

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA VACCINE BẤT HOẠT PHÒNG BỆNH MÙ MẮT DO LIÊN CẦU KHUẨN GÂY RA Ở CÁ BỚP NUÔI TẠI KHÁNH HÒA

EVALUATION OF THE PROTECTIVE EFFICACY OF INACTIVATED VACCINES FOR PREVENTING STREPTOCOCCOSIS IN COBIA (*Rachycentron canadum*) CULTURED IN KHANH HOA

Trần Vĩ Hích¹, Nguyễn Thị Kim Cúc²

¹ Trung tâm Nghiên cứu Giống và Dịch bệnh Thủy sản

² Viện Công nghệ sinh học và môi trường

Tác giả liên hệ: Trần Vĩ Hích (Email: tranhich@gmail.com)

Ngày nhận bài: 21/11/2019; Ngày phản biện thông qua: 25/03/2020; Ngày duyệt đăng: 30/03/2020

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá hiệu quả bảo vệ cá bớp khỏi bệnh mù mắt do vi khuẩn *Streptococcus iniae* gây ra ở cá bớp của vaccine bất hoạt. Kết quả thí nghiệm cho thấy vaccine hoàn toàn an toàn với cá bớp (không có sự khác biệt về chiều dài và khối lượng giữa cá thí nghiệm và cá đối chứng, không có bất kì dấu hiệu bất thường nào được quan sát ở xoang bụng cá được tiêm vaccine). Trong thí nghiệm công cường độc, vaccine đã bảo vệ cho cá khỏi bệnh do *S. iniae* gây ra với hệ số bảo hộ (RPS) là 85,19% tương ứng với liều tiêm là 10⁴ CFU/cá. Hiệu giá kháng thể trung bình trong huyết thanh của cá tiêm vaccine là 19,7 trong khi ở cá đối chứng là 0.

Từ khóa: Cá bớp, vaccine, hiệu giá kháng thể, *S. iniae*.

ABSTRACT.

The study was conducted to evaluate the effectiveness of inactivated vaccines against *Streptococcus iniae* bacteria causing blindness in cobia. The test results showed that inactivated vaccine was completely safe for cobia. (There was no difference in length and weight between experimental and control fish, no abnormalities were observed in intraperitoneal of immunized fish). In challenging trials, the inactivated vaccine effectively protected the cobia from *S. iniae* with a Relative Survival Rate (RPS) of 85.19% corresponding to the injection dose of 10⁴ CFU / fish. The antibody titre of immunized fish was 19.7 while in control fish it was 0.

Key words: Cobia, vaccine, antibody titre, *S. iniae*.

1. GIỚI THIỆU

Những nghiên cứu gần đây cho thấy sự gia tăng về bệnh do vi khuẩn gây ra ở cá bớp nuôi. Bốn loại bệnh thường xuyên được nhắc đến là vibriosis, mycobacteriosis, furunculosis và streptococcosis (Liao và ctv, 2004; Liu và ctv, 2003; Liu và ctv, 2004; Lopez và ctv, 2002; Lowry and Smith, 2006, Rajan và ctv, 2001, Rajan và ctv, 2003). Trong đó bệnh do liên cầu khuẩn (*Streptococcus*) là một trong những bệnh xảy ra phổ biến ở cá bớp nuôi tại Đài Loan (Liao và ctv, 2004).

Cá bị nhiễm liên cầu khuẩn thường thể hiện dấu hiệu bệnh lý lâm sàng như màu sắc

cơ thể tối, bơi lội thất thường, xuất huyết xung quanh mắt và hậu môn, giác mạc mờ đục. Tỷ lệ tử vong cao ở cá bị mù. Nhiều phương pháp phòng và trị bệnh do *Streptococcus* gây ra đã được áp dụng như: dùng kháng sinh, probiotic hay các chất kích thích đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu...

Thực tế việc sử dụng kháng sinh như là một phương pháp trị bệnh chủ yếu nhất trong điều trị bệnh mù mắt ở cá bớp nuôi mà người dân đã lựa chọn. Hiệu quả của việc lựa chọn phương pháp sử dụng kháng sinh trong việc điều trị bệnh mù mắt cho cá bớp nuôi là một bằng chứng rõ ràng về tác nhân vi khuẩn trong

việc gây bệnh mù mắt ở cá bớp. Tuy nhiên không phải lúc nào việc sử dụng kháng sinh cũng mang lại hiệu quả. Nếu không kể đến trường hợp bệnh mù mắt xuất hiện do tác nhân kí sinh trùng hoặc virus thì ở các khu vực khác nhau độ nhạy của vi khuẩn đối với từng loại kháng sinh cũng khác nhau. Đồng thời với sự phát triển của dịch bệnh và sự dụng kháng sinh bừa bãi đã làm gia tăng các dòng kháng kháng sinh, cho nên việc kiểm tra độ nhạy của kháng sinh đối với từng tác nhân gây bệnh là cần thiết và quan trọng. Vì vậy để kiểm soát tốt bệnh mù mắt ở cá bớp do vi khuẩn gây ra, giải pháp vaccine là sự lựa chọn tốt nhất. Sử dụng vaccine trong việc phòng bệnh trên cá là hướng đi an toàn, hiệu quả và bền vững cho nghề nuôi thủy sản.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Chủng vi khuẩn thử nghiệm

Chủng vi khuẩn thử nghiệm là chủng liên cầu khuẩn VN180517 phân lập từ cá bớp mắc bệnh mù mắt nuôi tại Vạn Ninh. Vi khuẩn gốc được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường TSB bổ sung 2% NaCl đặt trong tủ ẩm lắc đảo (180 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. Tế bào vi khuẩn sau khi thu hoạch được rửa 2 lần bằng dung dịch muối sinh lý đệm phosphate (phosphate buffered saline-PBS pH 7,4) rồi pha loãng trở lại bằng PBS để đạt mật độ 10^7 CFU/ml. Bất hoạt hóa vi khuẩn bằng cách thêm formalin vào hỗn dịch để đạt nồng độ formalin cuối cùng bằng 0,5% và bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

2. Kiểm định tính an toàn của vaccine

2.1. Kiểm định tính vô khuẩn của vaccine

Cho 100 µl dịch huyền phù vi khuẩn bất hoạt trên các đĩa thạch chứa môi trường TSA và TCBS, cấy trang rồi ủ ở nhiệt độ 28°C. Sau 48 giờ, kiểm tra sự xuất hiện của các khuẩn lạc vi khuẩn trên các đĩa thạch.

2.2. Kiểm định tính an toàn của vaccine đối với cá bớp

Cá bớp có chiều dài thân trung bình từ 10 – 12cm, chưa từng nhiễm liên cầu khuẩn được tiêm vaccine với liều 0,2ml/cá vào xoang bụng. Cá đối chứng được tiêm dung dịch nước muối

sinh lý với liều tương tự. Cá được tiêm vaccine và cá đối chứng được nuôi riêng biệt trong bể ciment 1000L chứa 700L nước biển độ mặn khoảng 30ppt cho ăn thức ăn UP mỗi ngày 2 lần theo nhu cầu của cá. Theo dõi và ghi chép những bất thường của cá thí nghiệm liên tục trong 5 giờ đầu tiên sau khi bố trí thí nghiệm. Ghi chép số lượng cá chết hàng ngày cho đến ngày thứ 21 sau khi tiêm. Trong thời gian này, cá được cho ăn hàng ngày theo nhu cầu và thay 100% lượng nước trong bể theo quy trình chăm sóc cá tại Trung tâm Nghiên cứu Giống và Dịch bệnh Thủy sản. Mọi cá chết thu được đều được kiểm tra và phân lập vi khuẩn từ não và thận. Ghi nhận các biến đổi bất thường trong/trên cơ thể cá có liên quan đến việc tiêm vaccine.

3. Kiểm tra hiệu quả bảo vệ của vaccine phòng bệnh mù mắt do liên cầu khuẩn gây ra ở cá bớp.

3.1. Gây miễn dịch cho cá bớp

Thí nghiệm được bố trí tương tự như Phần II. 2. chỉ khác ở chỗ là liều tiêm được giảm đi một nửa và 28 ngày sau khi tiêm vaccine lần đầu tiên, cá bớp lại được tiêm nhắc lại một lần nữa và 3 tuần sau khi tiêm nhắc lại, cá được sử dụng để đánh giá hiệu quả của vaccine.

3.2. Kiểm định kháng thể

Lượng kháng thể trong huyết thanh của cá bớp cần được xác định theo phương pháp ngưng kết (agglutinating antibody titre) của Plumb and Arechon (1990), theo đó, đĩa 96 giếng đáy bằng được sử dụng cho phương pháp này. Lấy 100 µL huyết thanh cá bớp cần kiểm tra cho vào giếng A1. Từ giếng A2 đến A8, cho vào mỗi giếng 50 µL PBS. Sau đó lấy 50 µL dung dịch của giếng A1 cho vào giếng A2, trộn đều rồi lấy 50 µL dung dịch của giếng A2 cho vào giếng A3. Tiếp tục như vậy đến giếng A8 rồi lấy 50 µL dung dịch của giếng A8 bỏ ra ngoài. Cho 50 µL dung dịch huyền phù vi khuẩn *Streptococcus iniae* vào mỗi giếng, lắc nhẹ và quan sát, ghi lại sự xuất hiện ngưng ở giếng có nồng độ huyết thanh thấp nhất.

3.3. Xác định hiệu quả bảo vệ của vaccine bất hoạt

Thí nghiệm công cường độc cá thí nghiệm được tiến hành bằng cá tiêm chủng vi khuẩn VN180517 vào xoang bụng của cá thí nghiệm

với liều 0,1ml/cá. Mật độ vi khuẩn trong liều công gồm 2 mức là 10^5 và 10^6 CFU/ml. Số lượng cá ở mỗi đơn vị thí nghiệm là 20 cá và được lặp lại 2 lần.

Thường xuyên theo dõi cá thí nghiệm và ghi nhận cá chết trong các bể 3 giờ 1 lần. Cá thí nghiệm được theo dõi liên tục cho đến khi không xuất hiện cá chết trong mọi bể thí nghiệm trong 7 ngày liên tục.

Tất cả cá tiêm vaccine lẫn cá đối chứng chết

$$RPS = \left(1 - \frac{\text{Tỷ lệ chết tích lũy ở nhóm cá tiêm vaccine}}{\text{Tỷ lệ chết tích lũy ở nhóm cá tiêm nước muối sinh lý}}\right) \times 100 (\%)$$

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.

1. Tính an toàn của vaccine thử nghiệm

1.1. Tính vô khuẩn của vaccine

Kết quả kiểm tra tính vô khuẩn của vaccine bất hoạt cho thấy dung dịch vaccine hoàn toàn vô khuẩn. Không có bất cứ khuẩn lạc nào xuất hiện trên các môi trường phân lập sau 48h nuôi cấy. Kết quả này hứng tỏ nồng độ formalin 0,5% có khả năng bất hoàn toàn vi khuẩn *S. iniae*.

Bảng 1. Chiều dài và khối lượng cá bớp khi kết thúc thí nghiệm kiểm tra độ an toàn của vaccine bất hoạt.

| Lần lặp thứ | Chiều dài và khối lượng của cá bớp khi kết thúc thí nghiệm an toàn vaccine | | | |
|-------------|--|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Chiều dài (cm) | | Khối lượng (g) | |
| | Cá đối chứng | Cá vaccine | Cá đối chứng | Cá vaccine |
| 1 | 12,24 ± 0,77 | 12,82 ± 0,88 | 22,12 ± 3,51 | 23,32 ± 4,44 |
| 2 | 12,55 ± 0,87 | 12,44 ± 1,05 | 23,25 ± 4,81 | 22,16 ± 5,05 |
| TB | 12,39 ± 0,22 | 12,62 ± 0,27 | 22,69 ± 0,80 | 22,73 ± 0,83 |

Điều này chứng tỏ vaccine bất hoạt không làm ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng của cá thí nghiệm. Mặt khác, kết quả kiểm tra xoang bụng của cá thí nghiệm cho thấy không có bất kì bất thường nào được quan sát ở xoang bụng của cá thí nghiệm như các u hạt trên màng treo nội quan hoặc sự dính kết của nội quan vào xoang bụng mà các thử nghiệm vaccine dạng

trong thời gian theo dõi của thí nghiệm gây nhiễm thực nghiệm đều được giải phẫu, kiểm tra và phân lập vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy chọn lọc (KF Streptococcus) để xác định nguyên nhân gây chết.

3.4. Đánh giá hiệu quả bảo vệ của vaccine

Hiệu quả bảo vệ của vaccine được đánh giá dựa trên hệ số bảo vệ (RPS) khi kết thúc thí nghiệm (cá thí nghiệm không chết trong 5 ngày liên tục). Chỉ số RPS được tính theo công thức:

1.2. Tính an toàn của vaccine thử nghiệm

Sau 30 ngày tiến hành thí nghiệm tất cả cá ở các nghiệm thức vaccine và đối chứng đều khỏe mạnh. Không có bất kì dấu hiệu bất thường về trạng thái bơi lội hay về hình thái của cá thí nghiệm được ghi nhận trong suốt quá trình thí nghiệm. Không có sự khác biệt về chiều dài và khối lượng (Bảng 1) giữa cá thí nghiệm và cá đối chứng ($P > 0,05$) mặc dù ngày đầu tiên của thí nghiệm, cá được tiêm vaccine ăn ít hơn.

nhũ dầu thường báo cáo. Không có dấu hiệu bất thường tại vị trí tiêm vaccine.

Kết quả này cho thấy sản phẩm vaccine bất hoạt là an toàn với cá bớp. Việc tiêm vaccine bất hoạt không tạo ra những thay đổi bất thường trong cơ thể của cá bớp, không ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng và tỉ lệ sống của cá.

Bảng 2. Hiệu giá kháng thể của cá bớp kháng lại *S. iniae*

| Nghiệm thức | Hiệu giá kháng thể của cá thứ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|-------------------------------|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | TB |
| Cá vaccine | 32 | 16 | 16 | 8 | 16 | 32 | 64 | 32 | 32 | 16 | 16 | 32 | 8 | 8 | 16 | 32 | 32 | 8 | 16 | 32 | 19,7 |
| Cá đối chứng | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

2. Hiệu quả bảo hộ của vaccine bất hoạt đối với bệnh mù mắt do liên cầu khuẩn gây ra ở cá bớp

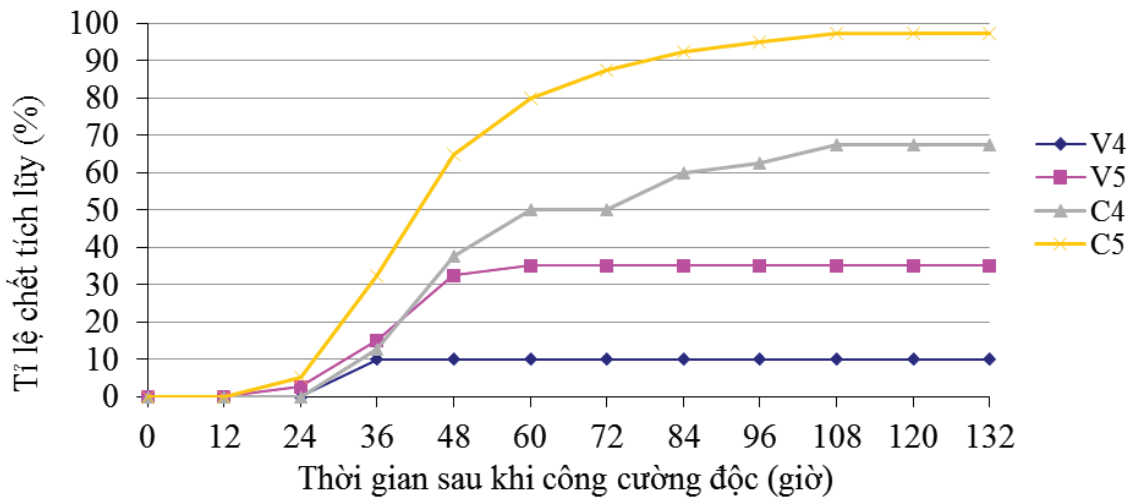
2.1. Nồng độ kháng thể đặc hiệu trong máu bớp sau khi tiêm vaccine bất hoạt

Sự khác biệt về nồng độ kháng thể đặc hiệu kháng *S. iniae* trong huyết thanh của cá bớp được tiêm vaccine so với nhóm cá đối chứng được thể hiện ở Bảng 2.

Kết quả phân tích 20 mẫu huyết thanh của cá đối chứng và 20 mẫu huyết thanh của cá được tiêm vaccine cho thấy 100% huyết thanh của cá tiêm vaccine đều có kháng thể đặc hiệu kháng lại vi khuẩn *S. iniae*. Hiệu giá kháng thể của kháng huyết thanh đạt từ 8 -64. Trong khi ở nhóm cá đối chứng, 90% mẫu huyết thanh không có kháng thể kháng lại vi khuẩn *S. iniae*.

2.2. Hiệu quả bảo hộ của vaccine bất hoạt

Kết quả thí nghiệm cho thấy hầu hết cá ở nhóm đối chứng bỏ ăn sau khi công cường độc 8h trong khi nhóm cá được tiêm vaccine vẫn bắt mỗi tuy có hơi giảm. Thời điểm cá chết xuất hiện ở các nghiệm thức công cường độc liều cao sau 24h và các nghiệm thức công liều thấp là sau 36h. Số lượng cá chết tăng nhanh trong vòng 60h sau khi công cường độc và sau đó giảm dần và dừng hẳn ở thời điểm 108h sau khi tiêm vi khuẩn *S. iniae*. Tỷ lệ cá chết tích lũy ở các nhóm cá đối chứng công cường độc liều 10^4 và 10^5 CFU/cá khi kết thúc thí nghiệm lần lượt là 67,5% và 97,5% trong khi các con số này ở nhóm cá tiêm vaccine lần lượt là 10% và 35% (Hình 1).



Hình 1. Tỷ lệ chết tích lũy ở các nghiệm thức thí nghiệm khi công cường độc bằng chủng vi khuẩn VN180517 (V4, V5: cá vaccine công ở liều 10^4 và 10^5 cfu/cá; C4, C5: cá đối chứng công ở liều 10^4 và 10^5 cfu/c.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Vaccine bất hoạt phòng bệnh mù mắt ở cá bớp là vô khuẩn và an toàn cho cá khi sử dụng.

Vaccine bất hoạt có tác dụng bảo vệ cá bớp kháng lại bệnh mù mắt do *S. iniae* gây ra. Tất cả cá tiêm vaccine đều có kháng thể đặc hiệu kháng lại vi khuẩn *S. iniae* trong huyết thanh với hiệu giá trung bình khoảng 19,7. Hệ số bảo vệ tương đối đạt 85,19% khi công cường độc với liều 10^4 CFU/cá.

Nghiên cứu này chỉ thử nghiệm hiệu quả của vaccine đối với chủng gốc mà chưa thử với

các chủng khác, chưa chứng minh sự ổn định của chủng gốc (master seed) và cũng không biết được thời gian bảo hộ của vaccine kéo dài trong bao lâu. Vì thế việc này chính là nhiệm vụ được đặt ra cho các nghiên cứu tiếp theo.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài nghiên cứu khoa học trường Đại học Nha Trang (mã số: TR2017-13-01), công ty Virbac Việt Nam. Xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ quý báu đó.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Liao I.C, Huang T.S, Tsai W.S, Hsuehd C.M, Chang S.L, Leano E.M 2004. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. *Aquaculture*. 237:155–165.
2. Liu P.C, Liu J.Y, Lee K.K 2003. Virulence of *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* in cultured cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of Basic Microbiology*, 43, 499–507.
3. Liu P.C, Lin J.Y, Chuang W, Lee K.K 2004. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20, (5), 495–499.
4. Lopez C, Rajan P.R, Lin J.H, Kuo T, Yang H 2002. Disease outbreak in seafarmed cobia (*Rachycentron canadum*) associated with *Vibrio* spp., *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, monogenean and myxosporean parasites. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22(3): 206–211.
5. Lowry T, Smith S.A 2006. *Mycobacterium* sp. Infection in cultured cobia (*Rachycentron canadum*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 26, 87–92.
6. Rajan P.R., Lin J.H, Ho M.S, Yang H.L 2003. Simple and rapid detection of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* by a PCR technique and plating method. *Journal of Applied Microbiology*, 95(6):1375–1380.
7. Rajan P.R, Lopez C, Lin J.H.Y, Yang H.L 2001. *Vibrio alginolyticus* infection in cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in Taiwan. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 21(6):228– 234.