

ẢNH HƯỞNG CỦA TÁ CHẤT ĐẾN KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH KHÁNG THỂ VÀ HIỆU QUẢ BẢO HỘ CỦA VACCINE VÔ HOẠT PHÒNG BỆNH LỖI MẮT DO *STREPTOCOCCUS INIAE* Ở CÁ CHÊM *LATES CALCARIFER*

Nguyễn Thị Thanh Thủy*, Nguyễn Thị Quế Chi, Lê Hồng Tuấn, Nguyễn Văn Hùng

Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III

TÓM TẮT

Nghiên cứu trình bày ảnh hưởng của các loại tá chất khác nhau đến khả năng kích thích sinh kháng thể và hiệu quả bảo hộ của vaccine vô hoạt phòng bệnh do *Streptococcus iniae* ở cá chêm *Lates calcarifer*. Vaccine vô hoạt gồm sinh khối vi khuẩn *Streptococcus iniae* SiTH1 ở nồng độ 10^{10} cfu/mL, bất hoạt bằng formalin, phối trộn với các loại tá chất Montanide ISA 763 AVG (Seppic, France), FIA (Freund's Incomplete Adjuvant) và sản phẩm ngoại màng EPS (Extracellular polysaccharide) được tách chiết từ sinh khối vi khuẩn SiTH1. Thí nghiệm gồm 5 nghiệm thức thí nghiệm tá chất (NT1:FKC+ ISA763 AVG, tỷ lệ 6:4; NT2: FKC+FIA, tỷ lệ 1:1; NT3: FKC+5 mg EPS; NT4: NT1+5 mg EPS; NT5:NT2+5 mg EPS) và 2 nghiệm thức đối chứng gồm ĐC1: FKC và ĐC2: PBS. Mỗi nghiệm thức gồm 30 cá chêm được gây miễn dịch 1 lần bằng cách tiêm xoang bụng, liều 0,1 mL/con. Lập lại 3 lần. Kết quả phân tích huyết thanh cá thí nghiệm sau 7, 14 và 21 ngày cho thấy hiệu giá kháng thể và hàm lượng kháng thể tăng dần từ sau 1 tuần gây miễn dịch, đạt cao nhất ở ngày thứ 14 và xu hướng giảm dần ở ngày thứ 21. Trong đó, ở mỗi thời điểm thu mẫu đều ghi nhận hiệu giá và hàm lượng kháng thể đạt cao nhất ở nhóm NT1 (FKC+ Montanide ISA 763) và NT4 (NT1+EPS), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$) so với các nhóm còn lại và không khác biệt giữa 2 nhóm này. Ở ngày thứ 21 sau khi gây miễn dịch, cá thí nghiệm được công cường độc bằng dịch khuẩn SiTH1 ở nồng độ 10^8 cfu/mL, liều 0,1 mL/con. Tính toán hệ số bảo hộ RPS cho thấy nhóm bổ sung tá chất là ISA763 AVG và hỗn hợp ISA763 AVG và EPS đạt cao nhất, 78,4%; Nhóm vaccine trộn tá chất FIA đạt 70-73 %, thấp nhất là nhóm vaccine không trộn tá chất chỉ đạt 48,6 %.

Từ khóa: Bảo hộ, kháng thể, *Lates calcarifer*, *Streptococcus iniae*, tá chất, vaccine.

MỞ ĐẦU

Vi khuẩn *Streptococcus* spp. được báo cáo là tác nhân gây nhiều bệnh nguy hiểm cho nhiều loài cá nước lợ mặn và nước ngọt, làm thiệt hại kinh tế cho nghề nuôi thủy sản hàng năm lên đến 150 triệu đô la. Trong đó, loài *Streptococcus iniae* được báo cáo là tác nhân gây bệnh cho ít nhất 27 loài cá nước ngọt và cá biển ở 15 quốc gia khác nhau thuộc 4 châu lục, gồm châu Phi, châu Á, châu Úc và châu Âu (Hossain *et al.*, 2014). Trên cá chêm *Lates calcarifer*, bệnh do *S. iniae* được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1999 tại Úc (Bromage *et al.*, 1999), tiếp tục xuất hiện năm 2006 (Creepers và Buller, 2006) và tại Thái Lan ghi nhận bệnh này trên cá chêm vào năm 2010 (Suanyuk *et al.*, 2010). Tại Việt Nam, phát hiện *S.iniae* gây bệnh cho cá chêm nuôi lồng tại Khánh Hoà (Hich *et al.*, 2013), tại Thừa Thiên Huế (Hoa *et al.*, 2018) đã gây thiệt hại kinh tế lớn cho người nuôi. Dấu hiệu bệnh lý thường gặp ở cá bệnh là bơi lội bất thường ở gần mặt nước hoặc bơi xoắn, thân trở nên sẫm màu hơn, xuất huyết ở thân, gốc vây, hậu môn, mắt lồi, đục. Giải phẫu nội quan thường gặp sự tích dịch ở khoang bụng, gan, thận, lách sưng phù, đôi khi xuất huyết. Bệnh do *S. iniae* có thể gây ra tỷ lệ chết lên đến 70% ở giai đoạn cá chêm giống (Suanyuk *et al.*, 2010; Creepers và Buller, 2006).

Biện pháp trị bệnh do *S.iniae* hiện nay chủ yếu dựa vào kháng sinh. Tuy nhiên, có những loại kháng sinh dù đã được chứng minh có khả năng ức chế *S.iniae* trong phòng thí nghiệm nhưng lại không hiệu quả khi ứng dụng vào thực tế sản xuất, có thể vì chứng biếng ăn của cá bệnh. Việc sử dụng kháng sinh một cách bừa bãi đã làm gia tăng các chủng vi khuẩn *S.iniae* kháng thuốc, thậm chí xuất hiện các gen đa kháng thuốc đã làm cho việc điều trị không hiệu quả và gây lãng phí (Tawab *et al.*, 2022). Vì vậy, phòng bệnh do *S.iniae* cho cá bằng vaccine là một giải pháp an toàn và hiệu quả hơn cả.

Vaccine phòng bệnh cho cá biển đã được nghiên cứu từ sớm tại các nước có nghề nuôi cá phát triển như Mỹ, Na Uy, Đức, Hà Lan, Nhật Bản... Hầu hết các vaccine dùng cho nuôi trồng thủy sản hiện nay là vaccine vi khuẩn bất hoạt như vaccine phòng bệnh do *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* và *Vibrio salmonicida*. Ưu điểm của các vaccine bất hoạt này là có khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch tốt, kháng nguyên là các chủng vi khuẩn được phân lập từ cá bệnh nên vaccine có tính đặc hiệu cao, có hiệu lực và phản ứng phụ không đáng kể (Stevenson, 1997).

Để nâng cao hiệu quả bảo vệ của vaccine ở cá, các nghiên cứu về chất bổ trợ hay tá chất (Adjuvant) được chú trọng từ những năm đầu 1990 (Van Muiswinkel, 2008). Chất bổ trợ thông thường gồm hai loại: Chất bổ trợ không

dầu (Water base) và có dầu (Oil base). Các chất bổ trợ có dầu thường dùng như Freund's adjuvant gồm FIA với thành phần chính là dầu khoáng và chất bổ trợ toàn phần (FCA) với thành phần là hỗn hợp dầu khoáng và *Mycobacterium tuberculosis* đã bất hoạt bằng nhiệt. Vaccine có bổ sung thành phần chất bổ trợ Freund's đã chứng minh có hiệu quả kích thích miễn dịch và nâng cao hệ số bảo hộ ở nhiều loài cá nước mặn và nước ngọt chống lại nhiều loại vi khuẩn như *Vibrio* spp., *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Flavobacterium columnare*; *Edwardsiella tarda*... Tuy nhiên, ở vài loài cá, tỷ lệ chịu tác dụng phụ do tiêm vaccine có chất bổ trợ có dầu khá cao. Ngày nay, nhiều loại chất bổ trợ khác nhau được nghiên cứu nhằm giảm tác dụng phụ trên cá nhưng vẫn duy trì tính ổn định của vaccine. Ví dụ như, Montanide ISA763A (W/O, non-mineral oil) được bổ sung vào vaccine trị bệnh do ký sinh trùng *Philasterides dicentrarchii* ở cá bơn nuôi đã làm tăng hệ số bảo hộ đáng kể cho cá và không có tác dụng phụ; hoặc trộn vào vaccine phòng bệnh do *Pseudomonas plecoglossicida* ở cá ayu (*Plecoglossus altivelis*) với hệ số bảo hộ RPS tăng đến 86%. EPS (Extracellular polysaccharide) tách chiết từ sản phẩm ngoại màng tế bào vi khuẩn làm tăng mức độ đa dạng và đầy đủ các độc tố kháng nguyên của vi khuẩn làm vaccine; tăng kích thích tế bào miễn dịch; một số nghiên cứu chỉ ra nếu bổ sung thêm EPS trong thành phần vaccine thì tăng RPS đến 87-100% (Klesius *et al.*, 2002).

Tại Việt Nam, có vài công trình nghiên cứu về đặc điểm bệnh học của vi khuẩn *Streptococcus iniae* ở cá chêm nuôi (Hích *et al.*, 2013; Hoa *et al.*, 2018) nhưng chưa có nghiên cứu sâu hơn về chế tạo vaccine phòng bệnh này cho cá chêm. Nghiên cứu này thực hiện nhằm chọn lựa loại tá chất phù hợp làm cơ sở cho sản xuất vaccine phòng bệnh do *Streptococcus iniae* cho cá chêm nuôi tại Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn kháng nguyên là *Streptococcus iniae* SiTH1, đã được thẩm định đạt tiêu chuẩn phục vụ nghiên cứu sản xuất vaccine do Cục thú y chứng nhận, được lưu giữ tại Phòng Công nghệ sinh học và vắc xin thủy sản-Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản III.

Tá chất thí nghiệm

Tá chất là sản phẩm ngoại màng EPS (Extracellular polysaccharide) được tách chiết từ sinh khối vi khuẩn kháng nguyên (SiTH1) theo phương pháp của Eyngor và đồng tác giả (2008): Dịch khuẩn sinh khối được ly tâm 6000 rpm/30 phút/4°C, thu dịch nổi và thêm vào trichloroacetic acid (4% w/v) tiếp tục ly tâm 3000 rpm/10 phút/4°C. Thu phần kết tủa, hoàn nguyên trong nước cất tiệt trùng, chỉnh pH 7.0, ly tâm 6000 rpm/40 phút/4°C. Thu phần dịch nổi và sấy thăng hoa thu EPS dạng bột.

Tá chất thương mại gồm Montanide ISA 763 AVG (Seppic, France) và FIA (Freund's Incomplete Adjuvant).

Cá chêm giống: Cá khỏe mạnh, cỡ 8-10 cm/con được nhập từ công ty sản xuất giống thủy sản và nuôi thuần dưỡng trong hệ thống thí nghiệm trước 14 ngày.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị vi khuẩn kháng nguyên

Chủng vi khuẩn *S.iniae* SiTH1 được nuôi phục hồi, tăng sinh trong môi trường BHI broth (bổ sung 1,5% NaCl) (Merck, Đức) ở 28 – 30 °C trong 36 h, xác định mật độ và bất hoạt bằng formalin 0,5%/4°C/12h, ly tâm loại bỏ dịch môi trường có formalin và hoàn nguyên trong PBS (FKC-Formalin kill cell) hoặc pha trong tá chất đạt nồng độ theo yêu cầu thí nghiệm.

Chuẩn bị vaccine

Vaccine chuẩn bị ở nồng độ kháng nguyên 10¹⁰ cfu/mL, phối trộn theo 5 nghiệm thức thí nghiệm tá chất:

FKC+ ISA763 AVG, tỷ lệ 6:4 (NT1);

FKC+FIA, tỷ lệ 1:1 (NT2);

FKC+5 mg EPS (NT3);

NT1+5 mg EPS (NT4);

NT2+5 mg EPS (NT5).

Bố trí thí nghiệm

Cá thí nghiệm gồm 630 con cỡ 8-10 cm được chia vào các bể chứa 250 lít nước biển, 30 con/bể, sử dụng cho thí nghiệm gồm 5 nghiệm thức phối trộn tá chất và 2 nghiệm thức đối chứng gồm ĐC1: FKC và ĐC2: PBS. Cá được gây miễn dịch 1 lần bằng cách tiêm xoang bụng bằng vaccine được pha trộn theo công thức thí nghiệm, liều 0,1 mL/con. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

Thu huyết thanh

Thu huyết thanh 5 cá/bể ở các ngày thứ 7, 14 và 21 sau khi gây miễn dịch để phân tích kháng thể.

Thu huyết thanh cá: Lấy 1 mL máu tại tĩnh mạch cuống đuôi của cá cho vào các Eppendorf 2 mL, giữ mẫu máu ở 4 °C trong 10-12 giờ trước khi ly tâm 15.000 vòng/phút ở 4 °C, tách phần dịch huyết thanh và giữ ở -70 °C cho các nghiên cứu phân tích kháng thể.

Phân tích kháng thể

Hiệu giá kháng thể trong huyết thanh cá thí nghiệm được xác định bằng phương pháp ngưng kết kháng thể (Agglutinating antibody titre) của Roberson (1990): Lấy 100 µL huyết thanh cá thêm đã pha loãng (1:10) cho vào giếng đầu tiên đĩa 96 giếng. Từ giếng thứ 1, dùng pipet hút thả nhiều lần cho đều, hút 50 µL cho vào giếng thứ 2, tiếp tục pha loãng theo hệ thống pha loãng 2 lần (2-fold serial dilution) trong dung dịch PBS. Ghi nhận kết quả là số thứ tự giếng có bậc pha loãng huyết thanh cao nhất xảy ra phản ứng ngưng kết. Mỗi mẫu thực hiện 3 lần, tính số trung bình.

Hàm lượng kháng thể IgM xác định bằng phương pháp miễn dịch liên kết enzyme gián tiếp (indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay- i-ELISA), cụ thể: Ví khuẩn đã bất hoạt được lưu giữ dưới dạng đông khô được hòa loãng trong PBS (pH 7,3) tương ứng với nồng độ 40 µg/mL. Cho 150 µL dịch khuẩn /giếng (Đĩa 96 giếng, Nunc MaxiSorp™), ủ qua đêm ở 4 °C. Rửa 3 lần bằng dung dịch PBS-T (PBS + 0,05 % Tween 20). Khóa các vị trí không liên kết bằng PBS-T chứa 3 % Skim milk (PBSTM) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa 3 lần bằng dung dịch PBS-T. Huyết thanh cá thêm kiểm tra được pha loãng 50 lần trong PBS-T, tiếp tục pha loãng hệ số 2 theo dãy ống nghiệm. Cho 100 µL huyết thanh cá thêm ở các ống pha loãng vào các giếng đã phủ kháng nguyên, ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa 3 lần bằng dung dịch PBS-T. Mỗi giếng thêm 100 µL kháng thể đơn dòng chuột kháng IgM cá thêm (Mouse anti Asian seabass, pha loãng 1:40 trong PBS-T), ủ trong 2 giờ. Rửa 3 lần bằng dung dịch PBS-T. Sau đó, thêm 50 µL/giếng kháng thể đa dòng của thỏ kháng Ig chuột có gắn enzyme HRP (Polyclonal Rabbit anti-mouse Ig- HRP, Dako, pha loãng 1:2000 trong PBS-T), ủ trong 1 giờ. Rửa 3 lần bằng dung dịch PBS-T. Thêm 50 µL/giếng cơ chất Peroxidase gồm 0-Phenylenediamine (Sigma) pha trong dung dịch đệm Phosphate citrate. Sau 10 phút, kết thúc phản ứng bằng 50 µL dung dịch H₂SO₄ 2.0 M. Đo mật độ quang của các giếng bằng máy đo quang phổ (iMark microplate reader - Bio-rad) ở bước sóng 492 nm. Mỗi mẫu huyết thanh được thực hiện lặp lại 3 lần trên cùng một đĩa.

Đánh giá hệ số bảo hộ của vaccine

Ở ngày thứ 21 sau khi gây miễn dịch, 15 con/bể được công cường độc bằng dịch khuẩn SiTH1 ở nồng độ 10⁸ cfu/mL, liều 0,1 mL/con. Theo dõi trong 14 ngày, ghi nhận số cá chết/yếu, tính hệ số bảo hộ RPS.

Hệ số bảo hộ RPS (Relative percent survival) tính theo phương pháp của Ellis (1988).

RPS (%) = (1- Tỷ lệ chết tích lũy trung bình ở nhóm cá tiêm vaccine/Tỷ lệ chết tích lũy trung bình ở nhóm cá đối chứng) x 100.

Xử lý số liệu: Giá trị trung bình của các nghiệm thức thí nghiệm được so sánh sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05) bằng kiểm định ANOVA one way và Tukey HSD Post-hoc test trên phần mềm SPSS 16.0. Số liệu trình bày là số trung bình ± độ lệch chuẩn.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của tá chất phối trộn vaccine đến khả năng sinh kháng thể ở cá thêm.

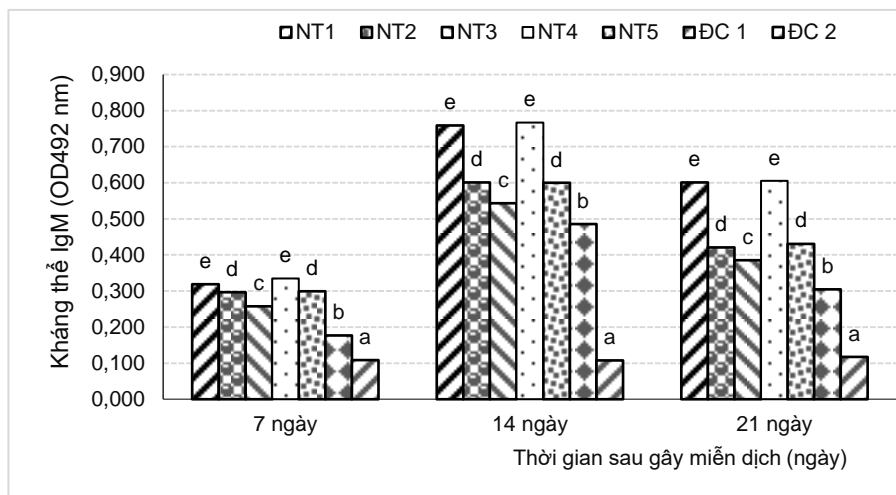
Sau khi gây miễn dịch, huyết thanh cá thí nghiệm được thu ở các ngày thứ 7, 14 và 21 để phân tích hiệu giá kháng thể và hàm lượng kháng thể. Sự khác biệt về khả năng kích thích sinh kháng thể ở các nghiệm thức thí nghiệm được thể hiện ở hiệu giá kháng thể (Bảng 1) và hàm lượng kháng thể đo được trong huyết thanh (Hình 1).

Bảng 1. Hiệu giá kháng thể (Log₂) của cá sau khi gây miễn dịch bằng FKC phối trộn nhiều loại tá chất khác nhau

Nghiệm thức	Trung bình hiệu giá kháng thể (Log ₂ , n=5)		
	7 ngày	14 ngày	21 ngày
NT1	3,60 ± 0,55 ^c	6,60 ± 0,55 ^d	5,20 ± 0,45 ^d
NT2	3,40 ± 0,55 ^b	6,20 ± 0,45 ^c	4,80 ± 0,45 ^c
NT3	2,40 ± 0,55 ^a	5,40 ± 0,55 ^b	3,40 ± 0,55 ^b
NT4	3,60 ± 0,55 ^c	6,80 ± 0,45 ^d	5,40 ± 0,55 ^d
NT5	3,40 ± 0,55 ^b	6,20 ± 0,45 ^c	5,20 ± 0,84 ^{cd}
ĐC1	2,20 ± 0,45 ^a	4,20 ± 0,45 ^a	3,20 ± 0,45 ^a
ĐC2	0	0	0

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05).

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy xu hướng chung hiệu giá kháng thể tăng dần từ sau 1 tuần gây miễn dịch, đạt cao nhất ở ngày thứ 14 và xu hướng giảm dần ở ngày thứ 21. Trong đó, ở mỗi thời điểm thu mẫu đều ghi nhận hiệu giá kháng thể đạt cao nhất ở nhóm NT1 (FKC+ Montanide ISA 763) và NT4 (NT1+EPS), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$) so với các nhóm còn lại và không khác biệt giữa 2 nhóm này.



Hình 1. Kháng thể IgM cá chēm sau khi gây miễn dịch bằng FKC phối trộn tá chất khác nhau

Tương tự, hàm lượng kháng thể IgM đo được ở các thời điểm thu mẫu cũng cho xu hướng kháng thể đạt cao nhất sau 14 ngày và giảm ở ngày thứ 21 sau khi gây miễn dịch. So sánh khả năng kích thích sinh kháng thể giữa các loại tá chất phối trộn ở cùng thời điểm cũng ghi nhận có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của nhóm NT1 và NT4 cao hơn so với các nhóm còn lại ($P<0,05$) và không khác biệt giữa 2 nhóm này.

Kết quả công độc và hệ số bảo hộ của cá sau khi gây miễn dịch

Ở ngày thứ 21 sau khi gây miễn dịch, 15 con cá/bể được công cường độc bằng vi khuẩn *S.iniae* SiTH1 ở liều 0,1 mL dịch khuẩn 10^8 cfu/mL/con cá, kết quả thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả công cường độc và hệ số bảo hộ của vaccine phối trộn tá chất khác nhau

Nghiệm thức	Công thức vaccine (i.p., 0,1 mL/con, 1 liều)	Số cá/bể (con) x 3 lần lặp	Công độc ngày thứ 21	Tỷ lệ chết tích lũy trung bình (%)	RPS (%)
NT1	FKC + ISA763 AVG	15	Tiêm xoang bụng, liều 0,1 mL/con, dịch vi khuẩn 10^8 cfu/mL	17,8 ± 3,8	78,4
NT2	FKC + FIA	15		24,4 ± 3,8	70,3
NT3	FKC + 5 mg EPS	15		26,7 ± 6,7	67,6
NT4	NT1 + 5 mg EPS	15		17,8 ± 3,8	78,4
NT5	NT2 + 5 mg EPS	15		22,2 ± 3,8	73,0
ĐC 1	FKC	15		42,2 ± 3,8	48,6
ĐC 2	PBS	15		82,22 ± 3,8	0
ĐC		15	PBS, 0,1 mL/con	0	

Cá chēm được công cường độc sau 21 ngày gây miễn dịch bằng vaccine phối trộn tá chất khác nhau đã cho kết quả có sự khác biệt về tỷ lệ chết tích lũy ở các nghiệm thức. Cụ thể, nhóm tiêm vaccine trộn tá chất cho tỷ lệ chết tích lũy thấp hơn từ 50-70% so với nhóm tiêm vaccine không trộn tá chất (ĐC1); Trong nhóm trộn tá chất, ISA763 AVG và hỗn hợp tá chất ISA763 AVG và EPS đều cho tỷ lệ chết thấp nhất, chỉ 17,8%. Trong khi đó, nhóm trộn riêng rẽ FIA và EPS hoặc hỗn hợp 2 loại này đều cho tỷ lệ chết tích lũy cao hơn và gần tương đương nhau, từ 22,2-26,7%. Tính toán hệ số bảo hộ RPS cho thấy nhóm bổ sung tá chất là ISA763 AVG và hỗn hợp ISA763 AVG và EPS đạt cao nhất, 78,4%, nhóm vaccine trộn tá chất FIA đạt 70-73 %, thấp nhất là nhóm vaccine không trộn tá chất chỉ đạt 48,6 %.

Tá chất phối trộn để tăng hiệu quả của vaccine ở cá đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu. Tuy nhiên, vấn đề then chốt trong chọn lựa tá chất chế tạo vaccine là đem lại hệ số bảo hộ cao, kéo dài và phải đảm bảo an toàn, tác dụng phụ ở cá là thấp nhất. Ở cá chēm (*Lates calcarifer*), nghiên cứu của Thu Lan *et al.*, (2021) thử

thử nghiệm vaccine bất hoạt vi khuẩn *S.iniae* phối trộn tá chất Freund's incomplete adjuvant (FIA) với tỷ lệ 1:1 đã cho hệ số bảo hộ RPS đạt 80% đối với *S.iniae* sau 80 ngày gây miễn dịch (Nguyen Giang Thu Lan *et al.*, 2021). Một thử nghiệm khác trên cá mú (*Epinephelus coioides*), vaccine bất hoạt *S.iniae* phối trộn tá chất ASF (mineral oil-based adjuvant) và ISA 763A (non mineral oil-based adjuvant), đạt hệ số bảo hộ sau 6 tháng đến 97,7% (Huang *et al.*, 2014) Có thể thấy, các loại vaccine trộn tá chất và sử dụng đường tiêm đều cho hiệu quả bảo hộ cao hơn và thời gian bảo hộ lâu hơn. Chất bổ trợ ngoài vai trò như một chất kích thích miễn dịch không đặc hiệu, chúng còn giữ cho kháng nguyên được phóng thích từ từ trong cơ thể vật chủ, kéo dài thời gian tiếp xúc của vật chủ với kháng nguyên, xác lập tính nhớ và kích thích sinh kháng thể đặc hiệu trong thời gian dài.

Ở nghiên cứu này, hệ số bảo hộ RPS đạt cao nhất chỉ là 78,4 %, thấp hơn so với các nghiên cứu sử dụng tá chất tương tự ở trên. Điều này là do cá trong thí nghiệm này chỉ được gây miễn dịch một liều, các nghiên cứu khác đều gây miễn dịch 2 liều cách nhau 14 -28 ngày. Nhiều nghiên cứu cho thấy, cá được gây miễn dịch một liều chỉ tạo ra kháng thể sơ cấp, nồng độ kháng thể tăng dần trong máu và thường suy giảm nhanh nếu không được tiêm nhắc lại. Ở lần tiêm nhắc lại, kháng thể thứ cấp sẽ được tạo ra nhanh chóng và cao hơn rất nhiều. Vì vậy, trong qui trình sử dụng vaccine luôn có lần nhắc lại để hiệu quả bảo hộ được cao và lâu dài hơn. Đối với kết quả này, tá chất Montanide ISA 763 AVG (Seppic, France) sẽ được chọn trong nghiên cứu phối trộn cùng với vaccine phòng bệnh do *Streptococcus iniae* cho cá chêm nuôi.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Vaccine bất hoạt từ vi khuẩn *Streptococcus iniae* SiTH1 phối trộn tá chất Montanide ISA 763 AVG (Seppic, France) tỷ lệ 6:4, sử dụng gây miễn dịch cho cá chêm bằng đường tiêm xoang bụng, liều 0,1 mL/con. Kết quả đánh giá sau 21 ngày gây miễn dịch cho thấy khả năng kích thích sinh kháng thể đặc hiệu tốt nhất và hệ số bảo hộ RPS trong qui mô thí nghiệm là cao nhất, đến 78,4 %.

Tiếp tục nghiên cứu nồng độ kháng nguyên *Streptococcus iniae* SiTH1 phù hợp trong chế tạo vaccine bất hoạt cũng như đánh giá hiệu quả vaccine ở các qui trình sử dụng khác nhau nhằm tạo ra một loại vaccine an toàn, hiệu quả cao trong phòng bệnh cho cá nuôi.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu trên là một phần kết quả thuộc đề tài “Nghiên cứu chế tạo vaccine vô hoạt phòng bệnh do *Streptococcus iniae* ở cá chêm *Lates calcarifer*”, do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã cấp kinh phí và Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản III chủ trì thực hiện. Nhóm tác giả xin bày tỏ lòng biết ơn đến sự hỗ trợ kinh phí và cho phép sử dụng số liệu thuộc nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bromage E, Thomas A, Owens L (1999). *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Dis Aquat Org*, 36: 177-181.
- Creeper JH, Buller NB (2006). An outbreak of *Streptococcus iniae* in barramundi (*Lates calcarifer*) in freshwater cage culture. *Aust Vet J*, 84(11): 408-411.
- Ellis AE (1988). General principles of fish vaccination. Fish Vaccination, Ellis AE, chủ biên. *Academic Press Limited, London*: 1-19.
- Eyngor M, Tekoah Y, Shapira R, Hurvitz A, Zlotkin A, Lublin A, Eldar A (2008). Emergence of novel *Streptococcus iniae* exopolysaccharide-producing strains following vaccination with nonproducing strains. *Appl Environ Microbiol*, 74(22): 6892-6897.
- Hich TV, Quyen VDH, Dung NH, Wergeland HI (2013). Experimental *Streptococcus iniae* infection in barramundi (*Lates calcarifer*) cultured in Vietnam. *Int J Aquat Sci*, 4(1): 3-12.
- Hossain MMM, Ehsan A, Rahman MA, Haq M, Chowdhury MBR (2014). Transmission and pathology of *Streptococcus inane* in monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in aquaculture of Bangladesh. *J Fish*, 2(1): 90-99.
- Klesius PH, Shoemaker CA, Evans JJ (2002). *Streptococcus iniae* vaccine. *US Patent No.* 6,379,677 B1.
- Nguyen Giang Thu Lan; Krishna R.Salin, Siwaporn Longyant Saengchan Senapind, Ha Thanh Dong (2021). Systemic and mucosal antibody response of freshwater cultured Asian seabass (*Lates calcarifer*) to monovalent and bivalent vaccines against *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae*. *Fish Shellfish Immunol*, 108: 7-13.
- Roberson BS (1990). Bacterial agglutination. Techniques in fish immunology. Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, WBvan Muiwinkel (eds). *SOS publications, 43 DeNormandie Ave, Fair Haven, NJ 07704-3303 USA*.
- Stevenson RM (1997). Immunization with bacterial antigens: yersiniosis. *Developments in biological standardization*, 90: 117-124.
- Suanyuk N, Sukkasame N, Tanmark N, Yoshida T, Itami T, Thune RL, Tantikitti C, Supamattaya K (2010). *Streptococcus iniae* infection in culture Asian sea bas (*Lates calcarifer*) and red tilapia (*Oreochromis* sp.) in southern Thailand. *Songklanakarini J Sci Technol*, 32 (4): 341-348.
- Tawab AE, Hofy FE, Ali N, Saad W, El-Mougy E, Mohammed A (2022). Antibiotic resistance genes in *Streptococcus iniae* isolated from diseased *Oreochromis niloticus*. *Egyptian J Aquatic Biology Fisheries*, 26 (2): 413-428.
- Trương Thị Hoa, Nguyễn Ngọc Phước, Đặng Thị Hoàng Oanh (2018). Nghiên cứu đặc điểm bệnh học của vi khuẩn *Streptococcus iniae* trên cá chêm (*Lates calcarifer*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54:156-163.
- Từ Thanh Dung, Huỳnh Thị Ngọc Thanh, Nguyễn Khương Duy (2013). *Streptococcus iniae*, tác nhân gây bệnh “Đen thân” trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 26: 96-103.
- Van Muiswinkel WB (2008). A history of fish immunology and vaccination. *Fish Shellfish Immunol*, 25: 397 – 408.

THE EFFECT OF ADJUVANTS IN INACTIVATED VACCINE TO STIMULATE ANTIBODY PRODUCTION AGAINST *STREPTOCOCCUS INIAE* CAUSING POP-EYE DISEASE IN SEA BASS (*LATES CALCARIFER*)

Nguyen Thi Thanh Thuy*, Nguyen Thi Que Chi, Le Hong Tuan, Nguyen Van Hung

Research Institute for Aquaculture No.3

SUMMARY

The study presents the effects of adjuvants to antibody responses and protective efficacies of an inactivated vaccine against *Streptococcus iniae* in seabass *Lates calcarifer*. Inactivated vaccine includes bacterin biomass of *Streptococcus iniae* SiTH1 at a concentration of 10^{10} cfu/mL, inactivated with formalin, mixed with adjuvants Montanide ISA 763 AVG (Seppic, France), FIA (Freund's Incomplete Adjuvant) and Extracellular polysaccharide (EPS) is extracted from SiTH1 biomass. The experiment included 5 adjuvant treatments (NT1: FKC + ISA763 AVG, ratio 6:4; NT2: FKC + FIA, ratio 1:1; NT3: FKC + 5 mg EPS; NT4: NT1 + 5 mg EPS ; NT5:NT2+5 mg EPS) and control treatments including Control 1: FKC and Control 2: PBS. Each treatment consisted of 30 seabass that were immunized once by intraperitoneal injection, dose of 0.1 mL/fish, triplication. Results analysis of fish sera at 7, 14 and 21 days post immunization showed that antibody titers gradually increased after 1 week of immunization, reaching the highest at 14 days and gradually decreasing at 21 days. In particular, at each time of sample collection, the highest antibody titer were recorded in groups NT1 (FKC + Montanide ISA 763) and NT4 (NT1 + EPS), the significant difference compared to the other groups ($P < 0.05$) and there was no difference between these two groups. On day 21 after immunization, experimental fish were challenged with virulent SiTH1 at a concentration of 10^8 cfu/mL, dose of 0.1 mL/fish. The protective percent survival (RPS) shows that vaccine mixed with ISA763 AVG or ISA763 AVG and EPS were the highest, reached 78.4%; The vaccine group mixed with FIA adjuvants reached 70-73%, the lowest was the vaccine group without adjuvants with only 48.6%.

Keywords: Protective efficacies, antibody responses, *Streptococcus iniae*, adjuvants, vaccine.

* Author for correspondence: Tel: +84-975894976; Email: ngthuy@ria3.vn/ ngthuyria3@gmail.com.