

AN TOÀN VÀ HIỆU LỰC CỦA VACXIN HAN-STREPTILA TRÊN CÁ RÔ PHI NUÔI THƯƠNG PHẨM

Hồ Thu Thủy^{1*}, Nguyễn Hữu Vũ¹, Trần Thị Khánh Chi¹,
Vũ Đức Hạnh³, Nguyễn Bá Tiếp³, Nguyễn Việt Không², Lại Thị Lan Hương³

¹Trung tâm nghiên cứu và sản xuất sinh phẩm Công ty cổ phần dược và vật tư thú y (Hanvet)

²Viện Thú y Quốc gia, ³Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: hothuthuy74@gmail.com

Ngày nhận bài: 01.10.2018

Ngày chấp nhận đăng: 14.04.2019

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá an toàn và hiệu lực của vacxin Han-Streptila trên cá rô phi nuôi thương phẩm bằng phương pháp tiêm tại Hậu Giang, Tiền Giang và Đồng Tháp và phương pháp cho ăn tại An Giang, Vĩnh Long và Đồng Tháp. Mỗi khu vực được thực hiện trên 03 lô thí nghiệm gồm một lô đối chứng, lô miễn dịch và lô an toàn. Tính an toàn của vacxin được xác định qua các biểu hiện bất thường ở cá thí nghiệm; hiệu lực của vacxin được xác định bằng cách so sánh tỷ lệ cá chết tích lũy cuối cùng của nhóm vắc xin, nhóm đối chứng trong khi khảo nghiệm hoặc sau khi công cường độc và được đánh giá thông qua tỉ lệ sống tương đối (RPS-Relative Percentage Survival). Kết quả cho thấy, vacxin an toàn không gây chết hay ảnh hưởng tới tốc độ tăng trưởng của cá. Về hiệu lực, vacxin dùng phương pháp tiêm trên cá rô phi có trọng lượng từ 10 g/con trở lên đạt tỷ lệ bảo hộ 66,9% sau 24 tuần; bằng phương pháp cho ăn trên cá có khối lượng từ 2,5 g/con trở lên đạt tỷ lệ bảo hộ 63,9% sau 24 tuần. Như vậy, vacxin Han-Streptila sản xuất ở quy mô công nghiệp từ chủng *Streptococcus agalactiae* trong điều kiện nuôi thương phẩm tại năm tỉnh ở phía Nam an toàn và có hiệu lực tốt.

Từ khóa: Cá rô phi, vacxin Han-Streptila, chủng *S. agalactiae* trên cá rô phi.

Safety and Efficacy of Vaccine Han-Streptila in Commercial Tilapia**ABSTRACT**

The objective of the present study was to determine the safety and efficacy of vaccine Han-Streptila in commercial tilapia by injection (in Hau Giang, Tien Giang and Dong Thap provinces) and by oral route (in An Giang, Vinh Long and Dong Thap provinces). The control, immune and safe groups were set up in each province. The safety of the vaccine was determined by observing the abnormalities of experimental fish; the efficacy of the vaccine was determined by comparing the final cumulative mortality between the vaccinated group and the control group during the trial or after challenge test. This also was evaluated through relative percentage survival (RPS). The results showed that the vaccine had no effect on mortality and growth of fish. The vaccine efficacy through injection with tilapia of 10 g/p achieved 66.9% and oral route for fish 2.5 g/p achieved 63.9% protection after 24 weeks. Therefore, HAN-STREPTILA vaccine tested in the South of Vietnam was safe and highly effective.

Keywords: Tilapia, Han-Streptila vaccine, *S. agalactiae* sp.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngành thủy sản có tốc độ phát triển nhanh hơn so với các ngành nông nghiệp truyền thống khác như ngành trồng trọt và chăn nuôi. Trong những năm vừa qua, ngành thủy sản có tốc độ phát triển nhanh nhất trong các lĩnh vực sản xuất thực phẩm cho con người (Khan *et al.*,

2011). Tuy nhiên, việc chuyển đổi cơ cấu nuôi trồng sang nuôi thâm canh đã tạo ra nhiều hệ lụy đến môi trường và đặc biệt là gây ra nhiều loại dịch bệnh nguy hiểm, gây tổn thất kinh tế cho ngành nuôi trồng thủy sản trên toàn thế giới. Hiện nay, tại các khu nuôi thủy hải sản nói chung, vùng nuôi cá rô phi nói riêng việc sử dụng kháng sinh trong phòng trị bệnh tràn lan,

không đúng cách gây ra hiện tượng kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản, dẫn đến hiệu quả điều trị bệnh không có hoặc rất thấp (Sarter *et al.*, 2007). Ngoài ra, việc dùng kháng sinh không đúng cách gây ảnh hưởng tới môi trường, chất lượng sản phẩm và sức khỏe con người. Bên cạnh đó, các hình thức nuôi công nghiệp, kể cả nuôi đơn hay ghép, đều được nuôi ở mật độ cao, mầm bệnh sẽ dễ dàng lan truyền từ cá thể này sang cá thể khác. Do đó, việc tìm giải pháp an toàn như thảo dược hay vaccin để phòng bệnh cho động vật thủy sản là rất cần thiết.

Trên thế giới có trên 30 loại vaccin phòng bệnh do vi khuẩn, 2 loại vaccin phòng bệnh do virus được sử dụng trên nhiều đối tượng nuôi thủy sản góp phần giảm đáng kể lượng kháng sinh trong điều trị bệnh thủy sản, một số quốc gia hầu như không còn dùng đến kháng sinh (Sommerset *et al.*, 2005; Brudeseth *et al.*, 2013). Những vaccin đầu tiên được thương mại hóa là các vaccin phòng bệnh xuất huyết và *vibriosis* ở Mỹ. Tại Việt Nam, hiện cũng có nhiều đề tài nghiên cứu vaccin phòng bệnh cho cá (Nguyễn Mạnh Thắng và cs., 2009). Tuy nhiên chưa có vaccin nào được ứng dụng trong thực tiễn (Nguyễn Hữu Dũng & Trần Văn Hích, 2013).

Vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi có tần suất xuất hiện từ 95-100% ở các tháng có nhiệt độ cao với tỷ lệ gây chết cộng dồn lên đến 42-100% đàn cá nuôi, làm thiệt hại nghiêm trọng cho nghề nuôi cá rô phi nuôi thương phẩm tại Việt Nam, do việc dùng kháng sinh không đúng cách, vi khuẩn bị kháng kháng sinh nên điều trị bệnh bằng kháng sinh không hiệu quả (Phạm Hồng Quân và cs., 2013).

Việc sản xuất được vắc xin để phòng bệnh *S. agalactiae* trên cá rô phi nuôi thương phẩm dùng cả phương pháp cho ăn và phương pháp tiêm là yêu cầu cấp thiết trong tình hình dịch bệnh trên cá rô phi hiện nay. Vắc xin sản xuất được sẽ giúp người nuôi có một phương pháp phòng bệnh hiệu quả nhất nhằm hạn chế việc sử dụng kháng sinh, giảm rủi ro do dịch bệnh hướng tới mục tiêu giảm kháng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Vaccin Han-Streptila của công ty Hanvet sản xuất, dạng vô hoạt keo phen (mật độ vi khuẩn trong một liều vaccin là 2×10^8 CFU/ml).

- Cá rô phi (vằn) giống khỏe mạnh, sạch bệnh, có trọng lượng trung bình 10 g/con, cá rô phi (điều hồng) giống khỏe mạnh, sạch bệnh có trọng lượng trung bình 2,5 g/con. Trước khi làm thí nghiệm được nuôi và cho thích nghi với môi trường 3 ngày.

- Phần mềm đọc các đặc tính sinh học của vi khuẩn dùng Kit API20Strep (Biomérieux, Pháp), môi trường thạch máu, Brain Heart Infusion (BHI) agar...

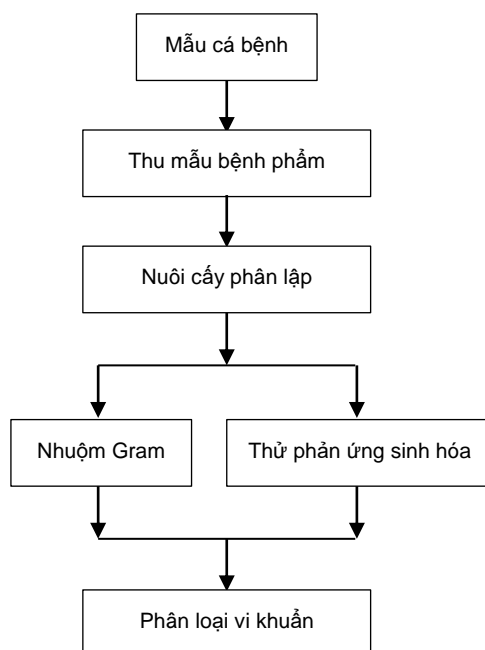
- Ao (có diện tích khoảng 2.000 m² ngăn làm 3 ô, trong đó một ô làm lô đối chứng, một lô miễn dịch và một lô an toàn), lồng (gồm một lồng đối chứng, một lồng miễn dịch và một lồng an toàn), bể (dùng để làm vaccin phương pháp cho ăn trước khi thả vào lồng).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm đánh giá an toàn và hiệu lực được thực hiện bằng 2 đường dùng là phương pháp cho ăn và phương pháp tiêm.

- Phương pháp tiêm: Thí nghiệm được thực hiện ở ba tỉnh Hậu Giang, Tiền Giang và Đồng Tháp, mỗi tỉnh bố trí một ao ngẫu nhiên và an toàn sinh học có diện tích khoảng 2.000 m² ngăn làm 3 ô (một ô làm lô đối chứng, một lô miễn dịch và một lô an toàn). Cá ở mỗi lô thí nghiệm là 1.200 con cá rô phi (vằn) đã được kiểm nghiệm sạch bệnh (10 g/con), tiêm xoang bụng, cho cá ăn 2 lần/ngày và quan sát trong vòng 10 ngày.

- Phương pháp cho ăn: Thí nghiệm được thực hiện trên khu bè nuôi ở ba tỉnh An Giang, Đồng Tháp và Vĩnh Long, mỗi khu bè được thực hiện trên 3 lồng (một lồng đối chứng, một lồng miễn dịch và một lồng an toàn). Cá ở mỗi lồng thí nghiệm là 15.000 con cá rô phi (điều hồng) 2,5 g/con đã kiểm nghiệm sạch bệnh, trộn 1 liều vaccin /con (mật độ vi khuẩn trong một liều vaccin là 2×10^8 CFU/ml) vào lượng cám cá ăn trong 1 lần/ngày trong bể, sau đó thả cá vào lồng tương ứng.



Hình 1. Sơ đồ phân lập vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*

Lô đối chứng không dùng vaccin, lô an toàn dùng vaccin gấp 2 lần quy định, lô miễn dịch dùng một liều vaccin theo quy định.

2.3. Các chỉ tiêu đánh giá

* Đánh giá an toàn của vaccin

Tính an toàn của vaccin được ghi nhận qua các biểu hiện bất thường ở cá thí nghiệm (cá chết hoặc có biểu hiện bất thường).

- Cá chết: Trong 21 ngày sau khi tiêm vaccin nếu có cá chết cấp sẽ được giải phẫu để xác định tác nhân gây chết. Tỷ lệ cá chết tích lũy ở nhóm tiêm vaccin được so sánh với nhóm không được tiêm vaccin để đánh giá tính an toàn.

- Cá có biểu hiện bất thường: Trong 21 ngày sau khi tiêm vaccin nếu cá có biểu hiện bất thường như sưng, viêm, hoại tử, xung huyết, xuất huyết tại gan, tim, thận, ruột, tiến hành lấy mẫu xác định biểu hiện bất thường của cơ thể cá. Đánh giá sinh trưởng của cá thông qua việc ghi nhận chiều dài và trọng lượng cơ thể cá.

2.4. Xử lý thống kê

Dữ liệu trong thí nghiệm được tính toán và xử lý theo phần mềm Microsoft Excel 2010.

*Đánh giá hiệu lực của vaccin

Công cường độ: Hiệu lực của vaccin được xác định bằng cách so sánh tỷ lệ cá chết tích lũy cuối cùng do *S. agalactiae* của nhóm vaccin và nhóm đối chứng trong khi khảo nghiệm hoặc sau khi công cường độ. Phương pháp công cường độ: Cá bố trí công cường độ ở lô khảo nghiệm bằng phương pháp cho ăn là 300 con/nghiệm thức và lô khảo nghiệm bằng phương pháp tiêm là 90 con/nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Sau 16 tuần, 24 tuần sử dụng vaccin cá được thử thách bằng chủng vi khuẩn *S. agalactiae* cường độ với liều có mật độ vi khuẩn sống là $0,2 \text{ ml} \times 10^9 \text{ CFU/ml/con cá}$. Số cá công cường độ ở các lô dùng vaccin bằng đường tiêm 90 con/lô, bằng phương pháp cho ăn 300 con/lô. Vị trí tiêm ở xoang bụng. Được theo dõi trong vòng 10 ngày sau khi công cường độ.

*Nuôi cấy và phân lập vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi bằng phương pháp nghiên cứu vi khuẩn (Frerich, 1993), thử các đặc tính sinh học bằng test API20Strep: Mẫu thu thập từ cá rô phi bị bệnh với các dấu hiệu bệnh lý như bơi lơ đờ, mất định hướng, chướng bụng, xuất huyết, lồi mắt, sưng ruột; các cơ quan nội tạng như gan, thận, lách sưng to, xuất huyết, bạc màu. Mẫu cá sau

khi được vớt khỏi mặt nước được tiến hành phân tích ngay và chỉ những mẫu bệnh phẩm còn sống mới được sử dụng để phân lập vi khuẩn. Trước khi phân lập vi khuẩn, mặt ngoài cơ thể cá được khử trùng bằng cồn 70°C và lau sạch. Sau đó, tiến hành mổ cá bằng dao mổ và kéo tiết trùng. Dấu hiệu bệnh lý bên trong cá được ghi nhận. Kế đến, dùng dao mổ tiết trùng rạch một đường trên gan, thận và tụy tạng. Đặt que cấy vào chỗ vừa rạch, xoay nhẹ và cấy trên môi trường thạch. Phân lập vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy Brain Heart Infusion có bổ sung 1,5% NaCl hoặc trong môi trường thạch máu. Đĩa cấy được ủ trong 30°C trong 24-48 h. Các khuẩn lạc phát triển trên môi trường BHI được chọn để xác định về đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa. Các chủng vi khuẩn phân lập được trữ ở -80°C trong môi trường Brain Heart Infusion broth (BHIB, Merck) có 25% glycerol để giữ giống. Các thí nghiệm được tiến hành tại Ban vi khuẩn - Trung tâm nghiên cứu và sản xuất sinh phẩm Công ty cổ phần Dược và vật tư thú y (Hanvet) và Viện Thú y Quốc gia.

Xác định giá trị RPS: Hiệu lực của vaccin được đánh giá thông qua tỉ lệ sống tương đối (RPS-Relative Percentage Survival):

$$RPS = 1 - \frac{\% \text{ Tỷ lệ chết trong lô sử dụng vaccin}}{\% \text{ Tỷ lệ chết trong lô đối chứng}} \times 100 (\%)$$

Vaccin được đánh giá là có hiệu lực khi chỉ số bảo hộ (RPS) của nhóm tiêm vaccin $\geq 60\%$ (Amend, 1981).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá an toàn của vaccin Han-Streptila

3.1.1. Tỷ lệ cá chết tích lũy trong 21 ngày sau khi sử dụng vaccin

Tỷ lệ cá chết tích lũy trong 21 ngày sau khi dùng vaccin ở các lô thí nghiệm bằng phương pháp cho ăn và đường tiêm được thể hiện trên bảng 1, 2 và hình 2.

Thí nghiệm cho ăn vaccin: Với $n = 15.000$ tỷ lệ cá chết ở nhóm không cho ăn vaccin trung bình

$\sim 2,43\%$ không có sự khác biệt so với $\sim 2,42\%$ ở nhóm an toàn và $\sim 2,43\%$ ở nhóm dùng vắc xin. Số cá chết được kiểm tra mổ khám kết quả xác định là không phải do vi khuẩn *S. agalactiae*.

Thí nghiệm tiêm vaccin: Từ số lượng cá chết ở các lô thí nghiệm với $n = 1.200$ ta thấy tỷ lệ cá chết ở nhóm được tiêm vaccin trung bình $\sim 2,50\%$, nhóm đối chứng trung bình $\sim 2,47\%$ và ở nhóm an toàn trung bình $\sim 2,42\%$, như vậy số cá chết ở các nhóm ít có sự khác biệt.

Như vậy, tiêm vaccin với liều gấp hai lần liều chỉ định không làm tăng đột biến tỷ lệ cá chết tích lũy so với đối chứng.

Quan sát ngoài: Việc dùng vaccin không tạo ra các phản ứng phụ, không ảnh hưởng xấu đến tốc độ sinh trưởng của cá, màu sắc vẩy, bắt mồi nhanh... Cá trước khi sử dụng vaccin ở các lô thí nghiệm bằng phương pháp tiêm có trọng lượng trung bình là $10 \pm 2,5$ g/con, chiều dài trung bình là $5 \pm 0,4$ cm/con, cá ở các ô khảo nghiệm đường ăn có trọng lượng trung bình $2,5 \pm 0,5$ g/con và chiều dài trung bình $3 \pm 0,2$ cm/con.

Kết thúc thí nghiệm: Đối với lô khảo nghiệm bằng phương pháp tiêm, cá ở các lô tiêm vaccin có lượng trung bình $83,83 \pm 8,5$ g/con, chiều dài trung bình $11,2 \pm 0,7$ cm/con, cá ở các lô đối chứng có lượng trung bình $83,25 \pm 8,3$ g/con và chiều dài trung bình $11,2 \pm 0,7$ cm/con. Đối với lô khảo nghiệm bằng phương pháp cho ăn, cá ở các ô cho ăn vaccin có trọng lượng trung bình là $13,37 \pm 4,5$ g/con chiều dài trung bình là $6,3 \pm 0,2$ cm/con cá ở các ô đối chứng có trọng lượng trung bình là $12,63 \pm 4,0$ g/con chiều dài trung bình là $6 \pm 0,2$ cm/con.

Kết quả trên cho thấy vaccin an toàn, cá từ 2,5 g/con sử dụng vaccin đường ăn, 10 g/con sử dụng vaccin đường tiêm với liều gấp 2 lần liều sử dụng, không ảnh hưởng tới tỷ lệ sống, tốc độ tăng trưởng và không gây bất thường cho cá.

3.2. Kết quả bảo hộ của vaccin Han-Streptila

3.2.1. Tỷ lệ bảo hộ

Bảng 3 cho thấy, ở các lô đối chứng cá chết sau khi công cường độc từ 98,9 đến 100%. Đối với các lô miễn dịch dùng vaccin bằng phương pháp cho ăn sau 16 tuần dùng vaccin có tỷ lệ cá

chết dao động từ 31,7 đến 32,2%, sau 24 tuần dùng vaccin tỷ lệ các chết dao động từ 36 đến 36,3%. Ở các lô dùng vaccin bằng phương pháp

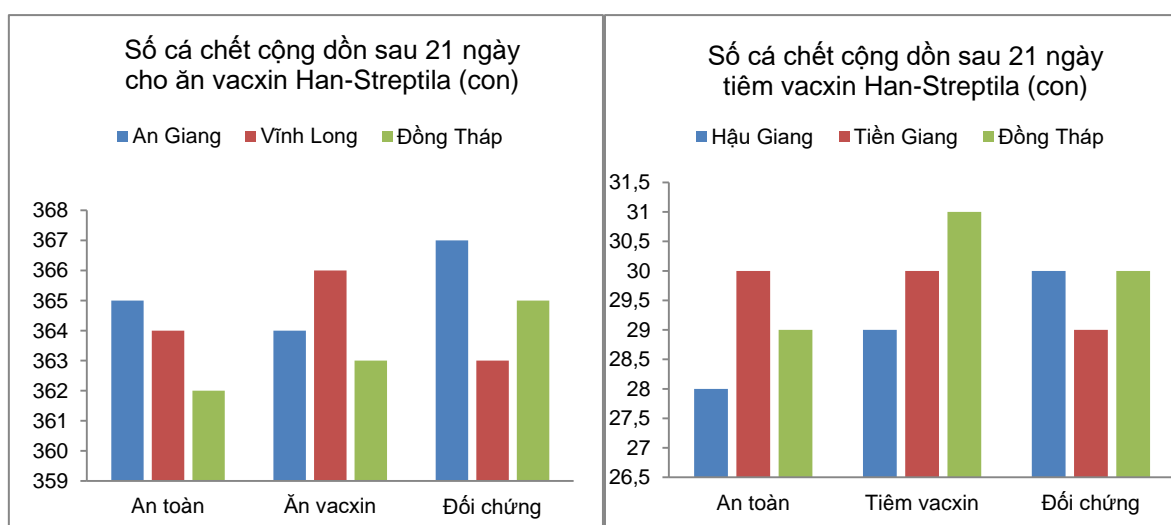
tiêm sau 16 tuần tỷ lệ cá chết dao động từ 23,3 đến 26,7%, sau 24 tuần tỷ lệ cá chết dao động từ 32,2 đến 33,3%.

Bảng 1. Số cá chết cộng dồn sau 21 ngày cho ăn vaccin Han-Streptila (con)

Địa điểm	An toàn	Ăn vaccin	Đối chứng
An Giang	365	364	367
Vĩnh Long	364	366	363
Đồng Tháp	362	363	365
Tỷ lệ chết trung bình (%)	2,42	2,43	2,43

Bảng 2. Số cá chết cộng dồn sau 21 ngày tiêm vaccin Han-Streptila (con)

Địa điểm	An toàn	Tiêm vaccin	Đối chứng
Hậu Giang	28	29	30
Tiền Giang	30	30	29
Đồng Tháp	29	31	30
Tỷ lệ chết trung bình (%)	2,42	2,50	2,47

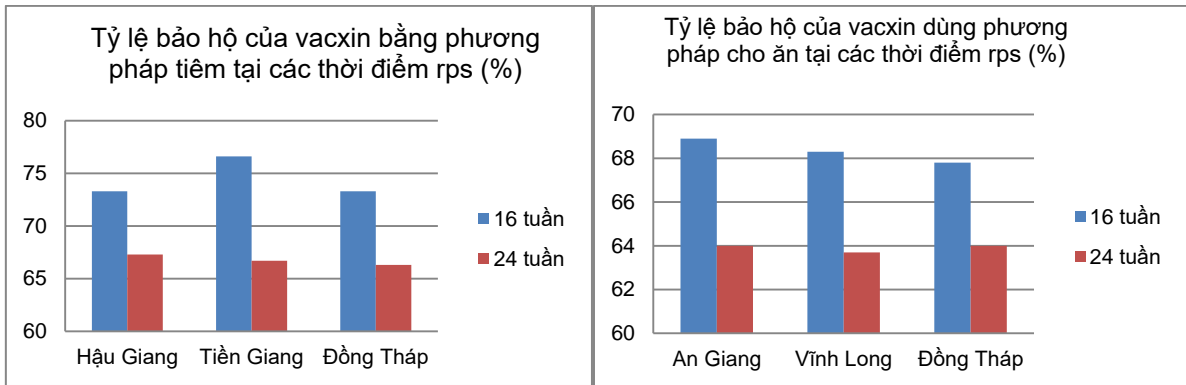


Hình 2. Số cá chết ở các lô thí nghiệm ăn và tiêm tại các điểm trong thời gian theo dõi an toàn

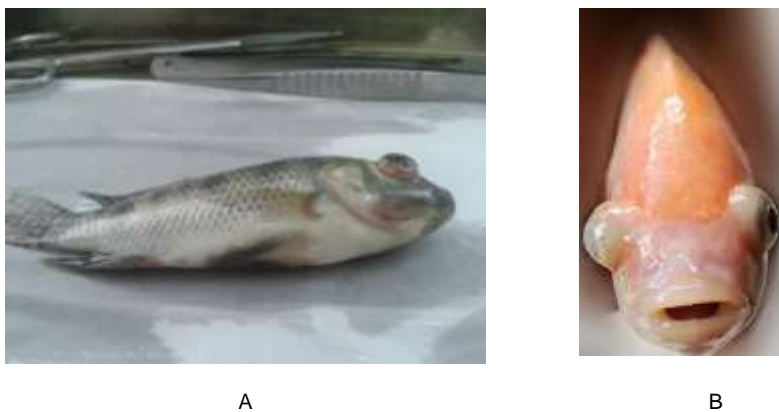
Bảng 3. Tỷ lệ cá chết sau công cường độc (%)

Thời gian dùng vaccin trước khi công cường độc (tuần)	Tỷ lệ cá chết ở các lô thí nghiệm bằng phương pháp cho ăn (n = 300)						Tỷ lệ cá chết ở các lô thí nghiệm bằng phương pháp tiêm (n = 90)					
	An Giang		Vĩnh Long		Đồng Tháp		Hậu Giang		Tiền Giang		Đồng Tháp	
	ĐC1	MD1	ĐC2	MD2	ĐC3	MD3	ĐC4	MD4	ĐC5	MD5	ĐC6	MD6
16	100	32	100	31,7	100	32,2	100	26,7	100	23,3	100	26,7
24	100	36,0	100	36,3	100	36,0	100	32,2	100	33,3	98,9	33,3

Ghi chú: ĐC: Đối chứng; MD: Miễn dịch



Hình 3. Tỷ lệ bảo hộ của vaccin ở các lô thí nghiệm tại từng thời điểm



Ghi chú: A- Xuất huyết ở mắt, B - Lông mắt

Hình 4. Cá thí nghiệm sau khi công cường độc



Ghi chú: A - Nuôi cấy trên môi trường Brain Heart Infusion Agar, B - Nhuộm Gram và soi trên kính hiển vi

Hình 5. Hình thái vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập được từ cá nhiễm bệnh sau công cường độc

Hình 3 cho thấy tỷ lệ bảo hộ của vaccin (RPS) ở lô khảo nghiệm bằng đường ăn sau 16 tuần dao động từ 67,8-68,9% trung bình ~ 68,3%; sau 24 tuần dao động từ 63,7-64%, trung bình

~ 63,9%. Tỷ lệ bảo hộ ở các lô khảo nghiệm bằng đường tiêm sau 16 tuần dao động từ 73,3-76,7% trung bình 74,4%; sau 24 tuần dao động từ 66,3-67,3% trung bình ~ 66,8%. Trên lý thuyết,

sử dụng vaccin bằng phương pháp phối trộn thức ăn là một biện pháp tối ưu cho đường đưa vaccin cho cá, giúp giảm stress, nhân lực và các tổn thương cho cá so với đường tiêm. Tuy nhiên, một nhược điểm của phương pháp này là việc không đồng nhất về hiệu quả đã được nhiều nghiên cứu chỉ ra do các kháng nguyên sẽ bị giảm đi do ảnh hưởng của các enzyme tiêu hóa trong ruột cá (Hart *et al.*, 1988; Nakanishi & Ototake, 1997). Các cải tiến mới nhằm mục đích bảo vệ các kháng nguyên của vaccin như sử

dụng phương thức bao bọc bằng dầu liposomes hoặc các hạt alginate (Irie *et al.*, 2005; Maurice *et al.*, 2004), trung hòa dịch tiêu hóa trong quá trình sử dụng vaccin hoặc sử dụng biofilm vaccin (Azad *et al.*, 2000) đã chứng minh được hiệu quả. Tuy nhiên, vẫn còn một số nhược điểm tồn tại như số lượng kháng nguyên trong vaccin phải cao, khả năng bảo hộ còn yếu và hiệu lực vaccin vẫn còn ngắn. Tỷ lệ bảo hộ ở các lô khảo nghiệm bằng đường tiêm cao hơn bằng đường ăn.

Bảng 4. Kết quả giám định và định danh vi khuẩn *Streptococcus* spp. theo đặc tính sinh hóa

Chỉ tiêu	Kết quả kiểm tra (n = 360)		
	Đặc tính	Số chủng (+)	Tỷ lệ (%)
Nhuộm Gram	Gram (+)	360	100
Hình dạng	Cầu khuẩn	360	100
Di động	-	360	100
Sinh catalaza	-	360	100
Sinh oxidaza	-	360	100
Phản ứng lên men yếm khí	-	360	100
Phản ứng lên men hiếu khí	-	360	100
Mọc trên môi trường máu	+	360	100
Gây tan huyết	Dạng β	18	5.00
	Dạng γ	342	95.00
Phản ứng Voges-Proskauer	+	360	100
Hippurate hydrolysis	+	360	100
Bile-esculin tolerance	-	360	100
Pyrrolidonyl arylamidase	-	360	100
Sinh α -galactosidase	-	360	100
Sinh β -glucuronidase	-	360	100
Sinh β -galactosidase	-	360	100
Alkaline phosphatase	+	360	100
Leucine AminoPeptidase	+	360	100
Arginine Dihydrolase	+	360	100
Đặc tính lên men đường			
Ribose	-	360	100
Arabinose	-	360	100
Manitol	-	360	100
Sorbitol	-	360	100
Lactose	-	360	100
Trehalose	+	360	100
Inulin	-	360	100
Raffinose	-	360	100
Amidon	-	360	100
Glycogen	-	360	100
Kiểu huyết thanh	lb	360	100

Ghi chú:(+): dương tính; (-): âm tính

3.2.2. Xác định nguyên nhân gây chết cá sau khi công cường độc

Một số cá sau khi công cường độc ở các lô thí nghiệm có các dấu hiệu như lồi mắt và xuất huyết (Hình 5), bơi lơ đãng. Kết quả định danh vi khuẩn phân lập bằng Kit API20Strep từ các mẫu này đều dương tính với *S. agalactiae*. Tất cả các mẫu cá còn sống sau khi kết thúc theo dõi thí nghiệm (thu mỗi lô 10 con) thì không có biểu hiện bệnh và cũng không phân lập được vi khuẩn gây bệnh từ gan, thận và ruột.

* Kết quả định danh vi khuẩn:

Nhằm mục đích định danh vi khuẩn *Streptococcus* spp. phân lập được, chúng tôi sử dụng bộ Kit API 20 Strep của hãng Biomérieux. Kết quả giám định và định danh vi khuẩn bằng Kit API 20 Strep được trình bày ở bảng 4.

Dựa trên các chỉ tiêu sinh hóa và căn cứ vào mã số định danh của Kit API20 Strep, kết quả cho 360 mẫu vi khuẩn từ cá bệnh đã phân lập được định danh là *S. agalactiae*. Theo Đồng Thanh Hà và cs. (2010), *S. agalactiae* là vi khuẩn Gram dương, không sinh bào tử, không di động, catalase âm tính, không dung huyết, không có khả năng di động, Hip (+), VP (+), Esculine (-), Manitol (-), có khả năng sử dụng Arginine và một số đường như Ribose, glucose, trehalose, maltose, saccharose, không thủy phân tinh bột. Phát triển ở độ muối từ 0-35‰. Tồn lưu trong nước ao nuôi và bùn đáy từ 3-7 ngày, pH của nước vôi (pH = 12) có thể ức chế và tiêu diệt vi khuẩn trong 15-30 phút (Đồng Thanh Hà và cs., 2010). Kết quả này phù hợp với một số tài liệu trước đó đã mô tả về vi khuẩn *S. agalactiae*. Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương (2012) kết luận: Quan sát bằng kính hiển vi tiêu bản nhuộm Gram mẫu máu và thận của cá bệnh thấy có vi khuẩn hình cầu, Gram dương. Vi khuẩn phân lập từ não và thận trước của cá mọc trên môi trường Brain Heart agar cũng là vi khuẩn Gram dương, không di động, oxidase âm tính. Vi khuẩn được định danh là *Streptococcus agalactiae* type 2 bằng phương pháp sinh hóa, kit API 20 Strep và phương pháp ngưng kết miễn dịch.

Từ kết quả giám định vi khuẩn học ở trên, chúng tôi đã khẳng định *S. agalactiae* là tác

nhân gây chết cá sau công cường độc ở các lô đối chứng và các lô thí nghiệm.

4. KẾT LUẬN

Vaccin Han-Streptila sản xuất ở quy mô công nghiệp từ chủng *S. agalactiae* đạt an toàn và hiệu lực tốt trong điều kiện nuôi thương phẩm tại năm tỉnh ở phía nam. Phương pháp tiêm trên cá rô phi có khối lượng từ 10 g/con trở lên đạt tỷ lệ bảo hộ 66,9% sau 24 tuần; phương pháp cho ăn trên cá có khối lượng từ 2,5 g/con trở lên đạt tỷ lệ bảo hộ 63,9% sau 24 tuần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Azad I., Shankar K., Mohan C. & Kalita B. (2000). Uptake and processing of biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila* in indian major carps and common carp following oral vaccination antigen localization by a monoclonal antibody. Diseases of aquatic organisms. 43: 103-108.
- Brudeseth B.E., Rune W., Nilsen B., Fredriksen K. & Lindmo (2013). Fish & Shellfish Immunology. 35(6): 1759-1768.
- Nguyễn Hữu Dũng và Trần Vĩ Hích (2013). Tính an toàn và hiệu quả của vaccin vô hoạt phòng bệnh do vi khuẩn *S. iniae* gây ra bệnh trên cá chêm nuôi tại Khánh Hòa. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y, Hội Thú y Việt Nam. 20(3): 62-68.
- Đồng Thanh Hà, Nguyễn Việt Khuê và Nguyễn Thị Hạnh (2010). Một số đặc điểm của *Streptococcus agalactiae* tác nhân gây bệnh *Streptococcosis* trên cá rô phi ở miền Bắc Việt Nam. Trung tâm nghiên cứu quan trắc cảnh báo môi trường và phòng ngừa dịch bệnh thủy sản miền Bắc - Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản I.
- Hart S., Wrathmell A., Harris J. & Grayson T. (1988). Gut immunology in fish: a review. Developmental & Comparative Immunology. 12: 453-480.
- Irie T., Watarai S., Iwasaki T. & Kodama H. (2005). Protection against experimental *Aeromonas salmonicida* infection in carp by oral immunisation with bacterial antigen entrapped liposomes. Fish & shellfish immunology. 18: 235-242.
- Khan M., Khan S. & Miyan K. (2011). Aquaculture as a food production system: A review. Biol Med. 3: 291-302.
- Maurice S., Nussinovitch A., Jaffe N., Shoseyov O. & Gertler A. (2004) Oral immunization of *Carassius auratus* with modified recombinant A-layer proteins entrapped in alginate beads. Vaccine. 23: 450-459.

- Nakanishi T. & Ototake M. (1997) Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. *Developments in biological standardization*. 90: 59-68.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương (2012). Phân lập và xác định đặc điểm của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* từ cá điêu hồng (*Oreochromis sp.*) bệnh mù mắt và xuất huyết. *Tạp chí khoa học, Trường đại học Cần Thơ*. 22c: 203-212.
- Phạm Hồng Quân, Hồ Thu Thủy, Nguyễn Hữu Vũ, Huỳnh Thị Mỹ Lệ và Lê Văn Khoa (2013). Một số đặc tính sinh học của vi khuẩn *Streptococcus spp.*, gây bệnh xuất huyết ở cá rô phi nuôi tại một số tỉnh miền Bắc. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 11(4): 506-513.
- Nguyễn Mạnh Thắng, Nguyễn Diễm Thư, Nguyễn Thị Mộng Hoàng, Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Thị Hồng Vân và Hoàng Thanh Lịch (2009). Nghiên cứu vaccin phòng bệnh nhiễm khuẩn cho cá tra, cá basa, cá mú, cá giò, cá hồng mỹ nuôi công nghiệp, Đề tài nghiên cứu khoa học Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản II.
- Sarter S., Kha N.H.N., Hung L.T., Jérôme Lazard J. & Montet D. (2007). Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control*. 18: 1391-1396.
- Sommerset I., Krossoy B., Biering E. & Frost P. (2005). Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*.