



## KÍCH THÍCH MIỄN DỊCH ĐẶC HIỆU Ở CÁ TRA (*PANGASIANODON HYPOPHTHALMUS*) BẰNG VI KHUẨN *EDWARDSIELLA ICTALURI* ĐỘT BIẾN GEN CHONDROITINASE

Lê Thượng Khởi<sup>1</sup>, Võ Văn Nha<sup>2</sup> và Đặng Thị Hoàng Oanh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bộ môn Sinh học và Bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III, Nha Trang

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 09/11/2012

Ngày chấp nhận: 22/03/2013

### Title:

Stimulation of specific immune response in stripped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) by using Chondroitinase mutated *Edwardsiella ictaluri* bacteria

### Từ khóa:

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*), *Edwardsiella ictaluri*, vắc-xin

### Keywords:

*Pangasianodon hypophthalmus*, *Edwardsiella ictaluri*, vaccine

### ABSTRACT

The ability to stimulate specific immune response in stripped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) of *Edwardsiella ictaluri* bacterial strain mutated chondroitinase (CH) gene was studied. Antibody generated by group soaked with mutated bacteria at a density of  $2,1 \times 10^8$  CFU/mL was significant higher ( $p < 0.05$ ) compared to groups soaking at a density of  $2,1 \times 10^7$ ,  $2,1 \times 10^6$  CFU/mL and control groups. The relative percentage survival (RPS) value was 39%. Significant higher antibody was generated in group soaked with mutated bacteria for 30 minutes compared to group that were soaked 20, 10 minutes and control groups. The obtained RPS value was 29.5%. There was no structural change in liver and kidney of fish in groups soaking with mutated bacteria but necrosis in many parts of liver and kidney of moribund fish after injection with pathogenic strain.

### TÓM TẮT

Khả năng kích thích miễn dịch đặc hiệu kháng bệnh gan thận mù ở cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) của chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* đột biến gen chondroitinase (CH) được thử nghiệm. Hàm lượng kháng thể được tạo ra khi ngâm cá với mật độ vi khuẩn đột biến gen CH là  $2,1 \times 10^8$  CFU/mL cao hơn có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) so với các mật độ ngâm  $2,1 \times 10^7$  và  $2,1 \times 10^6$  CFU/mL và nghiệm thức đối chứng. Tỷ lệ bảo hộ tương đối (RPS) đạt được là 39%. Hàm lượng kháng thể tạo ra khi ngâm cá với vi khuẩn đột biến trong 30 phút nhiều hơn so với ngâm 20 phút, 10 phút và nghiệm thức đối chứng. Tỷ lệ sinh tồn tương đối (RPS) đạt được là 29.5%. Không có sự biến đổi cấu trúc ở gan và thận cá ở tất cả các nghiệm thức ngâm với vi khuẩn đột biến và nghiệm thức đối chứng trước khi gây cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* không đột biến. Tuy nhiên, Sau khi gây cảm nhiễm, cá ở các nghiệm thức đều có gan và thận bị xuất huyết, xung huyết và hoại tử.

## 1 GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây nghề nuôi cá tra ở nước ta phát triển rất nhanh. Tuy nhiên, do sự

phát triển thiếu quy hoạch, không đồng bộ đã làm nảy sinh nhiều vấn đề gây ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng cá nuôi như sự suy thoái và ô nhiễm môi trường và dịch bệnh xảy

ra thường xuyên (Bùi Quang Tê và *ctv.*, 2004). Theo Lý Thị Thanh Loan *et al.* (2007) thì tần suất xuất hiện bệnh ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long như bệnh đốm trắng trên gan, thận (còn gọi là bệnh mũ gan hay bệnh gan thận mũ) là 52,8%; bệnh xuất huyết là 42,5%; bệnh phù đầu/ phù mắt là 20,70% và bệnh vàng da là 21,60%. Trong đó bệnh gan thận mũ do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây ra đã gây thiệt hại nghiêm trọng cho người nuôi cá tra.

Khi dịch bệnh xảy ra người nuôi thường sử dụng các loại kháng sinh với liều lượng tùy ý để điều trị dẫn đến hiện tượng kháng thuốc và tồn lưu chất kháng sinh trong sản phẩm thủy sản, không đảm bảo chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm, ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng và xuất khẩu (Bùi Quang Tê và *ctv.*, 2004). Để hạn chế sử dụng thuốc kháng sinh thì việc nghiên cứu, phát triển các phương pháp phòng bệnh hiệu quả như sử dụng chiết chất từ thảo dược và vắc-xin là rất cần thiết. Ở Việt Nam đã có một vài loại vắc-xin phòng bệnh ở cá được sản xuất và đưa vào sử dụng. Tuy nhiên, các sản phẩm vắc-xin phần lớn được sử dụng bằng phương pháp tiêm nên dễ gây sốc cá và khó áp dụng với ao nuôi cá mật độ cao. Nghiên cứu về miễn dịch đặc hiệu và vắc-xin cho cá tra là một lĩnh vực còn mới mẻ. Hiện nay, kỹ thuật gây đột biến gen đang được sử dụng khá phổ biến để tạo chủng vi khuẩn nhược độc có khả năng kích thích sinh kháng thể miễn dịch đặc hiệu mở ra hướng ứng dụng mới về vắc-xin trong nuôi thủy sản có thể sử dụng bằng phương pháp ngâm và cho ăn. Trong nghiên cứu này, khả năng kích thích miễn dịch đặc hiệu kháng bệnh gan thận mũ do vi khuẩn *E. ictaluri* trên cá tra bằng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen Chonroitinase được thử nghiệm nhằm làm cơ sở cho việc sử dụng vắc-xin nhược độc phòng bệnh ở cá tra.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vi khuẩn gây cảm nhiễm

Chủng vi khuẩn *E. ictaluri* chưa gây đột biến (AG) và chủng *E. ictaluri* đột biến gen Chorontinase (CH) (do Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III cung cấp). Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường tryptone soya

broth (TSB, Merck) từ 24 - 30 giờ, ly tâm 4000 vòng/phút trong 3 phút, rửa 2 lần bằng dung dịch 0,85% NaCl tiệt trùng và xác định mật độ bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 590 nm kết hợp với phương pháp đếm số khuẩn lạc (CFU/ml) phát triển trên môi trường tryptone soya agar (TSA, Merck).

### 2.2 Cá và hệ thống thí nghiệm

Cá tra thí nghiệm có trọng lượng 8-10g/con, khỏe mạnh được bố trí ngẫu nhiên 30 con/bể (thể tích 110 L) chứa nước 2/3 thể tích bể có sục khí và thuần hoá vài ngày cho quen với môi trường thí nghiệm. Cá được cho ăn theo nhu cầu. Thay nước 2 ngày/lần (20-30%) và ghi nhận nhiệt độ và pH của bể thí nghiệm. Trước khi tiến hành thí nghiệm, 10 con cá được chọn ngẫu nhiên để kiểm tra xác định cá không nhiễm ký sinh trùng và vi khuẩn.

### 2.3 Xác định LD<sub>50</sub> của chủng vi khuẩn *E. ictaluri* (AG) chưa gây đột biến bằng phương pháp tiêm

Thí nghiệm xác định LD<sub>50</sub> của chủng vi khuẩn *E. ictaluri* chưa gây đột biến được bố trí với 7 nghiệm thức gồm có: đối chứng không tiêm; tiêm nước muối sinh lý; tiêm vi khuẩn với mật độ từ 10<sup>3-7</sup> CFU/mL. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần với mật độ 30 cá/bể. Cá thí nghiệm được tiêm (0,1mL vi khuẩn/cá) tại gốc vi ngực. Sau khi tiêm, biểu hiện của cá được theo dõi liên tục trong 14 ngày. Những cá có dấu hiệu lơ dờ, bơi lội kém linh hoạt được thu để giải phẫu quan sát dấu hiệu bệnh mũ gan và tái phân lập vi khuẩn từ gan, thận và tỷ tạng. Nồng độ vi khuẩn gây chết 50% cá thí nghiệm (LD<sub>50</sub>) được xác định theo công thức của Reed và Muench (1938).

### 2.4 Xác định khả năng gây bệnh mũ gan của chủng *E. ictaluri* đột biến gen CH bằng phương pháp ngâm

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 6 nghiệm thức gồm: đối chứng không ngâm; ngâm nước muối sinh lý; ngâm với mật độ vi khuẩn từ 10<sup>5-8</sup> CFU/mL. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần với mật độ 30 cá/bể. Cá được ngâm trong dung dịch vi khuẩn 30 phút sau đó bố trí ra các bể. Sau khi ngâm, biểu hiện của cá được

theo dõi trong 14 ngày. Những cá có dấu hiệu lơ òa, bơi lội kém linh hoạt được thu để giải phẫu quan sát dấu hiệu bệnh mũ gan và tái phân lập vi khuẩn từ thận.

## 2.5 Xác định nồng độ thích hợp ngâm vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen CH

Thí nghiệm được bố trí với các nghiệm thức gồm có: (1) ngâm mật độ  $2,1 \times 10^8$  CFU/mL; (2) đối chứng không ngâm; (3) ngâm mật độ  $2,1 \times 10^7$  CFU/mL; (4) đối chứng không ngâm; (5) ngâm mật độ vi khuẩn  $2,1 \times 10^6$  CFU/mL và (6) đối chứng không ngâm. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần với mật độ 30 cá/bể. Cá thí nghiệm được ngâm trong dung dịch vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen trong 30 phút sau đó bố trí ra các bể. Sau khi ngâm 2 tuần, cá được tiêm vi khuẩn chưa gây đột biến (liều LD<sub>50</sub>) cho nghiệm thức thí nghiệm và nghiệm thức đối chứng. Biểu hiện của cá, dấu hiệu bệnh lý và tỉ lệ chết được theo dõi trong suốt quá trình thí nghiệm. Mẫu mô gan, thận, tỳ tạng và mẫu máu cá (khoảng 0,3 - 0,6 mL/cá) được thu hàng tuần sau khi ngâm để đánh giá tác động của vi khuẩn đột biến gen lên mô tế bào và đánh giá khả năng sinh kháng thể của cá. Cá cũng được thu mẫu thận để xác định tình trạng nhiễm *E. ictaluri* bằng phương pháp PCR (Đặng Thị Hoàng Oanh và Đặng Thụy Mai Thy, 2009). Tỉ lệ sinh tồn tương đối (relative survival rate – RPS) được tính theo công thức của Ellis (1998).

## 2.6 Xác định thời gian thích hợp ngâm vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen CH

Thí nghiệm được bố trí với các nghiệm thức: (1) ngâm 30 phút; (2) đối chứng không ngâm; (3) ngâm 20 phút; (4) đối chứng không ngâm; (5) ngâm 10 phút và (6) đối chứng không ngâm. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần với mật độ 30 cá/bể. Cá thí nghiệm được ngâm với vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen, sau đó bố trí ra bể. Sau khi ngâm 2 tuần, cá ở các nghiệm thức được tiêm vi khuẩn chưa gây đột biến (liều LD<sub>50</sub>). Sau đó theo dõi, ghi nhận biểu hiện của cá, dấu hiệu bệnh lý và tỉ lệ chết trong vòng 6 tuần. Hàng tuần sau khi ngâm, thu mẫu mô gan, thận, tỳ tạng cá để đánh giá tác động của vi khuẩn đột biến lên mô tế bào. Mẫu máu (khoảng 0,3 - 0,6 mL/cá) được thu để xác định

hàm lượng kháng thể. Mẫu thận được thu để xác định tình trạng nhiễm *E. ictaluri* bằng phương pháp PCR.

## 2.7 Phản ứng ngưng kết miễn dịch

Mẫu máu (3 con cá/nghiệm thức) được thu vào các tuần thứ 1, 2, 3, 4, 5, 6 và 7 sau khi ngâm cá với vi khuẩn đột biến gen CH để xác định hàm lượng kháng thể theo phương pháp của Roberson (1990). Hiệu giá kháng thể là tần số xuất hiện kháng thể (trong đó 0: nồng độ huyết thanh không pha loãng; 1-10 là nồng độ huyết thanh pha loãng tương ứng  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{16}$ ,  $\frac{1}{32}$ ,  $\frac{1}{64}$ ,  $\frac{1}{128}$ ,  $\frac{1}{256}$ ,  $\frac{1}{512}$ ,  $\frac{1}{1024}$ ) ở độ pha loãng cao nhất có hiện tượng ngưng kết. Hiệu giá kháng thể trung bình là số trung bình hiệu giá kháng thể trong cùng một nghiệm thức.

## 2.8 Phương pháp mô học

Mẫu mô gan, thận và tỳ tạng của cá được thu tương tự như mẫu máu và cố định trong dung dịch formol trung tính. Mẫu được xử lý qua các giai đoạn: loại nước, làm trong mẫu và tẩm paraffin. Sau đó mẫu được đúc khối, cắt với độ dày từ 4 – 6  $\mu$ m và nhuộm Haematoxylin và Eosin. Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi lần lượt ở độ phóng đại 10x, 40x và 100x và chụp hình tiêu bản đặc trưng.

## 2.9 Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm cảm nhiễm và số liệu huyết thanh được xử lý thống kê bằng phần mềm Statistica và Excel.

# 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

## 3.1 Độc lực của chủng *E. ictaluri* đột biến gen CH

Thí nghiệm được tiến hành bằng cách ngâm cá tra khỏe với 4 nồng độ vi khuẩn mang gen đột biến ( $10^5$ - $10^8$  CFU/mL). Sau 14 ngày theo dõi, tất cả các nghiệm thức thí nghiệm đều không xuất hiện cá chết, độ an toàn khi ngâm vi khuẩn mang gen đột biến là 100%. Vi khuẩn được xem như không có độc lực khi có giá trị LD<sub>50</sub>  $\geq 10^8$  CFU/mL (Esteve *et al.*, 1993). Kết quả trên chứng tỏ chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen chondroitinase không còn độc lực và phù hợp để sử dụng để thí nghiệm xác định khả năng kích thích miễn dịch đặc hiệu ở cá tra.

### 3.2 LD50 của chủng vi khuẩn *E. ictaluri* không đột biến

Cá ở thí nghiệm này được tiêm chủng vi khuẩn không đột biến với các nồng độ lần lượt từ  $10^3$ - $10^7$  CFU/mL. Sau 14 ngày thí nghiệm, ở nghiệm thức tiêm  $10^7$  CFU/mL cá chết 100%, cá chết ít nhất (7%) ở nghiệm thức tiêm  $10^3$  CFU/mL và không có cá chết ở nghiệm thức không tiêm và nghiệm thức tiêm nước muối sinh lý. Giá trị LD<sub>50</sub> xác định được là  $4 \times 10^5$  CFU/mL.

### 3.3 Xác định nồng độ ngâm vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen CH

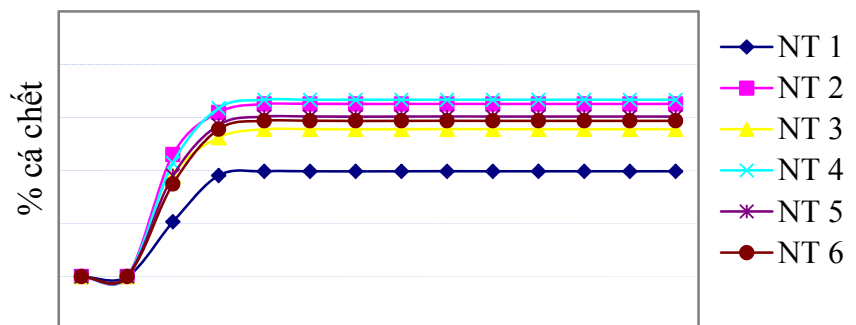
Cá thí nghiệm được ngâm với 3 mật độ vi khuẩn đột biến gen CH là  $10^6$ ,  $10^7$  và  $10^8$  CFU/mL. Hai tuần sau khi ngâm, cá được gây cảm nhiễm (liều LD<sub>50</sub>) với chủng vi khuẩn không đột biến (AG). Kết quả (Hình 1) cho thấy cá ở nghiệm thức ngâm vi khuẩn đột biến gen với mật độ  $10^8$  CFU/mL và cảm nhiễm với vi khuẩn không đột biến (NT 1) có tỉ lệ cá chết thấp nhất (39,6%) đạt giá trị RPS là 39%. Ở nghiệm thức ngâm vi khuẩn đột biến gen CH với mật độ  $10^7$  CFU/mL và gây cảm nhiễm với vi khuẩn không đột biến (NT 3) cá chết với tỉ lệ là 55,6% đạt giá trị RPS là 16,6%. Còn ở nghiệm thức ngâm vi khuẩn mang gen đột biến với mật độ  $10^6$  CFU/mL và gây cảm nhiễm với vi khuẩn không đột biến (NT 5) cá chết với tỉ lệ là 60%. Trong khi đó cá ở các nghiệm thức đối chứng không ngâm vi khuẩn đột biến gen và gây cảm nhiễm với vi khuẩn không đột biến (NT 2, 4 và 6) cá chết với các tỉ lệ chết lần lượt là: 65; 66,6 và 58,7%. Kết quả cho thấy

khi ngâm với mật độ vi khuẩn đột biến là  $10^8$  CFU/mL thì cá được bảo hộ tốt hơn (39%) so với mật độ  $10^7$  CFU/mL. Còn khi ngâm với mật độ  $10^6$  CFU/mL thì cá không được bảo hộ.

Wise và Terhune (2001) thử nghiệm nhúng cá nheo Mỹ với vắc-xin RE-33 (vi khuẩn *E. ictaluri* bất hoạt) ở 3 mật độ  $2,5 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^6$  và  $2,4 \times 10^7$  CFU/mL thì ở mật độ  $2,4 \times 10^7$  CFU/mL cho tỉ lệ sống 37,9% sau khi gây nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* ( $5,5 \times 10^5$  CFU/mL). Trong khi đó, kết quả nghiên cứu vắc-xin phòng bệnh nhiễm khuẩn cho cá (tra, basa, mú, giò và hồng mỹ) nuôi công nghiệp của Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II cho thấy khi tiêm vắc-xin bất hoạt bằng formaline (mật độ  $3 \times 10^9$  CFU/mL) có chất bổ trợ aluminum vào ngày 1 và 14, sau đó gây nhiễm vào ngày 21 thì khả năng bảo hộ miễn dịch ở 2LD<sub>50</sub>, 20LD<sub>50</sub> và 80LD<sub>50</sub> lần lượt là 97%, 93% và 71%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy RPS có giá trị là 39%, có thể do mật độ vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu thấp hơn ( $2,1 \times 10^8$  CFU/mL <  $3 \times 10^9$  CFU/mL), không có sử dụng chất bổ trợ và thực hiện bằng phương pháp ngâm. Lê Hùng Dũng (2007) báo cáo rằng vắc-xin bất hoạt vi khuẩn *E. ictaluri* với 0,4% formaline kết hợp với chất bổ trợ là Montanide ISA 70M-PG không kích thích miễn dịch, còn vắc-xin kết hợp với chất bổ trợ là phèn chua thì tạo đáp ứng miễn dịch cho cá tra ở nồng độ là  $3 \times 10^9$  CFU/mL. Phạm Công Thành (2010) khi tiêm nhắc vi khuẩn *E. ictaluri* bất hoạt trên cá tra thì nhận thấy lượng kháng thể tăng lên đáng kể so với tiêm lần đầu.

**Hình 1: Tỉ lệ cá chết sau cảm nhiễm ở thí nghiệm xác định nồng độ ngâm vi khuẩn đột biến**

NT1:  $10^8$  CFU/mL; NT3:  $10^7$  CFU/mL, NT5:  $10^6$  CFU/mL; NT2, 4, 6: không ngâm



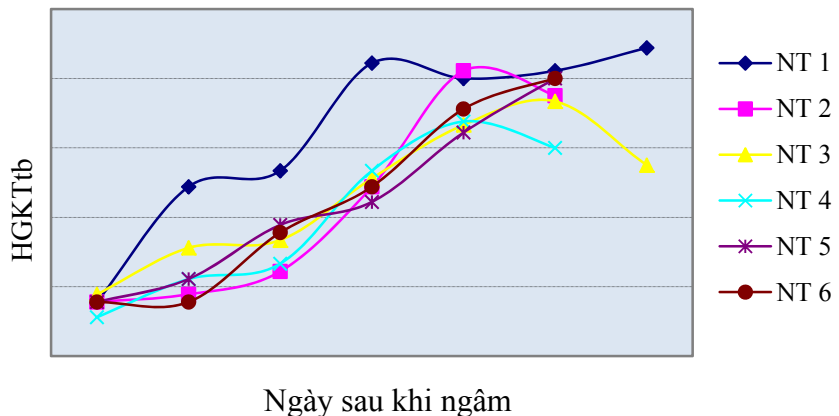
Ngày sau cảm nhiễm

Kết quả cũng tương tự như các thí nghiệm trên cá nheo Mỹ và 1 số loài cá xương khác là kháng thể gia tăng khi được kích thích lần 2 (Hanson *et al.*, 1999). Trong nghiên cứu này cá được ngâm với vi khuẩn đột biến một lần vào ngày thứ nhất sau đó gây cảm nhiễm vào ngày 14. Mặc dù vậy, kết quả cho thấy vi khuẩn đột biến gen CH có khả năng kích thích miễn dịch đặc hiệu ở cá tra thể hiện qua hàm lượng kháng thể được tạo ra và chứng minh sự đề kháng của cơ thể khi cảm nhiễm vi khuẩn có độc lực thông qua hiệu giá kháng thể. Kết quả ở hình 2 cho thấy hiệu giá kháng thể của cá thí nghiệm khác nhau theo tuần thu mẫu và mật độ ngâm. Theo Thune *et al.* (1997) những cá thể khỏe sống trong môi trường sạch bệnh sẽ có hiệu giá kháng thể bằng 0. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, cá trước khi ngâm vi khuẩn đột biến có hiệu giá kháng thể dao động từ 0,56 – 0,89. Kết quả này tương tự với báo cáo của Nguyễn

Hoàng Nhật Uyên (2012) khi khảo sát ở ao nuôi thâm canh cá tra khỏe thì hàm lượng kháng thể luôn duy trì ở mức  $0,5 \pm 0,8$ . Trong điều kiện thí nghiệm nguồn nước được đảm bảo không nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* nhưng do cá thí nghiệm được nuôi trong ao sử dụng nguồn nước tự nhiên nên khó tránh sự tiếp xúc của cá với vi khuẩn trong nguồn nước. Cho nên trước khi chuyển về phòng thí nghiệm cá có thể đã nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* ở mật độ thấp hoặc có độc lực yếu. Tuy nhiên, sự khác biệt về hiệu giá kháng thể của cá giữa các nghiệm thức thí nghiệm không có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Biểu đồ hình 2 cho thấy cá ở nghiệm thức 1 có hiệu giá kháng thể tăng vào tuần thứ 2 sau khi ngâm vi khuẩn đột biến gen CH ( $2,44 \pm 0,52$ ) khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với hiệu giá kháng thể của cá ở nghiệm thức 3, nghiệm thức 5 và nghiệm thức đối chứng.

**Hình 2: Biểu đồ hiệu giá kháng thể trung bình của thí nghiệm xác định nồng độ ngâm vi khuẩn đột biến gen**

NT 1: mật độ ngâm  $10^8$  CFU/mL; NT 3: mật độ ngâm  $10^7$  CFU/mL, NT 5: mật độ ngâm  $10^6$  CFU/mL; NT 2, 4, 6: không ngâm



Hiệu giá kháng thể của cá ở nghiệm thức 1 tăng cao vào tuần thứ 4 ( $4,22 \pm 2,69$ ) và có những cá thể có hiệu giá kháng thể đạt tới 6. Trong khi đó, nghiệm thức 3, 5 và nghiệm thức đối chứng vào tuần 4 hiệu giá kháng thể dao động từ ( $2,44 - 2,67$ ). Theo Nguyễn Hoàng Nhật Uyên (1012) cá tra sau giai đoạn nhiễm bệnh *E. ictaluri* ngoài tự nhiên có hiệu giá kháng thể khoảng  $3,21 \pm 1,5$  và sau đó giảm vào tháng thứ 3 ( $1,23 \pm 0,86$ ). Còn cá tra khi tiêm vắc-xin ALPHA JECT Panga 1 trong phòng thí nghiệm sau 7 ngày hiệu giá kháng thể tăng từ 0 lên  $3,5 \pm 2$ , sau đó tăng cao sau khi gây nhiễm 1 tuần đạt mức hiệu giá kháng thể là  $10,5 \pm 0,3$ .

Hiệu giá kháng thể ghi nhận từ thí nghiệm xác định nồng độ ngâm của chúng tôi có thể giải thích do trước đó cá đã tiếp xúc với vi khuẩn mang gen đột biến tạo được kháng thể nên khi gây cảm nhiễm tạo sự hình thành kháng thể thứ phát, đặc điểm của kháng thể thứ phát là luôn cao hơn nguyên phát và duy trì lâu hơn. Theo Nguyễn Thị Mộng Hoàng và *ctv.* (2009) khi tiêm vi khuẩn bất hoạt thì đáp ứng miễn dịch nhanh và mạnh nếu được tiêm nhắc với liều  $3 \times 10^9$  tbvk/0,2mL, cá được tiêm nhắc có tỉ lệ bảo hộ cao nhất (75%) so với các liều  $10^6$ ,  $10^7$  và  $10^8$  CFU/mL và so với cá không được tiêm nhắc. Trong nghiên cứu này, hiệu giá kháng thể ở các nghiệm thức 3, 5 và đối chứng

bắt đầu tăng vào tuần 4 và tăng cao vào các tuần tiếp theo. Các nghiệm thức này có hàm lượng kháng thể tăng vào tuần thứ 4 có thể do tuần thứ 3 sau khi gây cảm nhiễm những cá còn sống đã chống đỡ được với mầm bệnh và đã sinh ra kháng thể. Kết quả trên phù hợp với nghiên cứu của Vinitnantharat và Plumb (1993) cho thấy những cá sống sót sau khi tiếp xúc với mầm bệnh có hàm lượng kháng thể cao và bảo vệ được cơ thể kháng lại vi khuẩn *E. ictaluri*. Kết quả này cũng cho thấy mật độ  $10^8$  CFU/mL là thích hợp để ngâm vi khuẩn mang gen CH đột biến vì sau 1 tuần đã kích thích được hệ thống miễn dịch của cá tạo ra kháng thể chống lại vi khuẩn gây bệnh dù hàm lượng kháng thể tạo ra không nhiều và tỉ lệ bảo hộ không cao (39%). Shoemaker *et al.* (1999) đánh giá hiệu quả sử dụng vắc-xin sống *E. ictaluri* trên cá nheo ở 7 ngày tuổi, kết quả cho thấy vắc-xin có

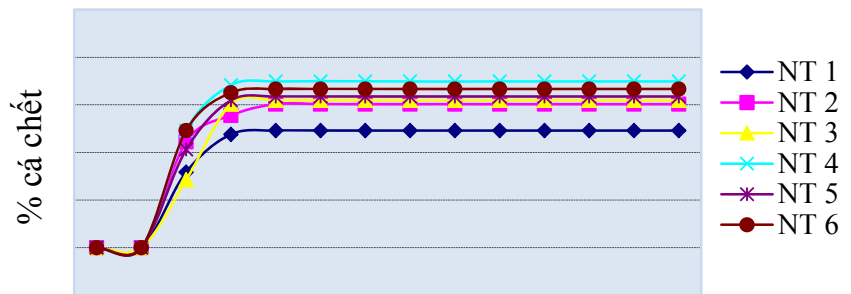
hiệu quả phòng bệnh do vi khuẩn *E. ictaluri* gây ra cho cá da trơn giai đoạn 7 ngày tuổi với tỉ lệ sống và tính an toàn từ 58,4 - 77,5%. So với mật độ ngâm vi khuẩn đột biến là  $10^8$  CFU/mL thì hai mật độ ngâm  $10^6$  và  $10^7$  CFU/mL không kích thích được hệ miễn dịch của cá tạo ra nhiều kháng thể. Nguyên nhân có thể do vi khuẩn chưa nhiễm hoặc đã nhiễm với mật độ không đủ mạnh để kích thích hệ thống miễn dịch tạo ra kháng thể.

### 3.4 Xác định thời gian ngâm vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen CH

Thí nghiệm xác định thời gian ngâm vi khuẩn đột biến được bố trí cùng một mật độ ngâm ( $10^8$  CFU/mL) với 3 thời gian ngâm là 30 phút, 20 phút, 10 phút và 3 nghiệm thức đối chứng không ngâm vi khuẩn đột biến (Hình 3).

**Hình 3: Tỉ lệ cá chết sau cảm nhiễm của thí nghiệm xác định thời gian ngâm vi khuẩn đột biến**

NT1: 30 phút; NT3: 20 phút, NT5: 10 phút; NT2, 4, 6: không ngâm



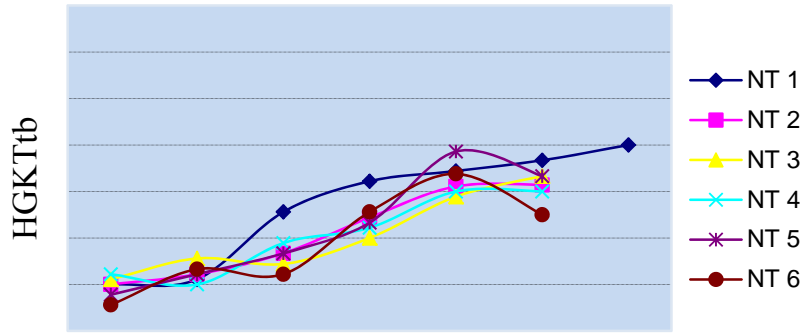
### Ngày sau cảm nhiễm

Biểu đồ hình 3 cho thấy cá ở nghiệm thức ngâm 30 phút với vi khuẩn đột biến gen và gây cảm nhiễm với vi khuẩn không đột biến (NT 1) có tỉ lệ cá chết thấp nhất (49,2%) đạt giá trị RPS là 29,5%. Ở nghiệm thức ngâm 20 phút với vi khuẩn mang gen đột biến và gây cảm nhiễm với vi khuẩn không đột biến (NT 3) cá chết với tỉ lệ là 61,9% đạt giá trị RPS là 11,3%. Còn ở nghiệm thức ngâm 10 phút với vi khuẩn mang gen đột biến và gây cảm nhiễm với vi khuẩn không đột biến (NT 5) cá chết với tỉ lệ là 63,4% đạt giá trị RPS là (4,8%). Trong khi đó cá ở các nghiệm thức đối chứng không ngâm vi khuẩn mang gen đột biến và gây cảm nhiễm với vi khuẩn không đột biến (NT 2, 4 và 6) cá chết với các tỉ lệ chết lần lượt là: 60; 69,8 và 66,6%. Như vậy, thời gian ngâm vi khuẩn mang gen đột biến ảnh hưởng đến khả năng xâm nhập của

vi khuẩn để kích thích cơ thể tạo ra kháng thể chống lại mầm bệnh. Kết quả cũng chỉ ra rằng thời gian 30 phút là thích hợp hơn 10 và 20 phút để ngâm vi khuẩn mang gen đột biến với hệ số bảo hộ 29,5%. Nakanishi và Ototake (1997) kết luận rằng thời gian ngâm kháng nguyên càng lâu càng kích thích cơ thể đáp ứng tạo miễn dịch càng mạnh. Ở thí nghiệm này giá trị RPS của nghiệm thức ngâm cá vi khuẩn đột biến trong 30 phút là 29,5% nhỏ hơn giá trị RPS (39%) ở nghiệm thức tương tự của thí nghiệm xác định mật độ ngâm thích hợp. Nguyên nhân có thể do sự chênh lệch nồng độ ngâm giữa 2 thí nghiệm. Ở thí nghiệm xác định mật độ thích hợp, cá được ngâm với mật độ vi khuẩn là  $2,1 \times 10^8$  CFU/mL nhưng ở thí nghiệm thời gian mật độ là  $0,6 \times 10^8$  CFU/mL.

**Hình 4: Hiệu giá kháng thể trung bình của thí nghiệm xác định thời gian ngâm vi khuẩn đột biến**

NT1: 30 phút; NT3: 20 phút, NT5: 10 phút; NT 2, 4, 6: không ngâm



Ngày sau khi ngâm

Vào tuần thứ 3, ở nghiệm thức ngâm 30 phút với vi khuẩn đột biến (NT 1) có hiệu giá kháng thể tăng ( $2,56 \pm 1,78$ ) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) với nghiệm thức 3, 5 và nghiệm thức đối chứng (Hình 4). Ở các nghiệm thức này hiệu giá kháng thể bắt đầu tăng vào tuần thứ 4 nhưng vẫn thấp so với nghiệm thức 1. Kết quả này cũng tương tự như kết quả của thí nghiệm xác định mật độ ngâm thích hợp là chỉ có nghiệm thức ngâm mật độ  $10^8$  CFU/ml trong 30 phút là có hiệu giá kháng thể tăng, các nghiệm thức còn lại hiệu giá kháng thể chỉ tăng sau khi gây cảm nhiễm 1 tuần. Kết quả này cũng phù hợp với tỉ lệ cá chết sau khi cảm nhiễm. Nguyễn Hữu Thịnh và *ctv.* (2009) ngâm vi khuẩn bất hoạt nồng độ từ  $5,5 \times 10^{3-6}$  FU/mL với thời gian ngâm là 30 phút cho thấy vắc-xin có hiệu quả và phương pháp ngâm kết hợp cho ăn thì hiệu quả cao hơn.

### 3.5 Dấu hiệu bệnh lý của cá cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri*

Cá cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* không

đột biến có hiện tượng nổi đầu, bơi lờ đờ và chết. Một số cá bị xuất huyết ở da, vây, mang tái nhạt, nội quan có màu nhạt, một số cá có dịch trong xoang bụng. Gan, thận và tỳ tạng có nhiều đốm trắng (đường kính 1-2 mm) (Hình 5). Một số cá bệnh có thận sưng to và nhũn. Dấu hiệu bệnh lý của cá cảm nhiễm tương tự như mô tả của Ferguson *et al.* (2001).

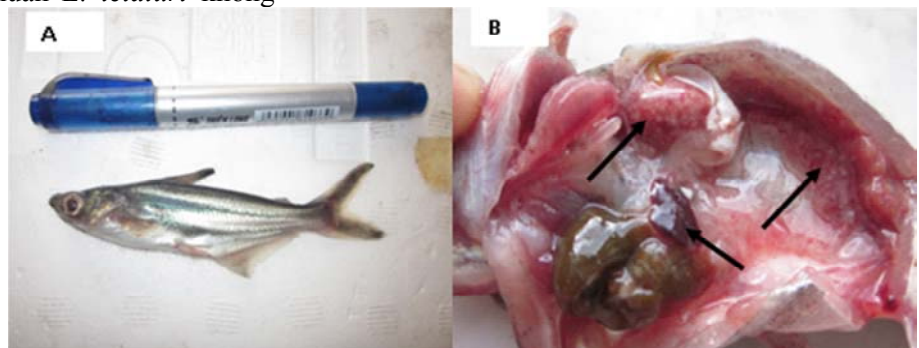
### 3.6 Biến đổi về mô học

#### 3.6.1 Biến đổi mô học của cá ngâm vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen CH

Cá ngâm với vi khuẩn đột biến không có sự biến đổi cấu trúc mô học ở 3 cơ quan: gan, thận và tỳ tạng. Điều này có thể giải thích khi vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen CH xâm nhập vào cơ thể cá kích thích tạo kháng thể nhưng không làm ảnh hưởng đến cấu trúc mô và không làm cá chết. Cả 3 nồng độ ngâm vi khuẩn *E. ictaluri* mang gen đột biến đều không xuất hiện cá chết trong 2 tuần sau khi ngâm.

**Hình 5: Dấu hiệu bệnh của cá tra cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri***

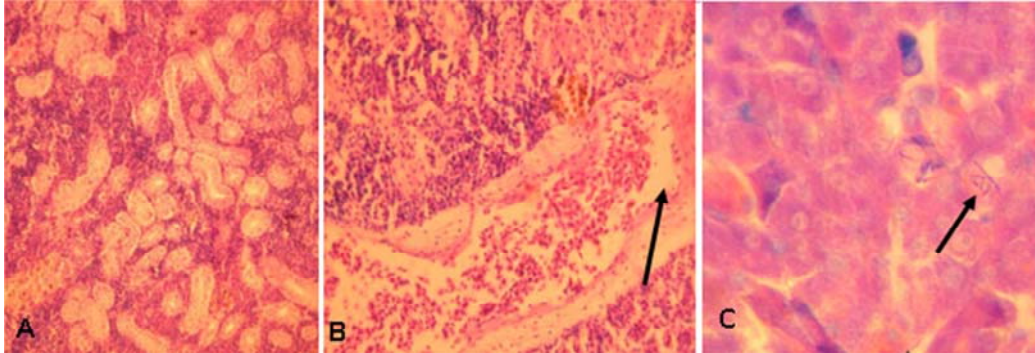
A: Bên ngoài. B: Bên trong (mũi tên chỉ đốm trắng trên gan, thận và tỳ tạng)



### 3.6.2 Biến đổi mô học của cá cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* không đột biến

Mô thận cá bị nhiễm *E. ictaluri* bị biến đổi ở đa số mẫu quan sát. Cấu trúc tiểu cầu thận biến đổi, tế bào biểu mô cấu tạo nên ống thận bị vỡ

tạo xoang rộng. Giai đoạn này, ống thận và tiểu cầu thận gần như biến mất, quản cầu thận sưng huyết phình to và vỡ ra (Hình 6). So với thận, cấu trúc mô gan biến đổi chậm hơn, liên kết cấu trúc tế bào phá hủy, đảo tụy và tĩnh mạch gan xung huyết, tế bào xuất huyết.



Hình 6: Thận cá cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri*

A. Thận cá khỏe. B. Thận cá bệnh (mũi tên chỉ vùng bị biến đổi cấu trúc và tạo khoảng trống). C. Nhuộm Giemsa (mũi tên chỉ thấy có vi khuẩn tồn tại trong tế bào)

### 3.7 Phát hiện *E. ictaluri* từ thận cá thí nghiệm bằng phương pháp PCR

Mẫu cá được thu vào lúc ngâm vi khuẩn đột biến gen, cá chết sau gây cảm nhiễm 48 và 72 giờ và cá sống kể từ ngày thứ 8 sau khi gây cảm nhiễm để phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri* bằng PCR. Kết quả là tất cả các mẫu cá bệnh đều hiện vạch 407bp, cá trước khi gây cảm nhiễm (mẫu thận cá ở NT1, ngâm vi khuẩn đột biến  $10^8$  CFU/mL) cho kết quả dương tính chứng tỏ có sự hiện diện của vi khuẩn đột biến gen trong cơ thể cá nhưng không làm cá chết. Ở các nghiệm thức còn lại đều không phát hiện *E. ictaluri*. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả phân tích kháng thể cho thấy kích thích được cá sinh kháng thể vào tuần thứ 2 trong khi các nghiệm thức khác không tạo được kháng thể. Tương tự ở thí nghiệm xác định nồng độ ngâm những cá bệnh đều hiện vạch 407bp nhưng cá ở cả các nghiệm thức trước và sau khi gây nhiễm 8 ngày không hiện vạch 407bp.

## 4 KẾT LUẬN

Ngâm cá tra với vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen CH ở mật độ  $2,1 \times 10^8$  CFU/mL đạt tỉ lệ sinh tồn tương đối là 39%. Thời gian ngâm là 30 phút đạt tỉ lệ sinh tồn tương đối là 29,5%. Hiệu giá kháng thể bắt đầu tăng vào tuần thứ 2 (2,44

$\pm 0,52$ ) sau khi ngâm vi khuẩn đột biến gen CH (mật độ  $2,1 \times 10^8$  CFU/mL trong 30 phút) và tiếp tục tăng vào các tuần sau (tuần thứ ba đến tuần thứ 6). Không có sự biến đổi cấu trúc của cá ngâm vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen CH nhưng có sự biến đổi cấu trúc ở gan và thận ở cá cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* không đột biến.

## LỜI CẢM TẠ

Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí đề tài “Nghiên cứu tạo dòng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* nhược độc dùng làm vaccine phòng bệnh gan thận mũ cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng kỹ thuật gây đột biến gen” thuộc chương trình Công nghệ Sinh học Ứng dụng trong Thủy sản do Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn tài trợ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Quang Tề, L.X. Thành, N.T.B. Thùy, C.H. Phú, N.T. Hào., 2004. Kết quả nghiên cứu vaccin phòng bệnh xuất huyết hoại tử nội tạng (đốm trắng) cho cá tra. Báo cáo kết quả nghiên cứu của Đề tài cấp Nhà nước, mã số KC-06-20.NN: “Nghiên cứu giải pháp kỹ nuôi tôm sú, cá tra và cá basa bảo đảm vệ sinh an toàn thực phẩm”, 2003-2005.



2. Đặng Thị Hoàng Oanh và Đặng Thụy Mai Thy, 2009. Nghiên cứu ứng dụng qui trình PCR chẩn đoán vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trên thân cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Kỷ yếu Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2009: CNSH phục vụ nông-lâm nghiệp, thủy sản, công nghiệp, y-dược và bảo vệ môi trường. 289-292.
3. Ferguson, H.W., J.F. Turnbull, A. Shinn, K. Thompson, T.T. Dung, and M. Crumlish, 2001. Bacterial necrosis in farmed *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage) from the Mekong Delta, Viet Nam. *Journal of Fish Diseases* 24:509-513.
4. Lê Hùng Dũng, Nguyễn Diễm Thu, Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Thị Mộng Hoàng, Nguyễn Mạnh Thắng, Nguyễn Văn Hào. Xác định tính sinh miễn dịch và hiệu quả của các loại vacxin từ vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phân lập trên cá tra tại các vùng địa lý và thời điểm khác nhau của đồng bằng sông Cửu Long. *Tuyển tập nghề cá sông Cửu Long*, 2007.
5. Loan Thi Thanh Ly, Du Ngoc Nguyen, Phuong Hong Vo, Cuong Van Doan. 2009. Hemorrhage Disease of Cultured Tra Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Mekong Delta (Vietnam). *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah* 61(3).
6. Nguyễn Hoàng Nhật Uyên, Trần Hoa Cúc và Từ Thanh Dung, 2012. Khả năng đáp ứng miễn dịch của cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) chống vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*. *Tuyển tập Hội nghị khoa học trẻ ngành thủy sản toàn quốc lần thứ III (03/2012)*. Trường Đại học nông lâm Huế, Trang 42-49.
7. Nakanishi, T. and M. Ototake., 1997. In: R. Gudding, A. Lillehaug, P.J. Midtlyng, F. Brown (Eds), *Fish Vaccinology*, Dev. Biol. Stand. Karger Basel p.59.
8. Shoemaker, C.A, P.H. Klesius, J.M. Bricker., 1999. Efficacy of a modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine in channel catfish as young as seven days post hatch *Aquaculture*, 176pp.
9. Thinh, N.H, T.Y. Kuo, L.T. Hung, T.H. Loc, S.C. chen, Evensen, H.J. Schuurman., 2009. Combined immersion and oral vaccination of Vietnamese catfish (*Pangasius hypophthalmus*) confers Protection against mortality caused by (*Edwardsiella ictaluri*). *Fish and Shellfish immunology* 27 (2009). 773-776.
10. Wise, D.J. and J.S. Terhune., 2001. The Relationship Between Vaccine Dose and Efficacy in Channel Catfish *Ictalurus punctatus* Vaccinated as Fry with a live attenuated Strain of *Edwardsiella ictaluri* (RE-33). *Journal of the world aquaculture Society*, Vol. 32, June, 2001.