

DOI:10.22144/ctu.jvn.2023.075

ẢNH HƯỞNG CỦA TẦN SUẤT CHO ĂN VÀ KHẢ NĂNG TĂNG CƯỜNG HIỆU QUẢ CỦA B-GLUCAN VÀ VITAMIN C ĐỐI VỚI VACCINE PHÒNG BỆNH *Edwardsiella ictaluri* LÂY NHIỄM TRÊN CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Lê Minh Khôi¹, Nguyễn Bảo Trung¹, Huỳnh Trung Hiếu² và Từ Thanh Dung^{1*}

¹Khoa Bệnh học Thủy sản, Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

²Sinh viên Khoá 44, Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Từ Thanh Dung (email: ttdung@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 03/10/2022

Ngày nhận bài sửa: 29/11/2022

Ngày duyệt đăng: 06/12/2022

Title:

Effects of feeding frequency and efficacy of the β -glucan and vitamin C to enhance the ability of vaccine prevent *Edwardsiella ictaluri* infected in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Từ khóa:

β -glucan, cá tra, chất kích thích miễn dịch, *Edwardsiella ictaluri*, vaccine cho ăn

Keywords:

β -glucan, *Edwardsiella ictaluri*, immunostimulant, oral vaccine, striped catfish

ABSTRACT

This study was evaluated the effects of feeding frequency using an oral vaccine and the potential of β -glucan and vitamin C to enhance the vaccine efficacy in preventing bacilli necrosis in striped catfish. Experiment 1 evaluating vaccine feeding frequency was arranged with 5 treatments with oral vaccines used at different feeding frequencies and 1 control. The results revealed that the fish fed with vaccine continuously for 9 days had the greatest RPS value ($42 \pm 7.07\%$) when challenged with *E. ictaluri*, whereas the growth performance of vaccine treatment groups was lower than in the control, but the difference was not significant ($p > 0.05$). In experiment 2, fish was fed with the vaccine continuously for 9 days in combination with different concentrations of immunostimulants. The results showed that the vaccine supplemented with 2% β -glucan not only improve the RPS value ($52.4 \pm 0\%$) and the antibody level (6.25 ± 1.77) but also reduce the negative effects of oral vaccines. This study revealed that the protective ability of the oral vaccine will be increased with continuous supplementation and β -glucan might be used as an adjuvant to an oral vaccination in striped catfish.

TÓM TẮT

Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của nhịp sử dụng vaccine cho ăn và tiềm năng của β -glucan với vitamin C trong tăng cường hiệu quả vaccine phòng bệnh gan thận mù trên cá tra. Thí nghiệm 1 đánh giá nhịp cho ăn vaccine được thực hiện với 5 nghiệm thức vaccine cho ăn các nhịp khác nhau và nghiệm thức đối chứng. Kết quả cho thấy nghiệm thức sử dụng vaccine liên tục 9 ngày có giá trị RPS cao nhất ($42 \pm 7,07\%$) khi cảm nhiễm với *E. ictaluri*, tăng trưởng của cá ở nghiệm thức cho ăn vaccine thấp hơn so với đối chứng nhưng khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Thí nghiệm 2 bổ sung kết hợp β -glucan và vitamin C vào vaccine cho ăn liên tục trong 9 ngày. Nghiệm thức vaccine kết hợp 2% β -glucan cải thiện RPS ($52,4 \pm 0\%$) và hiệu giá kháng thể ($6,25 \pm 1,77$), đồng thời làm giảm tác dụng phụ của vaccine cho ăn. Kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng bảo hộ của vaccine cho ăn gia tăng khi bổ sung liên tục và β -glucan có thể sử dụng như chất bổ trợ đối với vaccine cho ăn trên cá tra.

1. GIỚI THIỆU

Cá tra (*P. hypophthalmus*) là một trong những đối tượng nuôi chủ lực của vùng đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Năm 2021, ngành thủy sản Việt Nam nói chung và nghề nuôi cá tra nói riêng đã vượt qua đại dịch Covid-19, duy trì được chuỗi sản xuất, cung ứng. Dù vậy, bước sang năm 2022, ngành hàng cá tra vẫn còn phải đối mặt với rất nhiều thách thức, đặc biệt do các đợt bùng phát bệnh xảy ra thường xuyên nằm ngoài mức kiểm soát. Đặc biệt, bệnh gan thận mù do vi khuẩn *E. ictaluri* là vấn đề được quan tâm hàng đầu, việc điều trị bệnh tốn nhiều chi phí nhưng hiệu quả không cao, bệnh có thể tái phát trong suốt quá trình nuôi (Dung et al., 2008). Riêng nửa đầu năm 2022 tại ba tỉnh Vĩnh Long, An Giang và Đồng Tháp, đã ghi nhận gần 60 ha diện tích nuôi cá tra bị nhiễm bệnh gan thận mù (Tổng cục Thủy sản, 2022).

Bệnh gan thận mù do vi khuẩn *E. ictaluri* là tác nhân chính lây nhiễm ở tất cả các giai đoạn từ cá hương đến cá thịt của qui trình nuôi cá tra, gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng (Dung et al., 2008). Người nuôi chủ yếu sử dụng kháng sinh để trị bệnh và việc sử dụng thuốc kháng sinh không đúng đã dẫn đến hiện tượng kháng thuốc. Theo Thi et al. (2014), hầu hết các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập trên cá tra nhiễm bệnh gan thận mù đều có biểu hiện sự đa kháng thuốc. Bên cạnh đó, dư lượng thuốc kháng sinh trên sản phẩm thủy sản cũng là vấn đề được quan tâm do ảnh hưởng đến chất lượng thủy sản và sức khỏe của người tiêu dùng (Akinbowale et al., 2006). Nhiều giải pháp đã được đưa ra và áp dụng vào nuôi trồng thủy sản, nhưng sử dụng vaccine phòng bệnh được xem là giải pháp tối ưu nhất nhằm hướng đến một nền thủy sản bền vững trong tương lai (Dadar et al., 2017). Ngoài ra, vaccine thủy sản còn có thể được xem là một loại bảo hiểm về sức khỏe cho cá và cả người tiêu dùng (Komar et al., 2004).

Hiện nay, có nhiều phương pháp sử dụng vaccine nhưng cho ăn là phương pháp đơn giản có thể áp dụng ở mọi giai đoạn nuôi, không gây sốc cá và có chi phí sử dụng thấp nhất (Plant & LaPatra, 2011). Tuy nhiên, hiệu quả của vaccine thường không rõ ràng và khả năng đáp ứng miễn dịch cũng có sự khác biệt giữa các loài cá khác nhau (Joosten et al., 1997; Ashida et al., 1999; Dubois et al., 2005; Kamilya et al., 2006; Thinh et al., 2009; Jaafar et al., 2019). Vaccine cho ăn thường được sử dụng như một liều vaccine tăng cường sau liều vaccine ngâm và tiêm trước đó giúp tạo ra phản ứng miễn dịch thứ cấp mạnh mẽ (Thinh et al., 2009; Ballesteros et al., 2014; Jaafar et al., 2019;). Bên cạnh đó, vaccine cho

ăn giúp kéo dài thời gian bảo hộ nhằm bảo vệ cá chống lại các tác nhân có thời gian ủ bệnh kéo dài (Brudeseth et al., 2013). Một số yếu tố như loại kháng nguyên (KN), thời gian cho ăn, cấu trúc vaccine, chất bổ trợ sẽ ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả của vaccine cho ăn (Mutoloki et al., 2015). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm hiểu tác động của nhịp bổ sung hay thời gian sử dụng vaccine cho ăn trên cá tra (*P. hypophthalmus*) và thử nghiệm các chất bổ trợ hữu cơ nhằm tăng cường hiệu quả vaccine cho ăn.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguồn vi khuẩn và phương pháp chuẩn bị KN

Chủng vi khuẩn *E. ictaluri* EI37 đã xác định giá trị độc lực $LD_{50} = 2,35 \times 10^5$ CFU/mL và được trữ trong tủ đông -80°C (Khoa Bệnh học Thủy sản, Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ).

Vi khuẩn được phục hồi trên môi trường thạch tryptic soya agar (TSA-Merck) và kiểm tra các chỉ tiêu sinh hoá cơ bản để nuôi tăng sinh thu sinh khối. Khuẩn lạc vi khuẩn *E. ictaluri* EI37 thuần được nuôi trong môi trường tryptic soya broth (TSB-Merck) ở 28°C trong 48 giờ. Vi khuẩn *E. ictaluri* EI37 được bất hoạt bằng formol (Merck) ở nồng độ 0,8% trong 4 giờ trên máy lắc tròn 150 rpm. Vi khuẩn được kiểm tra sự bất hoạt bằng phương pháp trải đĩa (Santos et al., 2005) và sau đó ly tâm dung dịch vi khuẩn ở 4.500 rpm trong 10 phút, thu sinh khối rửa sạch với nước muối sinh lý tiệt trùng (NaCl 0,85%) 2-3 lần. KN được giữ trong dung dịch PBS (pH 7,2) ở mật độ $OD_{610\text{nm}} = 1,0 \pm 0,1$ và bảo quản ở nhiệt độ 4°C đến khi sử dụng phối trộn vào thức ăn hoặc sử dụng trong thí nghiệm phân tích miễn dịch.

2.2. Chuẩn bị thức ăn chứa KN

Thức ăn vaccine bất hoạt vi khuẩn *E. ictaluri* EI37 với nồng độ $1,05 \times 10^9$ CFU/mL được chuẩn bị tại phòng thí nghiệm Khoa Bệnh học Thủy sản, Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Phương pháp phối trộn được thực hiện dựa theo Kole et al. (2019) có điều chỉnh. Dịch huyền phù KN được phun đều bề mặt thức ăn (32% đạm, Proconco) với tỉ lệ 35% (thể tích/khối lượng) và sấy ở 50°C trong 1 giờ. Dầu gan mực (công ty Vemedim) được sử dụng như chất phủ ngoài hạt thức ăn với tỉ lệ 1% (thể tích/khối lượng) và tiếp tục sấy 37°C trong 1 giờ. Thức ăn được làm mới mỗi 3 ngày và bảo quản ở nhiệt độ 4°C .

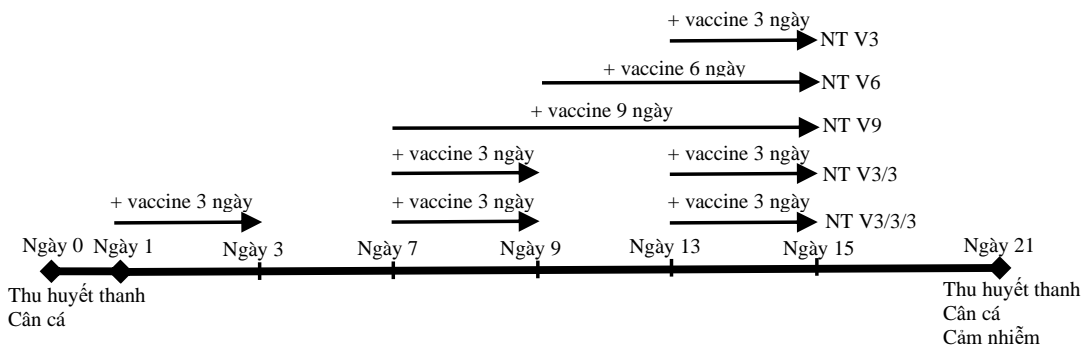
2.3. Nguồn cá tra thực hiện thí nghiệm

Cá tra giống khỏe (*P. hypophthalmus*) có khối lượng từ 12 đến 15 g/con được nuôi tại trại thực

thí nghiệm công nghệ cao Trường Thủy sản. Cá được thuần dưỡng 1 tuần trong bể nhựa có thể tích 1.000 L có sục khí và cho ăn hằng ngày. Trước khi bố trí thí nghiệm, cá được kiểm tra các mầm bệnh vi khuẩn, ký sinh trùng và vi nấm và chọn đàn cá không nhiễm bệnh.

2.4. Thí nghiệm 1: Đánh giá ảnh hưởng của thời gian và nhịp cho ăn vaccine đối với tính sinh miễn dịch ở cá tra (*P. hypophthalmus*)

Cá tra khỏe được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 6 nghiệm thức bao gồm 5 nghiệm thức bổ sung thức ăn vaccine theo sơ đồ Hình 1 và nghiệm thức đối chứng (ĐC) không bổ sung vaccine trong thức ăn.



Hình 1. Sơ đồ thí nghiệm ảnh hưởng của thời gian và nhịp cho ăn vaccine đối với tính sinh miễn dịch ở cá tra

2.5. Thí nghiệm 2: Đánh giá hiệu quả của các chất bổ trợ trong vaccine cho ăn trên cá tra (*P. hypophthalmus*)

Thí nghiệm được bố trí gồm 5 nghiệm thức, thức ăn được phối trộn vaccine từ cùng 1 nguồn, được chia thành 5 phần bằng nhau tương ứng với 4 nghiệm thức cho ăn và một nghiệm thức đối chứng chỉ cho ăn vaccine (Hình 2). Các chất bổ trợ sẽ được tiến hành phối trộn β- 1,3 glucan (UV, Việt Nam) và Vitamin C – acid ascorbic 97% (UV, Việt Nam) vào KN ở nồng độ sau: β-glucan 1%/mL KN (VC-B1%), 2 %/mL KN (VC-B2%); Vitamin C: 500 mg/mL KN (VC-V500), 1000 mg/mL KN (VC-V1000), nghiệm thức còn lại chỉ chứa KN không chứa chất bổ trợ (ĐC-VC). Bên cạnh đó, 3 nghiệm thức không chứa KN bao gồm 1 nghiệm thức đối chứng không cho ăn vaccine (ĐC) và 2 nghiệm thức bổ sung chất bổ trợ hữu cơ: β-glucan 2 %/mL nước cất (ĐC-B2%), vitamin C 1.000 mg/mL nước cất (ĐC-V1000). Hỗn hợp thức ăn sau đó được sấy khô và phủ dầu mực tương tự mục 2.2 (Kole et al., 2019). Vaccine được sử dụng bằng cách cho ăn 9 ngày liên

Mật độ 50 con/bể 250 L và mỗi nghiệm thức được bố trí lặp lại 3 lần theo dõi trong 21 ngày. Hằng ngày, cá thí nghiệm được cho ăn từ 4 đến 5% khối lượng thân, theo dõi lượng thức ăn trong suốt thời gian bố trí thí nghiệm. Bên cạnh đó, chỉ tiêu về tỷ lệ sống (SR; %), tăng trưởng (WG; g), tăng trưởng tuyệt đối về khối lượng (DWG; g/ngày), tăng trưởng tương đối về khối lượng (SGR_w; %/ngày) được ghi nhận tại ngày thứ 21. Mẫu huyết thanh để phân tích ngưng kết miễn dịch được thu tại ngày 0 và ngày thứ 21 trước khi tiến hành thí nghiệm cảm nhiễm. Các chỉ tiêu môi trường nước bao gồm nhiệt độ (°C), pH, DO (mg/L) được theo dõi mỗi ngày. Hai chỉ tiêu môi trường NH₃/NH₄⁺ (mg/L) và NO₂⁻ (mg/L) được ghi nhận mỗi 5 ngày cho đến kết thúc thí nghiệm.

thực (theo kết quả của thí nghiệm trước) với khẩu phần 4-5% khối lượng thân mỗi ngày.

Tương tự thí nghiệm 1, các nghiệm thức được theo dõi tổng lượng thức ăn và tổng lượng vaccine cho ăn để tính hàm lượng KN được bổ sung vào mỗi nghiệm thức theo công thức:

$$\text{Tổng lượng KN (CFU/cá)} = \text{Nồng độ KN (CFU/mL)} \times \text{Tổng TA vaccine (g)} \times \text{tỉ lệ trộn (mL/gTA)} / \text{Tổng khối lượng cá sau thí nghiệm (g)}$$

$$\text{Trung bình KN (CFU/g cá/ngày)} = \text{Tổng lượng KN (CFU/cá)} / \text{Tổng thời gian cho ăn (ngày)}$$

Bên cạnh đó, cá thí nghiệm được theo dõi tỉ lệ sống (SR; %), tăng trưởng (WG; g), tăng trưởng tuyệt đối về khối lượng (DWG; g/ngày), tăng trưởng tương đối về khối lượng (SGR_w; %/ngày). Khối lượng cá và huyết thanh được thu mẫu tại ngày 0 và ngày thứ 16.

$$\text{Tăng trưởng (WG; g)} = W_f - W_i$$

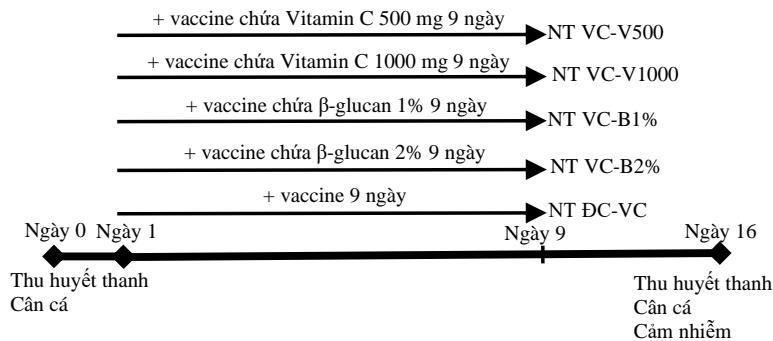
$$\text{Tốc độ tăng trưởng tương đối (SGR}_w\text{; \% / ngày)} = [(LnW_f - LnW_i) / T] \times 100$$

Tăng trưởng hằng ngày (DWG; g) = $(W_f - W_i) / T$.

Tỉ lệ sống (SR; %) = $(\text{Số lượng cá thu hoạch} / \text{Số lượng cá ban đầu}) \times 100$

W_f : khối lượng cuối cùng, W_i : khối lượng ban đầu, T: tổng thời gian thí nghiệm.

Sau đó, cá thí nghiệm cũng được tiến hành cảm nhiễm để đánh giá hiệu quả bảo hộ. Các chỉ tiêu môi trường nước bao gồm nhiệt độ (°C), pH, DO (mg/L), $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (mg/L) và NO_2^- (mg/L) cũng được theo dõi trong suốt thí nghiệm.



Hình 2: Sơ đồ bố trí thí nghiệm các nghiệm thức cho ăn vaccine và chất bổ trợ

2.6. Thí nghiệm cảm nhiễm đánh giá khả năng bảo hộ của vaccine cho ăn kháng E. ictaluri

Sau khi kết thúc thời gian theo dõi (ngày 21 đối với thí nghiệm 1 và ngày 16 đối với thí nghiệm 2), cá bố trí được tiến hành cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm 0,1 mL vi khuẩn *E. ictaluri* EI37 vào xoang bụng. Cá được gây nhiễm ở nồng độ gấp 10 lần giá trị LD₅₀ (Khôi và ctv., 2021). Mỗi nghiệm thức cảm nhiễm tương ứng với nghiệm thức bố trí thí nghiệm trước đó và một nghiệm thức đối chứng không tiêm vi khuẩn. Mật độ cảm nhiễm mỗi nghiệm thức bao gồm 15 con/bể 250 L, được lặp lại 3 lần. Theo dõi biểu hiện của cá liên tục trong 14 ngày, thu mẫu cá lờ đờ hoặc mới chết giải phẫu quan sát dấu hiệu bệnh lý và tái phân lập vi khuẩn từ gan, thận và tỳ tạng trên môi trường TSA. Số cá chết trong quá trình cảm nhiễm được ghi nhận và tính tỷ lệ bảo hộ (RPS: relative percent of survival) của vaccine ở thời điểm cuối thí nghiệm theo công thức của Amend (1981):

$$RPS(\%) = 1 - \frac{\% \text{ chết NT vaccine}}{\% \text{ chết NT đối chứng}} \times 100\%$$

2.7. Xác định hiệu giá kháng thể bằng phương pháp vi ngưng kết miễn dịch

Cá tra thí nghiệm được gây mê với AQUIS® (Bayer) (nồng độ 100 ppm) trong 1 - 2 phút trước khi thu mẫu máu từ động mạch chủ ở cột sống và giữ lạnh ở 4°C; sau 2 - 3 giờ, tiến hành ly tâm 6.000 rpm trong 5 phút. Phần huyết thanh nổi được thu và cho vào tuýp ly tâm 1,5 mL tiệt trùng. Phương pháp vi ngưng kết được thực hiện trên các đĩa nhựa 96

giếng đáy tròn theo phương pháp của Roberson et al. (1990) có điều chỉnh và được trình bày tóm tắt như sau: cho 25 µL huyết thanh vào giếng số 1 và 2, từ giếng số 2 trở đi pha loãng 2 lần huyết thanh bằng nước muối sinh lý. Sau đó, cho 25 µL dung dịch KN vào các giếng trộn đều. Để qua đêm ở nhiệt độ 4°C, kết quả được đọc trong vòng 24 giờ bằng cách quan sát phản ứng ngưng kết dưới đáy giếng. Phản ứng dương tính (+): đáy giếng tạo thành một lớp ngưng kết trải rộng; phản ứng âm tính (-): ở đáy giếng chỉ có một chấm tròn nhỏ màu trắng. Độ pha loãng cao nhất của huyết thanh quan sát thấy phản ứng dương tính sẽ được biểu thị dưới dạng hiệu giá kháng thể.

Hiệu giá kháng thể = $\log_2(\text{độ pha loãng})$

2.8. Xử lý số liệu

Phương pháp ANOVA một nhân tố và phép thử DUNCAN ở mức ý nghĩa $p < 0,05$ của phần mềm SPSS 20.0 được sử dụng để phân tích sự khác biệt của các chỉ tiêu tăng trưởng, tỉ lệ sống, mức kháng thể và tỉ lệ chết cộng dồn ở các thời điểm khác nhau giữa các nghiệm thức trong hai thí nghiệm.

3. KẾT QUẢ

3.1. Ảnh hưởng của thời gian và nhip cho ăn đến hiệu quả của vaccine

3.1.1. Yếu tố môi trường nước bể thí nghiệm và kết quả theo dõi các chỉ tiêu tăng trưởng

Các chỉ tiêu chất lượng nước cũng được theo dõi suốt trong quá trình bố trí thí nghiệm và cho thấy các chỉ tiêu về nhiệt độ (28,1–29,8°C), pH (6,37–7,17) và oxy hoà tan (4,7–6,2 mg/L) đều nằm trong ngưỡng cho phép. Tuy nhiên, hai chỉ tiêu về

NH₃/NH₄⁺ (0,5–2,0 mg/L) và NO₂⁻ (2,0–5,0 mg/L) được ghi nhận ở mức trung bình và không ảnh hưởng lớn đến các nghiệm thức do không ghi nhận được cá bệnh liên quan đến hai chỉ tiêu này.

Bên cạnh đó, để đánh giá độ an toàn của vaccine hoặc đánh giá về tác dụng phụ của vaccine đối với động vật thủy sản, các chỉ tiêu về tăng trưởng cũng được theo dõi. Trong đó, lượng thức ăn vaccine và thức ăn thông thường được theo dõi mỗi ngày, các chỉ tiêu về trọng lượng và tỉ lệ sống sau thí nghiệm được ghi nhận ở Bảng 1 và Bảng 2. Kết quả theo dõi tại Bảng 1 cho thấy cá ở nghiệm thức VC3 sử dụng lượng thức ăn nhiều nhất, bao gồm cả thức ăn

vaccine và thức ăn thông thường sau đó. Nghiệm thức được bổ sung thức ăn chứa vaccine dài hơn bao gồm VC6, VC9, VC3/3, VC3/3/3 và ĐC đều cho thấy cá ăn chậm và ít hơn. Tuy nhiên, ngược lại các chỉ tiêu về tăng trưởng bao gồm WG (g), DWG (g/ngày), SRG (%/ngày) cho thấy cá nuôi ở nghiệm thức ĐC cho kết quả về mặt tăng trưởng tốt nhất, nhưng khác nhau không có ý nghĩa thống kê khi so sánh với các nghiệm thức còn lại. Tăng trưởng thấp nhất được ghi nhận ở 2 nghiệm thức cho ăn vaccine liên tục là V6 và V9. Tỉ lệ sống giữa các nghiệm thức không có sự chênh lệch lớn và khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p<0,05).

Bảng 1. Tỉ lệ sống, lượng thức ăn và các chỉ tiêu tăng trưởng của cá thí nghiệm

Nghiệm thức	Chỉ tiêu				
	Tỉ lệ sống (%)	Thức ăn (g)	WG (g)	DWG (g/ngày)	SGR (%/ngày)
V3	96±5,66 ^a	822±6,07^b	9,1±0 ^a	0,41±0 ^a	1,71±0,02 ^a
V6	88±17,0 ^a	711±52,1 ^a	7,46±1,43^a	0,34±0,06^a	1,44±0,21^a
V9	88±11,3 ^a	710±36,6 ^a	6,64±0,48^a	0,3±0,02^a	1,33±0,09^a
V3/3	94±2,83 ^a	667±16,0 ^a	7,53±1,57 ^a	0,34±0,07 ^a	1,47±0,28 ^a
V3/3/3	100±0 ^a	714±39,4 ^a	8,03±1,79 ^a	0,36±0,08 ^a	1,56±0,3 ^a
ĐC	94±8,49 ^a	670±8,13 ^a	10,5±3,49^a	0,48±0,16^a	1,93±0,52^a

Ghi chú: Các số liệu trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p>0,05).

Thức ăn vaccine khi được bổ sung vào khẩu phần ăn cho cá tra được theo dõi và ghi nhận hằng ngày. Bảng 2 cho thấy tỉ lệ KN và nồng độ luôn được kiểm soát khi phối trộn vào thức ăn. Các nghiệm thức cho ăn vaccine 3 ngày (V3), 6 ngày (V6, V3/3) và 9 ngày (V9, V3/3/3) đều đạt tổng lượng KN đối với mỗi đơn vị vật nuôi đều cao hơn $\times 10^9$ CFU/cá, nghiệm thức V3 nhận tổng lượng KN thấp nhất với $1,01\pm 0,001 \times 10^9$ CFU/cá, hai nghiệm thức cho ăn 9 ngày V9 và V3/3/3 đạt tổng lượng KN cao nhất lần

lượt là $2,51\pm 0,06 \times 10^9$ CFU/cá và $2,26\pm 0,19 \times 10^9$ CFU/cá. Tuy nhiên, lượng KN cá hấp thụ mỗi ngày cho kết quả cao nhất ở V3, V6, V9 là các nghiệm thức cho ăn vaccine liên tục không ngắt quãng, giá trị lần lượt là $0,118\pm 0,0001 \times 10^8$ CFU/g cá/ngày, $0,109\pm 0,002 \times 10^8$ CFU/g cá/ngày và $0,108\pm 0,004 \times 10^8$ CFU/g cá/ngày. Các nghiệm thức V3/3 và V3/3/3 cho ăn vaccine theo nhịp ngắt quãng cho giá trị thấp hơn lần lượt là $0,087\pm 0,002 \times 10^8$ CFU/g cá/ngày và $0,092\pm 0,002 \times 10^8$ CFU/g cá/ngày.

Bảng 2. Lượng thức ăn vaccine mỗi nghiệm thức

Nghiệm thức	Thức ăn vaccine (g)	Tổng lượng KN ($\times 10^9$ CFU/cá)	Trung bình ($\times 10^8$ CFU/g cá/ngày)
V3	134±2,91	1,01±0,001	0,118±0,0001
V6	224±2,70	1,76±0,13	0,109±0,002
V9	321±19,00	2,51±0,06	0,108±0,004
V3/3	185±3,45	1,40±0,06	0,087±0,002
V3/3/3	308±18,32	2,26±0,19	0,092±0,002
ĐC	0	0	0

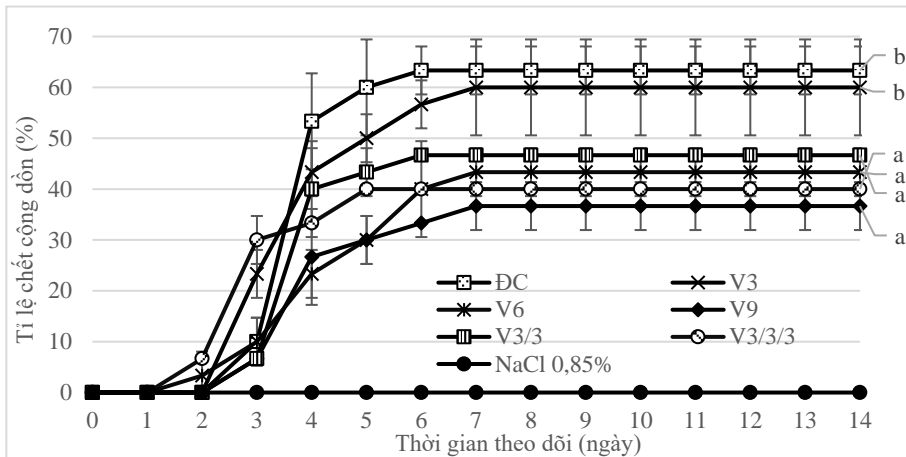
3.1.2. So sánh khả năng đáp ứng miễn dịch và tỷ lệ bảo hộ RPS (%) giữa các nghiệm thức

Thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* EI37 nhằm đánh giá hệ số bảo hộ của vaccine cho ăn giữa các nghiệm thức được thực hiện sau 7 ngày tính từ ngày cuối cùng các nghiệm thức được bổ

sung vaccine cho ăn (ngày 21 bố trí thí nghiệm). Kết quả cho thấy hiệu quả bảo hộ ở các nghiệm thức bố trí có sự khác biệt rõ rệt (Hình 3). Các nghiệm thức cảm nhiễm tỉ lệ chết được ghi nhận sớm nhất vào ngày thứ 2 sau cảm nhiễm và đạt đỉnh sau 6 ngày. Nghiệm thức ĐC cho thấy tỉ lệ chết cao nhất với $63,3\pm 4,71\%$, tiếp theo là nghiệm thức V3 $60\pm 9,43\%$. Nghiệm thức V9 và V3/3/3 cho tỉ lệ chết

thấp nhất với giá trị ghi nhận lần lượt là 36, 7±4,71% và 40±0%. Qua đó hệ số RPS (%) được xác định và

cho kết quả cao nhất ở nghiệm thức V9 là 42±7,07% (Bảng 3).



Hình 3. Kết quả cảm nhiễm *E. ictaluri* ở các nghiệm thức cho ăn vaccine giữa các nghiệm thức

Bảng 3. Hệ số bảo hộ (RPS; %) các nghiệm thức

Nghiệm thức	Tỉ lệ chết (%)	Hệ số RPS (%)
V3	60±9,43 ^b	5
V6	43,3±4,71 ^a	31,5
V9	36,7±4,71 ^a	42
V3/3	46,7±0 ^a	26
V3/3/3	40±0 ^a	37
ĐC	63,3±4,71 ^b	-

Ghi chú: Các số liệu trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Bảng 4. Mức kháng thể các nghiệm thức qua 2 đợt thu mẫu

Nghiệm thức	Ngày thu mẫu	
	ngày 0	Ngày 21
V3	5±0,71 ^a	4,75±1,06 ^a
V6	5±0,71 ^a	5,25±0,35 ^a
V9	5±0,71 ^a	5±0 ^a
V3/3	5±0,71 ^a	5,5±0,71 ^a
V3/3/3	5±0,71 ^a	5,75±1,06 ^a
ĐC	5±0,71 ^a	5±0 ^a

Ghi chú: Các số liệu trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Kết quả phân tích hiệu giá kháng thể thông qua phương pháp ngưng kết miễn dịch cho thấy các nghiệm thức được bổ sung vaccine cho ăn không có sự thay đổi lớn sau 21 ngày thí nghiệm (Bảng 4). Tuy nhiên, hiệu giá kháng thể ở nghiệm thức V3/3 và V3/3/3 có tăng nhẹ nhưng khác nhau không có ý nghĩa thống kê khi so với các nghiệm thức khác ($p>0,05$). Có thể thấy hệ số bảo hộ của vaccine cho

ăn tại nghiệm thức cho ăn liên tục 9 ngày là tốt nhất. Các kết quả trên nghiệm thức V9 được lựa chọn để thực hiện cho thí nghiệm 2.

3.2. Ảnh hưởng của các chất bổ trợ đến vaccine cho ăn ở cá tra (*P. hypophthalmus*)

3.2.1. Yếu tố môi trường nước thí nghiệm và kết quả theo dõi các chỉ tiêu tăng trưởng

Tương tự, thí nghiệm đánh giá hiệu quả hỗ trợ của β -glucan và Vitamin C trong vaccine cho ăn trên cá tra cũng được theo dõi các chỉ tiêu về chất lượng nước trong khi bố trí thí nghiệm. Kết quả cho thấy các chỉ tiêu chất lượng nước đều nằm trong mức phù hợp, nhiệt độ dao động trong khoảng 28 – 29°C, pH duy trì trên 7,0, oxy hoà tan (DO) duy trì ở mức từ 5,0 mg/L, hai chỉ tiêu về khí độc NH₃ và NO₂ cũng được giữ ở mức thấp.

Bảng 5 cho thấy tỉ lệ sống của cá cao ở các nghiệm thức của thí nghiệm cho ăn vaccine chứa chất bổ trợ β -glucan và Vitamin C. Nghiệm thức đối chứng cho tỉ lệ sống thấp nhất ở mức 96±2,83%. Đối với các chỉ tiêu về tăng trưởng, có thể thấy ở ba nghiệm thức VC-B2%, ĐC-B2% và ĐC cho kết quả tăng trưởng tốt nhất. Chỉ tiêu WG cao nhất ở nghiệm thức ĐC (9,41±0,39 g), tương tự ở hai chỉ tiêu DWG và SGR cũng ghi nhận cao ở nghiệm thức ĐC với giá trị lần lượt là 0,59±0,02 g/ngày và 1,57±0,56 %/ngày. Các nghiệm thức ĐC-B2% và VC-B2% cũng ghi nhận khả năng tăng trưởng ở mức cao so với các nghiệm thức còn lại, nhưng nhìn chung giữa các nghiệm thức khi phân tích khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Bảng 5. Tỷ lệ sống, lượng thức ăn và tăng trọng của cá

Nghiệm thức	Chỉ tiêu				
	Tỷ lệ sống (%)	Thức ăn (g)	WG (g)	DWG (g/ngày)	SGR (%/ngày)
VC-V500	100±0,00 ^b	526±6,14^b	5,01±0,15 ^{ab}	0,31±0,01 ^{ab}	0,92±0,01 ^{ab}
VC-V1000	100±0,00 ^b	506±13,87 ^{ab}	6,05±1,06 ^{ab}	0,38±0,07 ^{ab}	1,07±0,17 ^{ab}
ĐC-V1000	100±0,00 ^b	509±19,42 ^{ab}	3,15±1,36 ^a	0,20±0,08 ^a	0,60±0,23 ^a
VC-B1%	98±2,83 ^{ab}	474±13,51 ^a	7,40±1,19 ^{ab}	0,46±0,07 ^{ab}	1,26±0,14 ^b
VC-B2%	99±1,41 ^{ab}	484±17,27 ^a	7,84±0,80^b	0,49±0,05^b	1,35±0,11^b
ĐC-B2%	100±0,00 ^b	478±21,08 ^a	8,15±4,44^b	0,51±0,28^b	1,31±0,66^b
ĐC	96±2,83 ^a	494±22,75 ^{ab}	9,41±0,39^b	0,59±0,02^b	1,57±0,56^b
ĐC-VC	99±1,41 ^{ab}	485±6,04 ^a	7,28±0,02 ^{ab}	0,46±0,00 ^{ab}	1,24±0,02 ^{ab}

Ghi chú: Các số liệu trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 6 cho thấy giữa các nghiệm thức có sự kiểm soát tốt về lượng thức ăn vaccine ban đầu. Tổng lượng KN trong mỗi nghiệm thức bổ sung vaccine không có sự chênh lệch lớn dao động trong khoảng 2×10^9 CFU/cá và các nghiệm thức này cũng

tương đương với tổng lượng KN của thí nghiệm 1 khi bổ sung KN vào thức ăn trong 9 ngày. Trung bình lượng KN cho vào khẩu phần ăn mỗi ngày ở các nghiệm thức cũng tương tự thí nghiệm 1 với mật độ tương ứng $0,1 \times 10^8$ CFU/g cá/ngày.

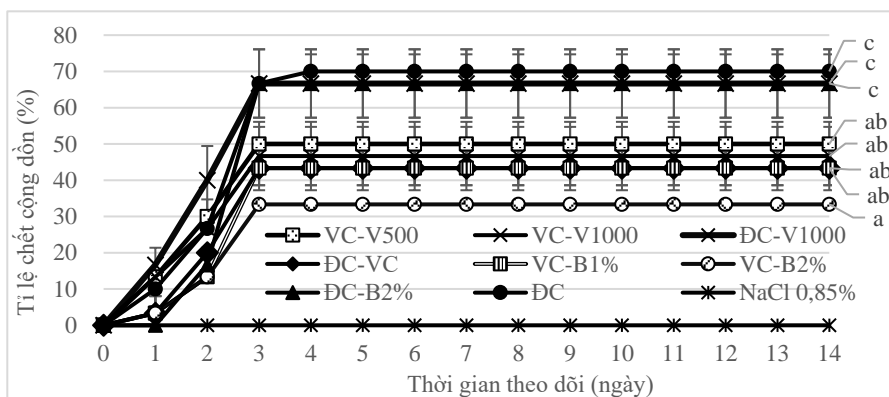
Bảng 6. Lượng thức ăn vaccine mỗi nghiệm thức

Nghiệm thức	Thức ăn vaccine (g)	Tổng lượng KN ($\times 10^9$ CFU/cá)	Trung bình ($\times 10^8$ CFU/g cá/ngày)
VC-V500	277±15,7	2,04±0,12	0,11±0,01
VC-V1000	275±2,08	2,02±0,02	0,11±0,01
ĐC-V1000	0	0	0
VC-B1%	271±3,68	2,03±0,09	0,1±0,01
VC-B2%	253±3,12	1,88±0,05	0,09±0,01
ĐC-B2%	0	0	0
ĐC	0	0	0
ĐC-VC	254±8,57	1,89±0,04	0,09±0

3.2.2. Hiệu quả của các chất bổ trợ khi bổ sung trong vaccine cho ăn trên cá thí nghiệm

Hiệu quả của vaccine cho ăn chứa β -glucan và Vitamin C cũng được đánh giá thông qua giá trị RPS (%). Phương pháp cảm nhiễm bằng cách tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* EI37 được áp dụng đối với từng nghiệm thức bổ trí. Kết quả cho thấy sự khác biệt giữa các nghiệm thức đối chứng khi so sánh với các

nghiệm thức có bổ sung vaccine cho ăn còn lại. Hình 4 và Bảng 7 cho thấy nghiệm thức đối chứng ĐC, ĐC-B2%, ĐC-V1000 cho tỷ lệ chết cao nhất với giá trị lần lượt là 70±4,24%, 66,5±9,19% và 66,5±9,1%. Các nghiệm thức có bổ sung vaccine cho ăn tỷ lệ chết thấp hơn, nhưng kết quả tốt nhất thuộc về nghiệm thức VC-B2%. Thông qua kết quả đó, hệ số bảo hộ RPS (%) cũng được ghi nhận cao nhất ở nghiệm thức VC-B2% với giá trị là 52,4±0%.



Hình 4. Tỷ lệ chết tích lũy (%) giữa các nghiệm thức

Bảng 7. Hệ số bảo hộ (RPS, %) các nghiệm thức

Nghiệm thức	Tỉ lệ chết (%)	Hệ số RPS (%)
VC-V500	50±4,24 ^b	28,6
VC-V1000	46,5±9,19 ^{ab}	33,3
ĐC-V1000	66,5±9,19 ^c	4,75
VC-B1%	43,5±4,95 ^{ab}	38,1
VC-B2%	33±0^a	52,4
ĐC-B2%	66,5±9,19 ^c	4,75
ĐC	70±4,24 ^c	-
ĐC-VC	43,5±4,95 ^{ab}	38,1

Ghi chú: Các số liệu trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Ngoài ra, kết quả phân tích mức kháng thể ở nghiệm thức VC-B2% cũng cho kết quả cao hơn các nghiệm thức còn lại và ghi nhận ở mức 6,25±1,77. Tuy nhiên, khi so sánh với các nghiệm thức còn lại thì sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Qua đó có thể thấy hiệu quả của β-glucan khi được sử dụng ở liều 2% vào KN sẽ giúp tăng cường khả năng đáp ứng miễn dịch của vaccine dạng cho ăn đối với cá tra (*P. hypophthalmus*).

Bảng 10. Mức kháng thể các nghiệm thức qua 2 đợt thu mẫu

Nghiệm thức	Ngày thu mẫu	
	ngày 0	ngày 15
VC-V500	5,5±0 ^a	4,75±0,35 ^a
VC-V1000	5,5±0 ^a	4,5±0,71 ^a
ĐC-V1000	5,5±0 ^a	5,5±0 ^a
VC-B1%	5,5±0 ^a	5,75±0,35 ^a
VC-B2%	5,5±0 ^a	6,25±1,77^a
ĐC-B2%	5,5±0 ^a	4,75±0,35 ^a
ĐC	5,5±0 ^a	5,5±0,71 ^a
ĐC-VC	5,5±0 ^a	5,25±0,35 ^a

Ghi chú: Các số liệu trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

4. THẢO LUẬN

Khi theo dõi tổng lượng thức ăn chứa vaccine và tổng lượng KN đưa vào mỗi nghiệm thức cho thấy ở hai nghiệm thức được bổ sung vaccine liên tục (V6 và V9) cho khả năng sử dụng thức ăn vaccine tốt hơn hai nghiệm thức cho ăn theo nhịp (V3/3 và V3/3/3). Việc thay đổi liên tục giữa hai loại thức ăn thông thường và thức ăn chứa vaccine, cũng là một nguyên nhân cho thấy ở hai nghiệm thức cho ăn theo nhịp sử dụng thức ăn chứa vaccine kém hơn. Điều này có thể ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả của vaccine cho ăn do tổng lượng KN cho mỗi đơn vị sử dụng và trung bình lượng KN trên mỗi đơn vị khối lượng vật nuôi sử dụng bị giảm xuống. Kết quả này

giải thích cá ở nghiệm thức V6 và V9 ảnh hưởng bởi tác dụng phụ (giảm tăng trưởng) của vaccine cho ăn cao hơn do lượng thức ăn chứa vaccine được sử dụng nhiều hơn.

Đa số các nhóm vaccine trong động vật thủy sản đều có tác dụng phụ ngắn hạn như cá chậm lớn hay bỏ ăn trong thời gian ngắn và vấn đề này vẫn cần phải được chú ý khắc phục khi phát triển vaccine (Midtlyng et al., 1996; Midtlyng & Lillehaug, 1998). Tương tự, nghiên cứu cho thấy vaccine cho ăn có hiệu quả nhất định trong việc bảo vệ cá tra kháng lại bệnh gan thận mù do vi khuẩn *E. ictaluri* gây ra. Tuy nhiên, loại vaccine này cũng có một vài hạn chế cần khắc phục trong những nghiên cứu tiếp theo. Điển hình là khi quan sát các chỉ tiêu về tốc độ tăng trưởng, có thể dễ dàng nhận thấy khi thời gian cho ăn vaccine càng kéo dài sẽ càng ảnh hưởng đến sự phát triển tạm thời của cá. Hai nghiệm thức bổ sung vaccine cho ăn liên tục trong 6 và 9 ngày là V6 và V9 cho kết quả tăng trưởng thấp nhất. Mặc dù, việc chia nhỏ khẩu phần bổ sung vaccine ra cho ăn gián đoạn hay theo nhịp như ở nghiệm thức V3/3 hay V3/3/3 làm cho tác dụng phụ của loại vaccine này giảm đi nhưng kết quả vẫn không khác biệt rõ ràng và cá vẫn không thể tăng trưởng nhanh như nghiệm thức ĐC.

Nhiều nghiên cứu đã phối hợp vaccine và các chất bổ trợ hữu cơ, vừa có vai trò là chất kích thích miễn dịch, đồng thời hỗ trợ khả năng phát triển của cá bằng nhiều phương thức khác nhau nhằm làm giảm bớt tác dụng phụ không mong muốn của vaccine khi đưa vào cơ thể vật nuôi. β-glucan và Vitamin C được lựa chọn cho mục tiêu này. Ngoài ra, các chất này dễ dàng phối hợp với thức ăn cho cá và nó cũng có thể được sử dụng như một chất có cơ chế bảo vệ KN dưới tác động của môi trường pH thấp trong ống tiêu hoá của cá (Tafalla et al., 2014). Nhưng kết quả cho thấy chỉ có β-glucan có hiệu quả tốt trong việc làm giảm tác dụng phụ chậm tăng trưởng tạm thời của vaccine cho ăn trên cá tra. Có thể thấy trong thí nghiệm 2, β-glucan được phối trộn ở liều 2% (khối lượng/thể tích KN) đã giúp nghiệm thức VC-B2% tăng trưởng cao hơn so với nghiệm thức ĐC-VC, nhưng vẫn thấp hơn nghiệm thức ĐC không sử dụng vaccine. Bên cạnh đó, khi so sánh hiệu số tăng trưởng giữa 2 cặp nghiệm thức ĐC/V9 và VC-B2%, sự chênh lệch có sự thu hẹp khi giá trị DWG giảm từ khoảng 0,2 g/ngày xuống còn 0,1 g/ngày và giá trị SGR theo đó giảm từ 0,6 %/ngày xuống còn khoảng 0,2 %/ngày. Kết quả này tương đồng với Midtlyng and Lillehaug (1998) khi nghiệm thức vaccine chứa β-glucan giúp cá tăng trưởng tốt hơn so với các nghiệm thức sử dụng dầu làm chất bổ

trợ, tuy nhiên vẫn thấp hơn so với đối chứng không sử dụng vaccine.

Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy việc sử dụng vaccine cho ăn đơn thuần thường cho giá trị bảo hộ thấp (Ashida et al., 1999; Jaafar et al., 2019; Kamilya et al., 2006; Thinh et al., 2009). Nghiên cứu của Jaafar et al. (2019) cũng cho thấy khi cá hồi được sử dụng vaccine AquaVac® ERM oral theo nhịp cho ăn cách quãng 5 ngày cũng không làm tăng khả năng bảo hộ. Tác giả cũng đặt giả thuyết về cảm ứng dung nạp miễn dịch khi sử dụng vaccine cho ăn nhiều lần, trong trường hợp cá không được sử dụng vaccine tiêm trước đó (Jaafar et al., 2019). Dung nạp miễn dịch (induction tolerance) trên cá đã từng được đề cập trong nhiều nghiên cứu (Dubois et al., 2005; Joosten et al., 1997), việc phơi nhiễm với kháng nguyên lặp lại theo một chu kỳ nhất định ở mật độ thấp có thể làm cho hệ miễn dịch mất khả năng đáp ứng với mầm bệnh khi bị lây nhiễm, vì lúc này hệ miễn dịch sẽ xem mầm bệnh như một vi sinh vật vô hại có sẵn trong hệ tiêu hoá. Do đó, vaccine dạng cho ăn nên được sử dụng như một liều tăng cường sau mũi tiêm đầu (Jaafar et al., 2019; Thinh et al., 2009). Thí nghiệm cảm nhiễm đánh giá hiệu quả của vaccine cho ăn ở các nghiệm thức thông qua hệ số RPS(%) cho thấy nghiệm thức cho ăn liên tục V9 đạt hệ số bảo hộ cao nhất là 42%, kế đến là nghiệm thức cho ăn theo nhịp V3/3/3 là 37%.

Kết quả hiệu giá kháng thể có trong huyết thanh cá được phân tích trong 2 thí nghiệm đều cho thấy ít có sự biến động lớn về chỉ tiêu này. Mức kháng thể ở tất cả nghiệm thức của 2 thí nghiệm đều ghi nhận được ở mức thấp và dao động trong khoảng 5-5,5 sau 15 ngày theo dõi. Riêng nghiệm thức VC-B2% ghi nhận ở mức $6,25 \pm 1,77$ cao hơn so với trung bình các nghiệm thức. Nhìn chung, kháng thể của cá khi được sử dụng vaccine cho ăn thông thường không tăng lên quá cao trong huyết thanh, do đáp ứng miễn dịch thường xảy ra ở tại ruột tạo ra các kháng thể IgT, đáp ứng miễn dịch hệ thống tạo ra kháng thể IgM thường được diễn ra sau đó (Mutoloki et al., 2015). Một vài nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, các kháng thể IgM tự do trong thể dịch thường có xu hướng giảm khi cá ngưng bổ sung vaccine (Siriappagounder et al., 2014; Yao et al., 2019), tăng mạnh khi cá phơi nhiễm với mầm bệnh đó trở lại (Kahieshesfandiari et al., 2019).

Trong thí nghiệm sử dụng β -glucan và Vitamin C làm chất bổ trợ hữu cơ, hệ số bảo hộ cao nhất ghi nhận tại nghiệm thức vaccine chứa 2% β -glucan (VC-B2%) với giá trị bảo hộ đạt được là 52%, cao

hơn khi so sánh với nghiệm thức sử dụng vaccine cho ăn đơn thuần trong cùng thí nghiệm là 38,1%. Tương tự, mức kháng thể đặc hiệu của cá tra đối với vi khuẩn *E. ictaluri* khi được bổ sung vaccine dạng cho ăn ghi nhận trong cả hai thí nghiệm đều cho kết quả thấp và ít có sự chênh lệch giữa các nghiệm thức, riêng mức kháng thể ở nghiệm thức VC-B2% có sự gia tăng. Qua đó có thể thấy hiệu quả tăng cường miễn dịch của β -glucan khi sử dụng ở mức 2%. Tác dụng kích thích miễn dịch và tác dụng bổ trợ của β -glucan đã được báo cáo trong nhiều nghiên cứu trước đây (Ashida et al., 1999; Figueras et al., 1998; Kamilya et al., 2006; Midtlyng et al., 1996; Petit & Wiegertjes, 2016; Samuel et al., 1996; Selvaraj et al., 2005, 2006; Skov et al., 2012). Nghiên cứu trên cá chép (*Labeo catla*) tại Ấn Độ đã cho thấy vaccine bất hoạt dạng tiêm phòng *A. hydrophila* có bổ sung β -glucan cho hiệu quả cao với hệ số bảo hộ là 67,7% khi so với 58% ở nghiệm thức tiêm vaccine đơn thuần (Kamilya et al., 2006). Với vaccine tiêm có thể sử dụng β -glucan nhằm hỗ trợ đáp ứng miễn dịch bằng phương pháp tiêm trước hoặc đồng thời, riêng vaccine cho ăn chỉ có thể áp dụng cùng lúc để đạt hiệu quả cao nhất (Selvaraj et al., 2005, 2006). Trong một nghiên cứu của Ashida et al. (1999) sử dụng β -glucan, *Quillaja saponin* và vaccine cho ăn trên cá bơn (*Paralichthys olivaceus*) nhằm phòng bệnh bởi *Edwardsiella tarda* đã cho hệ số bảo hộ đạt 43%, trong khi nghiệm thức cho ăn β -glucan đơn đạt 17%. Đặc biệt, β -glucan còn giúp tăng khả năng đáp ứng miễn dịch của vaccine bằng cách kích thích hoạt động của đại thực bào (Figueras et al., 1998; Samuel et al., 1996), kích thích các gen sinh miễn dịch và làm tăng hoạt tính lysozyme (Skov et al., 2012).

5. KẾT LUẬN

Sử dụng vaccine cho ăn kéo dài và liên tục trong 9 ngày sẽ giúp cá tra đạt được khả năng bảo hộ cao hơn so với cho ăn theo nhịp, nhưng sẽ làm cho cá bị giảm khả năng tăng trưởng. Hoạt chất β -glucan có thể được sử dụng như một chất bổ trợ hữu cơ phối hợp với vaccine nhằm tăng cường hiệu quả, khả năng đáp ứng miễn dịch, hệ số bảo hộ chống lại vi khuẩn *E. ictaluri* và làm giảm tác dụng phụ của vaccine.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ kinh phí bởi Trường Đại học Cần Thơ, mã số: T2022-118 và công ty Proconco Cần Thơ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amend, D. F. (1981). Potency testing of fish vaccines. *Dev Biol Stand.* 49:447–454.
- Akinbowale, O. L., Peng, H., & Barton, M. D. (2006). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 100(5), 1103–1113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02812.x>
- Ashida, T., Okimasu, E., Ui, M., Heguri, M., Oyama, Y., & Amemura, A. (1999). Protection of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* against experimental edwardsiellosis by formalin-killed *Edwardsiella tarda* in combination with oral administration of immunostimulants. *Fisheries Science*, 65(4), 527–530. <https://doi.org/10.2331/fishsci.65.527>
- Ballesteros, N. A., Saint-Jean, S. R., & Perez-Prieto, S. I. (2014). Food pellets as an effective delivery method for a DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Fish & Shellfish Immunology*, 37(2), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.02.003>
- Brudeseth, B. E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B. N., Lindmo, K., Løkling, K.-E., Bordevik, M., Steine, N., Klevan, A., & Gravningen, K. (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1759–1768. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.029>
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V. N., Hoseinifar, S. H., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Salgado-Miranda, C., & Joshi, S. K. (2017). Advances in aquaculture vaccines against fish pathogens: global status and current trends. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 25(3), 184–217. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1261277>
- Dubois, B., Goubier, A., Joubert, G., & Kaiserlian, D. (2005). Oral tolerance and regulation of mucosal immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 62(12), 1322–1332. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5036-0>
- Dung, T. T., Haesebrouck, F., Tuan, N. A., Sorgeloos, P., Baele, M., & Decostere, A. (2008). Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictaluri* Isolates from natural outbreaks of bacillary necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam. *Microbial Drug Resistance*, 14(4), 311–316. <https://doi.org/10.1089/mdr.2008.0848>
- Figueras, A., Santarém, M. M., & Novoa, B. (1998). Influence of the sequence of administration of β -glucans and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 64(1), 59–68. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(98\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(98)00114-7)
- Jaafar, R. M., Al-Jubury, A., Dalsgaard, I., MohammadKarami, A., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2019). Effect of oral booster vaccination of rainbow trout against *Yersinia ruckeri* depends on type of primary immunization. *Fish & Shellfish Immunology*, 85, 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.049>
- Joosten, P. H. M., Engelsma, M. Y., Van der Zee, M. D., & Rombout, J. (1997). Induction of oral tolerance in carp (*Cyprinus carpio* L.) after feeding protein antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 60(1–2), 187–196. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(97\)00124-4](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(97)00124-4)
- Kahieshesfandiari, M., Sabri, M. Y., Ina-Salwany, M. Y., Hassan, M. D., Noraini, O., Ajadi, A. A., & Isiaku, A. I. (2019). *Streptococcosis* in *Oreochromis* sp.: is feed-based biofilm vaccine of *Streptococcus agalactiae* effective? *Aquaculture International*, 27(3), 817–832. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00372-8>
- Kamilya, D., Maiti, T. K., Joardar, S. N., & Mal, B. C. (2006). Adjuvant effect of mushroom glucan and bovine lactoferrin upon *Aeromonas hydrophila* vaccination in catla, *Catla catla* (Hamilton). *Journal of Fish Diseases*, 29(6), 331–337. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00722.x>
- Khôi, L. M., Dung, T. T., Hằng, B. T. B., Seng, E. K., Hian, S. K., Hoa, T. T. T., & Thy, Đ. T. M. (2021). Đánh giá hiệu quả miễn dịch của vaccine phòng bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp Chí Khoa Học Trường Đại Học Cần Thơ*, 57(3), 181–190. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2021.100>
- Kole, S., Qadiri, S. S. N., Shin, S.-M., Kim, W.-S., Lee, J., & Jung, S.-J. (2019). PLGA encapsulated inactivated-viral vaccine: formulation and evaluation of its protective efficacy against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) infection in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) vaccinated by mucosal delivery routes. *Vaccine*, 37(7), 973–983. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.063>
- Komar, C., Enright, W. J., Grisez, L., & Tan, Z. (2004). Understanding fish vaccination. *Aqua Culture Asia Pacific Magazine*, 27–29.

- Le, T. C., & Cheong, F. (2010). Perceptions of risk and risk management in Vietnamese catfish farming: an empirical study. *Aquaculture Economics & Management*, 14(4), 282–314. <https://doi.org/10.1080/13657305.2010.526019>
- Midtlyng, P. J., & Lillehaug, A. (1998). Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. *Diseases of Aquatic Organisms*, 32(2), 91–97. <https://doi.org/10.3354/dao032091>
- Midtlyng, P. J., Reitan, L. J., & Speilberg, L. (1996). Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 6(5), 335–350. <https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0034>
- Mutoloki, S., Munang'andu, H. M., & Evensen, Ø. (2015). Oral vaccination of fish—antigen preparations, uptake, and immune induction. *Frontiers in Immunology*, 6, 519. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00519>
- Petit, J., & Wiegertjes, G. F. (2016). Long-lived effects of administering β -glucans: Indications for trained immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.003>
- Plant, K. P., & LaPatra, S. E. (2011). Advances in fish vaccine delivery. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1256–1262. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.007>
- Roberson, B.S. (1990). Bacterial agglutination. In Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. & van Muiswinkel, W.B. (Eds.), *Techniques in fish immunology* (pp. 81-86). SOS Publications, New Haven, NJ.
- Samuel, M., Lam, T. J., & Sin, Y. M. (1996). Effect of Laminaran [β (1, 3)-D-Glucan] on the protective immunity of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 6(6), 443–454. <https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0042>
- Santos, Y., Garcia-Marquez, S., Pereira, P. G., Pazos, F., Rianza, A., Silva, R., El Morabit, A., & Ubeira, F. M. (2005). Efficacy of furunculosis vaccines in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): evaluation of immersion, oral and injection delivery. *Journal of Fish Diseases*, 28(3), 165–172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00610.x>
- Selvaraj, V., Sampath, K., & Sekar, V. (2005). Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(4), 293–306. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.001>
- Selvaraj, V., Sampath, K., & Sekar, V. (2006). Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(1–2), 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.06.011>
- Skov, J., Kania, P. W., Holten-Andersen, L., Fouz, B., & Buchmann, K. (2012). Immunomodulatory effects of dietary β -1, 3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(1), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.04.009>
- Subasinghe, R. (1997). Fish health and quarantine. FAO Fisheries Circular, 45–49.
- Siriyappagouder, P., Shankar, K. M., Kumar, B. T. N., Patil, R., & Byadgi, O. V. (2014). Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Channa striatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 581–585. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.09.021>
- Tafalla, C., Bøgwald, J., Dalmo, R. A., Munang'andu, H. M., & Evensen, Ø. (2014). Adjuvants in fish vaccines. *Fish Vaccination*, 68–84. <https://doi.org/10.1002/9781118806913.ch7>
- Tổng cục Thủy sản, 2022. *Dịch bệnh Thủy sản tiếp tục được kiểm soát*. <https://tongcucthuysan.gov.vn/vi-vn/nuoi-trong-thuy-san/-phong-chong-dich-benh/doc-tin/017384/2022-05-20/dich-benh-thuy-san-tiep-tuc-duoc-kiem-soat>.
- Thi, Q. V. C., Dung, T. T., & Hiệp, Đ. P. H. (2014). Đa kháng thuốc của hai loài vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi. *Tạp Chí Khoa Học Đại Học Cần Thơ, Thủy sản*(2), 7–14.
- Thinh, N. H., Kuo, T. Y., Hung, L. T., Loc, T. H., Chen, S. C., Evensen, Ø., & Schuurman, H. J. (2009). Combined immersion and oral vaccination of Vietnamese catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) confers protection against mortality caused by *Edwardsiella ictaluri*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(6), 773–776. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.08.012>
- Yao, Y.-Y., Chen, D.-D., Cui, Z.-W., Zhang, X.-Y., Zhou, Y.-Y., Guo, X., Li, A.-H., & Zhang, Y.-A. (2019). Oral vaccination of tilapia against *Streptococcus agalactiae* using *Bacillus subtilis* spores expressing Sip. *Fish & Shellfish Immunology*, 86, 999–1008. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.060>