, 149.

6. Chideroli, R. T., Amoroso, N., Mainardi, R. M., Suphoronski, S. A., De Padua, S. B., Alfieri, A. F., Alfieri, A. A., Mosela, M., Morales, A. T. & De Oliveira, A. G. (2017). Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. Aquaculture, 479, 45-51.

7. Delannoy, C. M., Zadoks, R. N., Crumlish, M., Rodgers, D., Lainson, F. A., Ferguson, H., Turnbull, J. & Fontaine, M. C. (2016). Genomic comparison of virulent and non-virulent *Streptococcus agalactiae* in fish. Journal of fish diseases, 39, 13-29.

8. Eldar, A., Bejerano, Y., Bercovier, H. (1994). *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. Current Microbiology, 28, 139-143.

9. Evans, J., Klesius, P. H. and Shoemaker, C. A. (2006). An overview of *Streptococcus* in warm-water fish. Aquaculture Health International, 7, 10-14.

10. Gudding, R., Lillehaug, A. and Evensen, Ø. (2014). Fish Vaccination. Edited by: Gudding R. Lillehaug A and Evensen. John Wiley & Sons, Ltd. Sussex UK.

11. Hastein, T., Gudding, R., Evensen, O. (2005). Bacterial vaccines for fish-an update of the current situation worldwide. Developments in biologicals, 121, 55-74.

12. Ip, M., Ang, I., Fung, K., Liyanapathirana, V., Luo, M.J. & Lai, R. (2016). Hypervirulent clone of group B *Streptococcus* serotype III sequence type 283. Hong Kong, 1993-2012. Emerging infectious diseases, 22, 1800.

13. Kawamura, Y., Itoh, Y., Mishima, N., Ohkusu, K., Kasai, H., Ezaki, T. (2005). High genetic similarity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus*

difficilis. *S. difficilis* Eldar et al. 1995 is a later synonym of *S. agalactiae* Lehmann and Neumann 1896 (Approved Lists 1980). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 961-965.

14. Keefe, G. P. (1997). *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. The Canadian veterinary journal, 38, 429.

15. Mian, G., Godoy, D., Leal, C., Yuhara, T., Costa, G. & Figueiredo, H. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. Veterinary microbiology, 136, 180-183.

16. Newman, S. G. (1993). Bacterial vaccines for fish. Annual Review of Fish Diseases, 3, 145-185.

17. Perera, R., Johnson, S. K., Collins, M. D. and Lewis, D. H. (1994). *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* x *T. aurea* hybrids. Journal of Aquatic Animal Health, 10, 294-299.

18. Sarder, M. R. I., Thompson, K. D., Penman, D. J. and McAndrew, B. J. (2001). Immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) clones: I. Non-specific responses. Developmental & Comparative Immunology, 25, 37-46.

19. Schijns, V. E. and Tangerås, A. (2005). Vaccine adjuvant technology: from theoretical mechanisms to practical approaches. Developments in Biologicals, 121, 127-134.

20. Skoff, T. H., Farley, M. M., Petit, S., Craig, A. S., Schaffner, W., Gershman, K., Harrison, L. H., Lynfield, R., Mohle-Boetani, J., Zansky, S., Albanese, B. A., Stefonek, K., Zell, E. R., Jackson, D., Thompson, T., Schrag, S. J. (2009). Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. Clinical infectious diseases, 49 (1), 85-92.

21. Sørensen, U. B. S., Poulsen, K., Ghezzi, C., Margarit, I. & Kliban, M. (2010). Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. MBio, 1, e00178-00110.

22. Zamri-Saad, M., Amal, M. N., Siti-Zahrah, A. (2010). Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. Journal of Comparative Pathology, 143, 227-229.

Bảng 5. Số lượng tế bào bạch cầu ở lách và máu sau khi cảm nhiễm *S. agalactiae*

Thí nghiệm thực	Tế bào bạch cầu (10^6 tế bào/mL)	
	Lách	Máu
Cả tiêm chất bổ trợ và không cảm nhiễm <i>S. agalactiae</i>	1,1-1,3	1,3-1,4
Cả tiêm vắc-xin và không cảm nhiễm <i>S. agalactiae</i>	1,7-2,1	1,7-1,9
Cả tiêm chất bổ trợ và cảm nhiễm <i>S. agalactiae</i>	0,3-0,5	0,2-0,6
Cả tiêm vắc-xin và cảm nhiễm <i>S. agalactiae</i>	8-10,5	4,8-5,1

Số lượng tế bào bạch cầu của cá sau khi tiêm chất bổ trợ tăng lên lần lượt từ $1,3 \times 10^6$ tế bào/mL - $1,7 \times 10^6$ tế bào/mL đến $5,1 \times 10^6$ tế bào/mL - $5,6 \times 10^6$ tế bào/mL ở lách và từ $1,3 \times 10^6$ tế bào/mL - $1,5 \times 10^6$ tế bào/mL đến $3,1 \times 10^6$ tế bào/mL - $3,8 \times 10^6$ tế bào/mL ở máu. Số lượng tế bào bạch cầu của cá sau khi tiêm vắc-xin tăng cao lần lượt từ $1,3 \times 10^6$ tế bào/mL - $1,7 \times 10^6$ tế bào/mL đến $7,2 \times 10^6$ tế bào/mL - $7,8 \times 10^6$ tế bào/mL ở lách và từ $1,3 \times 10^6$ tế bào/mL - $1,5 \times 10^6$ tế bào/mL đến $3,4 \times 10^6$ tế bào/mL - $4,0 \times 10^6$ tế bào/mL ở máu. Mặc dù đều có sự tăng lên của tế bào bạch cầu ở cả sau khi tiêm chất bổ trợ hoặc vắc-xin, nhưng tế bào bạch cầu ở cá được tiêm vắc-xin vẫn có số lượng tăng cao hơn so với số lượng tế bào bạch cầu ở cá chỉ được tiêm chất bổ trợ.

Lách là cơ quan tạo máu và biệt hóa tế bào máu do đó khi sử dụng vắc-xin hoặc chất bổ trợ đã kích thích lách sản xuất và biệt hóa nhiều tế bào bạch cầu trước khi đưa vào hệ thống tuần hoàn. Điều này giải thích cho sự cao hơn của số lượng tế bào bạch cầu ở lách so với số lượng bạch cầu ở máu ở cả hai nhóm thí nghiệm. Sự gia tăng tế bào bạch cầu sau khi tiêm vắc-xin và chất bổ trợ cho thấy vắc-xin và chất bổ trợ đã hiệu quả kích thích hệ thống miễn dịch ở cá thí nghiệm.

Từ bảng 5 cho thấy, số lượng bạch cầu ở lách và máu ở hai thí nghiệm không cảm nhiễm vi khuẩn không thay đổi và có số lượng như ban đầu. Trong khi đó, ở thí nghiệm cảm nhiễm vi khuẩn và không sử dụng vắc-xin số lượng tế bào bạch cầu ở máu và lách giảm một cách rõ rệt chỉ còn $0,2 \times 10^6$ tế bào/mL - $0,6 \times 10^6$ tế bào/mL ở máu và $0,3 \times 10^6$ tế

bào/mL - $0,5 \times 10^6$ tế bào/mL ở lách, kết quả này cho thấy cá thí nghiệm đã không có phản ứng phòng vệ đặc hiệu khi bị mầm bệnh tấn công, dẫn đến tế bào bạch cầu giảm. Cá ở thí nghiệm thức sử dụng vắc-xin, số lượng bạch cầu tăng cao đạt 8×10^6 tế bào/mL - $10,5 \times 10^6$ tế bào/mL ở lách và $4,8 \times 10^6$ tế bào/mL - $5,1 \times 10^6$ tế bào/mL ở máu, điều này cho thấy cá sau khi tiêm vắc-xin đã có phản ứng phòng vệ đặc hiệu biểu hiện bằng sự gia tăng số lượng bạch cầu khi có tác nhân gây bệnh xâm nhập. Sự khác biệt giữa cá đã được tiêm phòng vắc-xin hoặc chất bổ trợ là đáp ứng miễn dịch tế bào và/hoặc đáp ứng miễn dịch bẩm sinh xuất hiện khi cá được tiêm chất bổ trợ [19] và đáp ứng miễn dịch thích nghi được quan sát thấy ở cá đã được tiêm phòng vắc-xin [10; 18].

4. KẾT LUẬN & KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Liều gây chết 60% số cá thí nghiệm (LD_{60}) của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* NNP 010103_17 là $10^{1,7}$ cfu/mL.

Khả năng bảo hộ (RPS) của vắc-xin *S. agalactiae* bất hoạt bằng formalin đối với cá rô phi (*Oreochromis* sp.) là 62,5%.

Cá thí nghiệm được tiêm vắc-xin xuất hiện đáp ứng miễn dịch thích nghi thể hiện ở sự gia tăng số lượng tế bào bạch cầu và cao hơn so với số lượng bạch cầu ở cá thí nghiệm không được tiêm hoặc chỉ được tiêm chất bổ trợ sau khi cảm nhiễm với *S. agalactiae*.

4.2. Kiến nghị

Vắc-xin bất hoạt *S. agalactiae* bằng formalin đã có hiệu quả trong phòng bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* ở cá rô phi (*Oreochromis* sp.). Có thể ứng dụng rộng rãi loại vắc-xin này trong thực tiễn ở quy mô rộng hơn. Tuy nhiên cần có những nghiên cứu thử nghiệm với các phương pháp sử dụng khác nhau để xác định phương pháp sử dụng hợp lý, thuận tiện và giảm giá thành.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Al-Harbi, A. H. (2016). Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Aquaculture*, 464, 515-520.
2. Anderson, D. P. (1974). Fish immunology. T. F. H Publications Incorporated.
3. Anshary, H., Kumsawan, R. A., Sriwulan, S., Ramli, R., Baxa, D. V. (2014). Isolation and molecular identification of the etiological agents of Streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis*