



DOI:10.22144/ctujs.2025.091

HIỆU QUẢ PHỐI HỢP PHƯƠNG PHÁP TIÊM VÀ CHO ĂN VẮC XIN TRONG PHÒNG BỆNH GAN THẬN MŨ (*Edwardsiella ictaluri*) TRÊN CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Nguyễn Bảo Trung^{1*}, Lê Ngọc Thế Vinh², Tô Vũ Thiện Tâm³, Lê Minh Khôi¹ và Từ Thanh Dung¹

¹Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

²Sinh viên ngành Bệnh học Thủy sản, Khoa 44, Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

³Sinh viên ngành Ngành Nuôi trồng thủy sản - Chương trình tiên tiến, Khoa 45, Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): nbtrung@ctu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 08/11/2024

Sửa bài (Revised): 18/12/2024

Duyệt đăng (Accepted): 21/03/2025

Title: Efficacy of combined injection and oral vaccination for preventing bacillary necrosis (*Edwardsiella ictaluri*) in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Author(s): Nguyen Bao Trung^{1*}, Le Ngọc Thế Vinh², To Vu Thien Tam³, Le Minh Khôi¹ and Tu Thanh Dung¹

Affiliation(s): ¹ College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University, Viet Nam; ² Students of Aquatic Pathology, Course 44, College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University, Viet Nam; ³ Students of Aquaculture - Advanced Program, Course 45, College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University, Viet Nam

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu, việc đánh giá hiệu quả khi phối hợp tiêm và cho ăn vắc xin phòng bệnh gan thận mủ (*Edwardsiella ictaluri*) trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) thông qua các chỉ tiêu tăng trưởng, khả năng bảo hộ (RPS%) và biểu hiện gen miễn dịch đã được thực hiện. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên: (NT1) tiêm vắc xin ở ngày đầu và cho ăn vắc xin ngày thứ 30, (NT2) tiêm vắc xin ở ngày đầu và không cho ăn vắc xin ngày thứ 30, (NT3) không tiêm vắc xin ngày đầu và cho ăn vắc xin ngày thứ 30, và (NT4 - đối chứng) không tiêm vắc xin vào ngày đầu và không cho ăn vắc xin vào ngày thứ 30. Sau 50 ngày, tất cả các nghiệm thức được gây cảm nhiễm với *E. ictaluri* để đánh giá khả năng bảo hộ của vắc xin. Kết quả cảm nhiễm cho thấy hệ số RPS cao nhất được ghi nhận ở nghiệm thức NT1 (61,9%), tiếp theo là NT2 và NT3 lần lượt là 47,6% và 33,3%. Ngoài ra, sự tăng biểu hiện gen miễn dịch sau khi tiêm hoặc cho ăn vắc xin cho thấy sự kích hoạt hệ miễn dịch cả thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu cho thấy sự phối hợp tiêm và cho ăn vắc xin không chỉ nâng cao hiệu quả bảo hộ mà còn là một giải pháp tiềm năng để tăng cường sức đề kháng cho cá tra.

Từ khóa: Cá tra, *Edwardsiella ictaluri*, gen miễn dịch, *Pangasianodon hypophthalmus*, vắc xin

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the efficacy of combined injection and oral vaccination against *Edwardsiella ictaluri* in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) based on growth performance, RPS%, and immune gene expression. The experiment followed a completely randomized design with four treatment groups: (NT1) injection on day 1 followed by oral vaccination on day 30, (NT2) injection on day 1 without further oral vaccination, (NT3) no injection on day 1 but with oral vaccination on day 30, and (NT4-Control) no injection or oral vaccination at any point. After 50 days, all groups were challenged with *E. ictaluri* to evaluate vaccine-induced protection. The challenged result showed that the highest RPS protection rate was NT1 (61.9%), followed by NT2 and NT3, with 47.6% and 33.3%, respectively. Furthermore, both injection and oral vaccination led to immune gene upregulation, indicating immune activation in the experimental fish. These results demonstrate that a combination of injection and oral vaccination enhances protective efficacy and is a promising strategy to boost disease resistance in the striped catfish.

Keywords: *Edwardsiella ictaluri*, immune gene, *Pangasianodon hypophthalmus*, striped catfish, vaccination

1. GIỚI THIỆU

Ngành nuôi trồng thủy sản (NTTS) là một trong những lĩnh vực sản xuất thực phẩm phát triển nhanh nhất trên toàn cầu, với tốc độ tăng trưởng bình quân đạt khoảng 8% mỗi năm trong suốt ba thập kỷ qua (FAO, 2022). Tại Việt Nam, theo Quyết định số 339/QĐ-TTg của Thủ tướng Chính phủ, chiến lược phát triển ngành thủy sản giai đoạn 2021- 2030, tầm nhìn đến năm 2045, đã xác định NTTS là một lĩnh vực sản xuất chủ lực, góp phần cung cấp nguồn nguyên liệu cho tiêu thụ nội địa và xuất khẩu. Mục tiêu đến năm 2030, sản lượng nuôi trồng thủy sản đạt 7 triệu tấn, tăng 153% so với năm 2020, với tốc độ tăng trưởng giá trị sản xuất trung bình đạt 3,0 - 4,0%/năm. Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là một trong những đối tượng nuôi quan trọng của Việt Nam, đặc biệt ở đồng bằng sông Cửu Long, với sản lượng 1,56 triệu tấn và giá trị xuất khẩu đạt 2,26 tỷ USD trong năm 2020. Tuy nhiên, ngành nuôi cá tra đang đối mặt với nhiều thách thức lớn, bao gồm: sự biến động nhu cầu thị trường quốc tế, giá cả thị trường bấp bênh, môi trường ô nhiễm, chất lượng giống suy giảm, cùng với việc thâm canh hóa với mật độ cao dẫn đến dịch bệnh trên cá tra xảy ra thường xuyên hơn và gây thiệt hại lớn cho người nuôi (Dung et al., 2008). Vi khuẩn, nấm và ký sinh trùng được xác định là ba tác nhân gây bệnh truyền nhiễm chính trên cá tra nuôi thâm canh ở đồng bằng sông Cửu Long (Crumlish et al., 2002; Dung et al., 2008; Hang & Oanh, 2012). Trong đó, các bệnh do vi khuẩn, bao gồm bệnh gan thận mù do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây ra, đã gây thiệt hại nghiêm trọng nhất cho ngành nuôi cá tra (Crumlish et al., 2002; Dung et al., 2008; Ly et al., 2009). Bệnh này còn được gọi là bệnh đốm trắng nội tạng hoặc bệnh hoại tử do trực khuẩn (BNP), đã xuất hiện tại Việt Nam từ năm 1998 và thường bùng phát vào mùa lũ, với tỷ lệ chết lên đến 90% ở giai đoạn cá giống.

Hiện nay, các biện pháp kiểm soát dịch bệnh chủ yếu dựa vào sử dụng kháng sinh, nhưng việc sử dụng sai cách đã dẫn đến tình trạng kháng thuốc ở vi khuẩn. Theo nghiên cứu của Dung (2010), hơn 73% chủng *E. ictaluri* có hiện tượng kháng nhiều loại kháng sinh, làm giảm hiệu quả điều trị và ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm, đồng thời đặt ra nguy cơ đối với sức khỏe người tiêu dùng. Vắc xin bất hoạt đã được thử nghiệm như một biện pháp phòng ngừa nhiễm trùng *E. ictaluri* trên cá tra, nhưng kết quả cho thấy khả năng bảo vệ dài hạn vẫn còn hạn chế. Nghiên cứu gần đây được thực hiện tập trung vào việc phát triển các biện pháp phòng bệnh hiệu quả hơn, bao gồm vắc xin sống giảm độc lực và các chất

kích thích miễn dịch (Kordon et al., 2020). Việc nghiên cứu và phát triển vắc xin kết hợp giữa tiềm và cho ăn đang được đề xuất như một hướng đi tiềm năng nhằm cải thiện hiệu quả phòng bệnh, kiểm soát dịch bệnh và hỗ trợ sự phát triển bền vững của ngành nuôi cá tra tại Việt Nam. Việc đánh giá hiệu quả của các loại vaccine đang phát triển thường được đánh giá thông qua phương pháp cảm nhiễm với tác nhân gây bệnh để xác định khả năng bảo hộ trong điều kiện thí nghiệm (Lu et al., 2024; Ringø et al., 2014; Veenstra et al., 2017). Bên cạnh đó, kỹ thuật ELISA được sử dụng để phân tích nồng độ kháng thể trong huyết thanh nhằm đánh giá đáp ứng miễn dịch dịch thể. Ngoài ra, sự điều chỉnh biểu hiện các gen miễn dịch như *IL-1β* (Interleukin-1 beta), *IL-6* (Interleukin-6), *TNF-α* (Tumor Necrosis Factor-alpha), *IFN-γ* (Interferon-gamma) và các gen mã hóa protein kháng nguyên (MHC class I và MHC class II) cũng là một trong các phương pháp hiệu quả để đánh giá đáp ứng miễn dịch (Huang et al., 2014). Trong đó, *IL-1β* là một cytokine tiền viêm quan trọng, thuộc họ interleukin-1, có vai trò chính trong điều hòa các phản ứng miễn dịch không đặc hiệu và miễn dịch đặc hiệu ở động vật có xương sống (Ellis, 2001; Zou & Secombes, 2016). *IL-1β* được sản xuất chủ yếu bởi các tế bào miễn dịch như đại thực bào và bạch cầu đơn nhân khi nhận diện các tác nhân gây bệnh thông qua hệ thống thụ thể nhận dạng khuôn mẫu (Pattern recognition receptor), đặc biệt là các thụ thể TLR (Toll-like Receptors) (Dinarello, 2009). Cytokine này kích hoạt một loạt phản ứng viêm như tăng biểu hiện các phân tử kết dính tế bào, thúc đẩy sự sản xuất các cytokine khác, và tăng cường hoạt động thực bào để loại bỏ tác nhân gây bệnh (Sakai et al., 2021). Kết quả các nghiên cứu gần đây cho thấy sự biểu hiện gen *IL-1β* tăng đáng kể sau khi cá được kích thích bằng các vaccine hoặc các chất kích thích miễn dịch, qua đó đánh giá hoạt động của hệ thống miễn dịch (Wangkahart et al., 2019). Do đó, việc nghiên cứu sự điều chỉnh biểu hiện của *IL-1β* được xem là một công cụ hữu hiệu để đánh giá đáp ứng miễn dịch và hiệu quả của vaccine trong nuôi trồng thủy sản (Montero et al., 2024). Do đó, việc nghiên cứu phát triển các biện pháp phòng bệnh chủ động hơn như phát triển vắc xin và chất kích thích miễn dịch một cách có hiệu quả, cũng như trong chọn giống kháng bệnh nhằm kiểm soát và ngăn ngừa dịch bệnh bùng phát đang là xu thế trong tương lai để phát triển bền vững của ngành thủy sản. Chính vì thế, nghiên cứu này là cần thiết và có ý nghĩa thực tiễn lớn trong bối cảnh hiện nay.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu và chuẩn bị kháng nguyên

Cá tra khỏe (*P. hypophthalmus*) giai đoạn giống trọng lượng 15 - 20 g/con được thuần dưỡng trong bể composite có sục khí, thay nước mỗi 2 ngày và cho ăn theo nhu cầu mỗi ngày. Sau 1 tuần ương dưỡng, cá được bố trí cho các thử nghiệm cảm nhiễm.

Chủng vi khuẩn *E. ictaluri* VH116 được cung cấp bởi Khoa Bệnh học Thủy sản, Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ và đã được xác định giá trị độc lực.

2.2. Chuẩn bị kháng nguyên

Chủng vi khuẩn *E. ictaluri* VH116 được phục hồi trên môi trường dinh dưỡng TSA (Tryptic Soy Agar, Merck, Đức) và ủ ở 28°C trong 48 giờ. Sau khi phát triển, vi khuẩn được kiểm tra tính thuần chủng thông qua các chỉ tiêu sinh hóa cơ bản, bao gồm nhuộm Gram, tính di động, các phản ứng Oxidase, Catalase và thử nghiệm oxy hóa/ lên men (O/F). Sau đó, vi khuẩn được nuôi sinh khối trong môi trường dinh dưỡng TSB (Tryptic Soy Broth, Merck, Đức) để chuẩn bị kháng nguyên. Sinh khối vi khuẩn được thu bằng cách ly tâm ở 4.500 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, sau đó rửa sạch bằng dung dịch đệm phosphate (PBS - Phosphate Buffered Saline). Quá trình bất hoạt vi khuẩn để tạo kháng nguyên được thực hiện theo phương pháp của Khoi et al. (2021), formalin được sử dụng với nồng độ cuối cùng là 0,8%, và vi khuẩn ($\sim 10^9$ CFU/mL) được bất hoạt trong 4 giờ ở nhiệt độ 28°C. Sau khi bất hoạt, vi khuẩn được ly tâm để thu sinh khối và loại bỏ formalin bằng cách rửa ba lần bằng dung dịch PBS. Kháng nguyên bất hoạt sau đó được kiểm tra tính sống bằng cách trải lại trên đĩa thạch TSA và theo dõi kết quả sau 48 giờ để xác nhận vi khuẩn đã bị bất hoạt hoàn toàn.

2.3. Chuẩn vắc xin

Đối với vắc xin tiêm, quy trình được thực hiện theo phương pháp của (Ramirez-Paredes et al., 2020) với một số điều chỉnh. Dung dịch kháng nguyên được phối trộn với dầu khoáng (parafin) theo tỉ lệ 1:2 để tạo thành vắc xin nhũ dầu. Hỗn hợp được chứa trong các lọ thủy tinh 15 mL đã tiệt trùng

và trộn đều bằng xi-lanh 1 mL (Vinahankook, Việt Nam) cho đến khi tạo dung dịch nhũ tương màu trắng sữa. Mẫu vắc xin sau đó được kiểm tra tính an toàn trước khi tiêm thử nghiệm chính thức trên cá, với liều tiêm là 0,1 mL/cá và theo dõi trong 30 ngày.

Đối với vắc xin cho ăn, quy trình phối trộn được thực hiện dựa theo phương pháp của Khoi et al., (2023) với một số điều chỉnh. Dung dịch huyền phù kháng nguyên OD₆₁₀ = 1,0±0,02 được phun đều lên bề mặt thức ăn (32% protein, Proconco) với thể tích 350 mL/kg thức ăn ($\sim 10^8$ CFU/g thức ăn), sau đó thức ăn được sấy khô ở 50°C trong 1 giờ. Dầu gan mực (Vemedim) được sử dụng như chất phủ ngoài hạt thức ăn với tỉ lệ 1% (thể tích/khối lượng), sau đó tiếp tục sấy ở 37°C trong 1 giờ và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

2.4. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí trong 50 ngày, tổng cộng 480 cá tra được bố trí ngẫu nhiên vào 4 nghiệm thức với mật độ bố trí là 40 con/bể và mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Trước khi tiêm vắc xin, cá được gây mê bằng AQUI-S® (10 ppm, Elanco) và được tiêm xoang bụng với liều lượng 0,1 mL/cá vào ngày đầu tiên và được cho ăn (thức ăn bổ sung vắc xin) ở ngày thứ 30. Nghiệm thức 1 (NT1): Tiêm vắc xin ở ngày đầu tiên và cho ăn vắc xin ở ngày thứ 30; nghiệm thức 2 (NT2): Tiêm vắc xin ở ngày đầu tiên và không cho ăn vắc xin ở ngày thứ 30; nghiệm thức 3 (NT3): không tiêm vắc xin ở ngày đầu tiên và cho ăn vắc xin ở ngày thứ 30; và nghiệm thức 4 (NT4-Đối chứng): không tiêm vắc xin vào ngày đầu tiên và không cho ăn vắc xin vào ngày thứ 30. Trong suốt thời gian thí nghiệm, tỷ lệ chết, khả năng bơi lội, hành vi và lượng thức ăn được theo dõi và ghi nhận hằng ngày. Các thông số môi trường nước, bao gồm nhiệt độ (°C), pH, DO (mg/L), NH₃⁺ (mg/L), và NO₂⁻ (mg/L), cũng được đo lường và giám sát hàng ngày. Vào ngày thứ 30 và 50, 3 cá/bể được thu mẫu để phân tích các chỉ tiêu như tăng trưởng (WG, g), tăng trưởng tuyệt đối (DWG, g/ngày), tốc độ tăng trưởng tương đối (SGR, %/ngày) và tỷ lệ sống (%). Ngoài ra, mẫu mô thận trước cũng được thu mẫu và trữ trong dung dịch RNA Save (Biological Industries, Israel) ở -80°C để phân tích biểu hiện gen miễn dịch.

Bảng 1. Các môi được sử dụng định danh và khảo sát biểu hiện gen miễn dịch

Gen mục tiêu	Tên môi	Trình tự (5'→3')	Kích thước (bp)	Tm (°C)	Nguồn
<i>Edi</i>	Edi-F	CAGATGAGCGGATTTACAG	470	65	(Sakai et al., 2009)
	Edi-R	CGCGCAATTAACATAGAGCC			
<i>EF-1α</i>	EF1a-QF	GAGCTGAAGGAGAAGATTGAC	151	60	XM_026930196.2
	EF1a-QR	AACGACCAAGAGGAGGATAG			
<i>IL-1β</i>	PhIL1b-QF	GGAAATGAGGAGAATAAAGCATG	175	60	XM_034312378.2
	PhIL1b-QR	CTTTGTCTTTTACCTCCTCTATG			

Ghi chú: *Edi*: fimbrial gene cluster, *EF-1α*: Elongation factor 1-alpha 1, *IL-1β*: Interleukin-1 beta

Tăng trưởng (WG, g) = $W_f - W_i$

Tăng trưởng tuyệt đối (DWG, g/ngày) = $(W_f - W_i)/T$

Tốc độ tăng trưởng tương đối (SGR, %) = $[(LnW_f - LnW_i) / T] \times 100$

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

Trong đó: W_f là trọng lượng cuối cùng, W_i trọng lượng ban đầu và T là tổng thời gian thí nghiệm.

2.5. Xác định hiệu quả bảo hộ RPS vắc xin

Sau 50 ngày bố trí thí nghiệm, cá được chuyển vào các bể nhựa thể tích 60 lít, mỗi bể chứa 10 cá, tổng cộng 15 bể được sử dụng tương ứng với 5 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Trong đó, 4 nghiệm thức được xử lý bằng cách ngâm cá trong dung dịch vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* VH116 với mật độ $2,22 \times 10^6$ CFU/mL, trong khi nghiệm thức đối chứng không ngâm với vi khuẩn. Cá thí nghiệm được ngâm với 10 lít dung dịch vi khuẩn trong 30 phút, trong khi cá đối chứng được ngâm trong nước bể trong cùng khoảng thời gian. Sau quá trình ngâm, nước sạch được bổ sung vào các bể để đạt tổng thể tích 60 lít. Dấu bệnh lý và tỷ lệ chết của cá được theo dõi hàng ngày trong 14 ngày. Các mẫu cá có biểu hiện bệnh lý đặc trưng được thu và tái phân lập vi khuẩn trên môi trường TSA và ủ ở 28°C trong 48 giờ. Hình thái khuẩn lạc sau khi nuôi cấy được quan sát và kiểm tra bằng phương pháp PCR sử dụng cặp primer đặc hiệu Edi-F/Edi-R (Bảng 1). Tỷ lệ chết của cá ở các nghiệm thức được sử dụng để tính toán hệ số bảo hộ tương đối (Relative Percentage Survival - RPS), đánh giá hiệu quả bảo vệ của vắc xin đối với tác nhân gây bệnh dựa trên công thức: $RPS = (1 - A/B) \times 100$, trong đó A là tỷ lệ cá chết ở nghiệm thức có vắc xin và B là tỷ lệ cá chết nghiệm thức đối chứng (Amend, 1981).

2.6. Đánh giá biểu hiện gen miễn dịch trên cá thí nghiệm

RNA tổng số từ các mẫu mô cá thí nghiệm được tách chiết bằng Trisure Reagent (ABT, Việt Nam), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ và chất lượng RNA được xác định bằng phương pháp đo quang phổ ở bước sóng hấp thụ 260 nm và 280 nm sử dụng thiết bị NanoDrop Spectrophotometers (Thermo Scientific). Mỗi mẫu RNA tổng số (1.000 ng) được xử lý bằng gDNA Eraser nhằm loại bỏ DNA tạp (gDNA), đảm bảo độ tinh sạch của RNA. Tiếp theo, quá trình tổng hợp cDNA được thực hiện bằng PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Takara, Nhật Bản) theo hướng dẫn kỹ thuật từ nhà sản xuất. Sản phẩm cDNA được pha loãng 10 lần trong dung dịch đệm TE 1X và sử dụng làm khuôn mẫu cho các thí nghiệm qRT-PCR. Sự biểu hiện tương quan giữa gen liên quan đến miễn dịch *IL-1β* so với gen tham chiếu *EF-1α* (Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) được xác định bằng phương pháp qRT-PCR trên hệ thống CFX Opus 96 Real-Time PCR (BioRad, Mỹ) với SensiFAST SYBR® No-ROX (Bioline, Mỹ). Điều kiện PCR được thực hiện như sau: 95°C trong 2 phút, sau đó 40 chu kỳ ở 95°C trong 5 giây và 60°C trong 30 giây. Sự biểu hiện của gen miễn dịch được tính toán dựa trên mức biểu hiện tương đối so với *EF-1α*, sử dụng phương pháp $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Mỗi mẫu được phân tích ba lần lặp và toàn bộ dữ liệu được trình bày dưới dạng biểu hiện mRNA tương đối so với giá trị của nhóm đối chứng. Để so sánh mức độ biểu hiện gen giữa các nhóm nghiệm thức, việc phân tích phương sai ANOVA một nhân tố với phép thử Duncan được thực hiện thông qua phần mềm IBM SPSS Statistics phiên bản 22.0 (SPSS) với mức ý nghĩa $p < 0,05$. Trình tự các đoạn môi cho mỗi gen được liệt kê trong Bảng 1.

Bảng 2. Kết quả theo dõi các chỉ tiêu tăng trưởng

Chỉ tiêu	Thí nghiệm			
	NT1	NT2	NT3	NT4
Ban đầu				
WG (g)	27,22±3,48	27,22±3,48	27,22±3,48	27,22±3,48
Ngày 30				
WG (g)	36,47±2,73 ^a	35,07±2,58 ^a	34,79±2,65 ^a	36,83±2,69 ^a
DWG (g/ngày)	0,31±0,04 ^a	0,26±0,02 ^a	0,25±0,03 ^a	0,32±0,03 ^a
SGR (%/ngày)	0,97±0,06 ^a	0,84±0,05 ^a	0,82±0,07 ^a	1,01±0,08 ^a
Ngày 50				
WG (g)	40,67±3,25 ^a	38,69±3,10 ^a	39,15±3,15 ^a	41,12±3,22 ^a
DWG (g/ngày)	0,67±0,04 ^a	0,57±0,05 ^a	0,60±0,04 ^a	0,70±0,06 ^a
SGR (%/ngày)	1,34±0,11 ^a	1,17±0,09 ^a	1,21±0,10 ^a	1,38±0,12 ^a
Tỷ lệ sống (%)	98,33±1,18 ^a	96,67±1,18 ^a	97,50±2,04 ^a	95,83±1,18 ^a

Ghi chú: WG: tăng trưởng, DWG: tăng trưởng hàng ngày, SGR: tốc độ tăng trưởng tương đối. Các số liệu trong cùng một hàng có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả theo dõi các chỉ tiêu tăng trưởng và các yếu tố môi trường

Kết quả ghi nhận các chỉ tiêu tăng trưởng, tăng trưởng tuyệt đối, tốc độ tăng trưởng tương đối và tỷ lệ sống được ghi nhận trong suốt quá trình bố trí đánh giá hiệu quả ở các thí nghiệm phối hợp vắc xin tiêm và vắc xin cho ăn được thể hiện thông qua Bảng 2. Tất cả các thí nghiệm (NT1, NT2, NT3 và NT4 - đối chứng) đều bắt đầu với cùng mức trọng lượng ban đầu (WG) là 27,22±3,48 g. Sau 30 ngày bố trí, tăng trưởng (WG) ở tất cả các thí nghiệm khác biệt đáng kể, dao động từ 34,79±2,65 g đến 36,83±2,69 g. Kết quả tăng trưởng hàng ngày (DWG) và tốc độ tăng trưởng tương đối (SGR) cũng cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các thí nghiệm, với DWG trong khoảng 0,25 - 0,32 g/ngày và SGR từ 0,82 đến 1,01 %/ngày. Vào thời điểm sau 50 ngày, trọng lượng cuối cùng của cá tăng lên ở tất cả các thí nghiệm, với NT4 (41,12±3,22 g) có trọng lượng trung bình cao nhất, tiếp theo là NT1, NT3 và thấp nhất NT2 (38,69±3,10 g). Giá trị DWG dao động từ 0,57±0,05 g/ngày (NT2) đến 0,70±0,06 g/ngày (NT4), và SGR dao động từ 1,17±0,09 %/ngày (NT2) đến 1,38±0,12 %/ngày (NT4). Tỷ lệ sống (SR) cũng đạt mức cao, từ 95,83±1,18% (NT4) đến 98,33±1,18% (NT1). Kết quả cho thấy rằng việc phối hợp tiêm vắc xin và bổ sung vắc xin qua đường ăn không làm ảnh hưởng lớn đến tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống của cá tra trong suốt thời gian thí nghiệm. Cụ thể, NT1 và NT4 (đối chứng) cho thấy mức tăng trưởng cao nhất, mặc dù không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các thí nghiệm trong tất cả các chỉ tiêu tăng trưởng.

Bảng 3. Đánh giá hiệu quả bảo hộ của các thí nghiệm

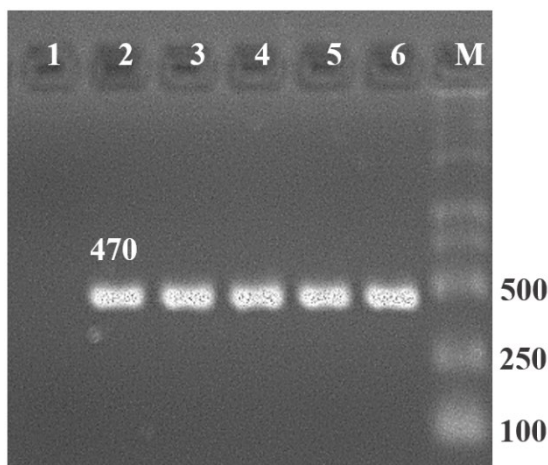
Thí nghiệm	Tỷ lệ chết (%)	Hệ số bảo hộ RPS (%)
NT1	26,7	61,9
NT2	36,7	47,6
NT3	46,7	33,3
NT4	70,0	-

Tương tự với nghiên cứu của Kole et al. (2019), việc bổ sung vắc xin qua thức ăn không ảnh hưởng đáng kể đến tăng trưởng của cá, mà chủ yếu có tác dụng trong việc kích thích phản ứng miễn dịch. Hơn nữa, kết quả nghiên cứu của Ramirez-Paredes et al. (2019) cho thấy rằng phương pháp tiêm vắc xin có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ mà không làm suy giảm khả năng tăng trưởng của cá, ngay cả khi được sử dụng kết hợp với phương pháp cho ăn. Không có sự khác biệt đáng kể về DWG giữa các thí nghiệm cho thấy rằng cả tiêm vắc xin và bổ sung vắc xin qua thức ăn đều không gây ảnh hưởng bất lợi lên khả năng sinh trưởng hàng ngày của cá tra. Kết quả nghiên cứu của Khoi et al. (2021), khi tiêm vắc xin không làm giảm DWG của cá thí nghiệm. Các thí nghiệm được sử dụng vắc xin tiêm và vắc xin cho ăn đều đạt tỷ lệ sống cao, cho thấy tính an toàn của các loại vắc xin này trong thí nghiệm. Tỷ lệ sống cao ở tất cả các thí nghiệm là điểm tích cực cho thấy không có ảnh hưởng bất lợi từ vắc xin đối với cá thí nghiệm. Ngoài ra, các yếu tố môi trường như nhiệt độ (27 - 28°C), pH (6,5 - 7,5), TAN (0,5 - 10 mg/L), DO (3,5 - 8,22 mg/L) và NO₂⁻ (0 - 5 mg/L) được duy trì ở mức ổn định, với tỷ lệ thay nước 10 - 20% mỗi ngày nhằm đảm bảo điều kiện môi trường tối ưu cho cá trong suốt quá trình bố trí thí nghiệm. Nhìn chung, các kết quả này

kháng định tính an toàn và tiềm năng của việc sử dụng phối hợp tiêm và cho ăn vắc xin trong nuôi trồng thủy sản, có tiềm năng áp dụng vào thực tiễn để nâng cao khả năng miễn dịch mà không ảnh hưởng đến tăng trưởng và tỷ lệ sống của cá.

3.2. Kết quả cảm nhiễm đánh giá hiệu quả của vắc xin

Nghiên cứu cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* được thực hiện sau 50 ngày bố trí thí nghiệm nhằm đánh giá hiệu quả giữa các nghiệm thức vắc xin trên cá tra đã cho thấy sự khác biệt rõ rệt về tỷ lệ chết và hệ số bảo hộ RPS giữa các phương pháp áp dụng vắc xin. Ở nghiệm thức NT1, cá tra thí nghiệm có tỷ lệ chết tích lũy ghi nhận thấp nhất là 26,7% và hiệu quả bảo hộ cao nhất đạt 61,9%. Nghiệm thức NT2, đạt hiệu quả bảo hộ 47,6% với tỷ lệ chết 36,7%. Trong khi đó, nghiệm thức NT3, có tỷ lệ chết là 46,7% và hiệu quả bảo hộ 33,3%. Nghiệm thức đối chứng (NT4) không có sử dụng vắc xin, cho thấy tỷ lệ chết cao nhất là 70%, cho thấy ảnh hưởng quan trọng của vắc xin trong phòng bệnh cho cá tra. Kết quả tái phân lập và định danh vi khuẩn bằng phương pháp PCR ở các nghiệm thức cho thấy vi khuẩn tái phân lập đều có sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu Edi-F và Edi-R, có kích thước 470 bp, khẳng định vi khuẩn tái phân lập là *E. ictaluri* (Hình 1). Kết quả phân tích tương tự với nghiên cứu trước đây (Sakai et al., 2009).



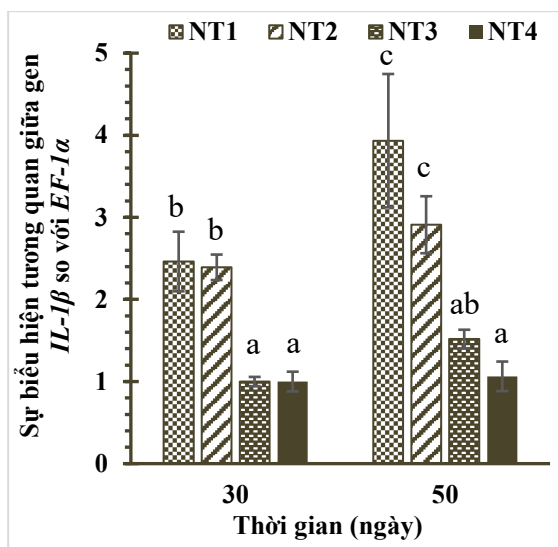
Hình 1. Kết quả tái định danh vi khuẩn phân lập từ cá cảm nhiễm bằng PCR.

Giếng 1: đối chứng âm (ddH₂O), Giếng 2: đối chứng dương (*E. ictaluri* VH116), Giếng 3: nghiệm thức NT1, Giếng 4: nghiệm thức NT2, Giếng 5: nghiệm thức NT3, Giếng 6: nghiệm thức NT4 và Giếng M: 100bp DNA ladder (P-100Lad-500, Phusa Genomics)

Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu quả bảo vệ tương đối (RPS) đạt 61,9% trên cá tra khi được sử dụng kết hợp phương pháp tiêm và cho ăn vắc xin bất hoạt trên cá tra. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng tiêm vắc xin thường tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh hơn và hiệu quả bảo vệ cao hơn so với các phương pháp khác như ngâm, do sự khác biệt trong quá trình hấp thụ vắc xin ở từng cá thể (Munang'andu & Evensen, 2019; Nakanishi & Ototake, 1997). Liều tăng cường đóng vai trò quan trọng trong việc kéo dài thời gian đáp ứng miễn dịch, từ đó nâng cao hiệu quả lâu dài của chiến lược tiêm vắc xin. Nghiên cứu của Thịnh et al. (2009) đã áp dụng phương pháp ngâm vắc xin cho cá tra giống vào ngày đầu tiên, sau đó bổ sung hai liều tăng cường bổ sung qua thức ăn vào các ngày 8 – 21 và 101 – 107, ghi nhận hệ số bảo hộ (RPS) đạt 47% khi cá được cảm nhiễm với *E. ictaluri* ở mật độ $8,1 \times 10^6$ CFU/mL. Trong một nghiên cứu gần đây, cá chẻm được cho ăn vắc xin phòng bệnh do vi khuẩn *V. alginolyticus* và *V. parahaemolyticus* với hai nhịp tăng cường vào ngày 14 và 42 (mỗi liều kéo dài 5 ngày) đạt RPS từ 70 đến 80% (Mohamad et al., 2022). Kết quả của nghiên cứu này cho thấy hiệu quả của việc kết hợp tiêm và cho ăn vắc xin có tiềm năng cung cấp khả năng bảo vệ đáng kể để phòng *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mủ trên cá tra, với khả năng ứng dụng rộng rãi trong điều kiện nuôi thực tế.

3.3. Đánh giá ảnh hưởng của vaccine lên biểu hiện của gen miễn dịch

Kết quả đánh giá hiệu quả của việc phối hợp sử dụng vắc xin bằng phương pháp tiêm và cho ăn được thể hiện qua mối tương quan biểu hiện gen miễn dịch *IL-1 β* giữa các nghiệm thức (Hình 2). Kết quả cho thấy mức độ biểu hiện của gen *IL-1 β* tăng đáng kể ở các nghiệm thức có tiêm vắc xin (NT1 và NT2) so với các nghiệm thức không được tiêm vắc xin (NT3 và NT4) sau 30 ngày bố trí thí nghiệm, khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm nghiệm thức có tiêm và không tiêm vắc xin, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Vào ngày thứ 30, nghiệm thức NT1 và NT3 được bổ sung vắc xin qua thức ăn, biểu hiện của gen *IL-1 β* tiếp tục được ghi nhận có xu hướng tăng. Đáng chú ý, mức độ điều chỉnh tăng ở nghiệm thức NT1 (kết hợp tiêm và cho ăn vắc xin) cao hơn so với NT2 (chỉ tiêm vắc xin), tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tương tự, nghiệm thức NT3 (chỉ cho ăn vắc xin vào ngày thứ 30) cũng ghi nhận sự gia tăng biểu hiện *IL-1 β* vào ngày thứ 50 so với nhóm đối chứng (NT4), nhưng vẫn thấp hơn so với nghiệm thức NT2, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 2. Kết quả mối tương quan biểu hiện gen miễn dịch *IL-1β* giữa các nghiệm thức

Vắc xin đóng vai trò quan trọng trong nuôi trồng thủy sản với khả năng bảo vệ chống lại các bệnh nhiễm khuẩn, thông qua tiêm hoặc cho cá ăn, nhờ các lợi ích về hiệu quả chi phí và khả năng ứng dụng thực tiễn (Munang'andu & Evensen, 2019; Vinitantharat et al., 1999). Hiệu quả bảo vệ của vắc xin phụ thuộc chặt chẽ vào khả năng kích thích hệ miễn dịch, với các cơ chế đáp ứng đa dạng (Bercovier et al., 1997). Việc đánh giá hiệu quả của các loại vắc xin đang phát triển có thể thực hiện thông qua phương pháp cảm nhiễm với một số tác nhân gây bệnh trên cá để xác định khả năng bảo hộ của vắc xin trong điều kiện thí nghiệm (Lu et al., 2024; Ringø et al., 2014; Veenstra et al., 2017). Đồng thời, việc phân tích nồng độ kháng thể bằng kỹ thuật ELISA được sử dụng để đo lường nồng độ kháng thể trong huyết thanh biến động, từ đó đánh giá đáp ứng miễn dịch thể mà vắc xin kích hoạt. Ngoài ra, việc theo dõi sự điều chỉnh biểu hiện của các gen liên quan đến đáp ứng miễn dịch gen miễn dịch, đặc biệt các cytokine và các yếu tố điều hòa miễn dịch, là công cụ quan trọng trong đánh giá hiệu quả của vắc xin (Huang et al., 2014), đặc biệt ở cá tra (*P. hypophthalmus*). Các gen miễn dịch này bao gồm các cytokine như *IL-1β*, *TNF-α*, *IL-6* và các yếu tố điều hòa miễn dịch khác, có vai trò kích hoạt và điều hòa phản ứng miễn dịch. Việc phân tích sự thay đổi biểu hiện của các gen này cho phép đánh giá khả năng kích thích phản ứng miễn dịch thích

hợp của vắc xin. Trong đó, Interleukin-1 β là một cytokine quan trọng trong việc kích thích các phản ứng miễn dịch, đóng vai trò chính trong việc khởi phát phản ứng viêm và tăng cường hoạt động của các tế bào miễn dịch (Secombes et al., 1999). Sự gia tăng biểu hiện của *IL-1β* sau khi cá được tiêm hoặc cho ăn vắc xin cho thấy hệ miễn dịch đã được kích hoạt, từ đó giúp đánh giá khả năng bảo hộ của vắc xin (Raida & Buchmann, 2008). Vì vậy, *IL-1β* có thể được sử dụng như một phương pháp quan trọng trong đánh giá hiệu quả của vắc xin. Trong nghiên cứu của Silvaraj et al. (2020), biểu hiện gen của *IL-1β* điều chỉnh tăng ở thận trước, tỷ tạng và ruột của cá chêm (*Lates calcarifer*) khi được tiêm với vắc xin phòng bệnh do *Vibrio harveyi* đã được ghi nhận. Ở cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*), biểu hiện *IL-1β* cao hơn được quan sát thấy ở tỷ tạng và mang sau khi tiêm với vắc xin phòng bệnh do *Yersinia ruckeri* bất hoạt bằng formalin (Harun et al., 2011), cũng như ở thận trước và tế bào phúc mạc sau khi tiêm vắc xin bất hoạt *Aeromonas salmonicida* bằng formalin (Veenstra et al., 2021). *IL-1β* và *TNF-α* là các cytokine được sản xuất bởi nhiều loại bạch cầu nhằm đáp ứng với các mẫu phân tử liên quan đến mầm bệnh (PAMPs) (Zou & Secombes, 2016). Sự thay đổi biểu hiện của *IL-1β* và các gen liên quan khác cung cấp thông tin về khả năng bảo vệ của vắc xin và cho phép so sánh mức độ đáp ứng miễn dịch giữa các phương pháp tiêm và đường uống, góp phần tối ưu hóa chiến lược phòng ngừa bệnh trong nuôi trồng thủy sản.

4. KẾT LUẬN

Việc sử dụng kết hợp tiêm và cho ăn vắc xin có tiềm năng tăng cường miễn dịch bảo vệ hiệu quả trên cá tra (*P. hypophthalmus*) sau khi gây cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mủ. Phương pháp tiêm vắc xin có thể được áp dụng trong các trang trại ương giống trước khi cá được chuyển đến ao nuôi thương phẩm, sau đó vắc xin được sử dụng bổ sung qua đường ăn để giảm tác động và chi phí cho liệu tăng cường. Cách tiếp cận này không chỉ khả thi trong điều kiện thực tế mà còn hỗ trợ người nuôi quản lý sức khỏe và nâng cao miễn dịch cho cá trong suốt quá trình nuôi.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự tài trợ kinh phí từ Trường Đại học Cần Thơ, mã số: T2023-166.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

- Amend, D. F. (1981). Potency testing of fish vaccines. *Developments in Biological Standardization*, 49, 447–454.
- Bercovier, H., Ghittino, C., & Eldar, A. (1997). Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. *Developments in Biological Standardization*, 90, 153–160.
- Crumlish, M., Dung, T. T., Turnbull, J. F., Ngoc, N. T. N., & Ferguson, H. W. (2002). Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases*, 25(12), 733–736. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00412.x>
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 519–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>
- Dung, T. T. (2010). *Edwardsiella ictaluri* in *Pangasianodon* catfish: antimicrobial resistance and the early interactions with its host. In *Veterinary Sciences* (pp. 1–136). Ghent University.
- Dung, T. T., Ngoc, N. T. N., Thinh, N. Q., Thy, D. T. M., Tuan, N. A., Shinn, A., & Crumlish, M. (2008). Common diseases of pangasius catfish farmed in Viet Nam. *Global Aquaculture Advocate*, 11(4), 77–78.
- Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8–9), 827–839. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00038-6)
- FAO. (2022). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. <https://doi.org/10.4060/CC0461EN>
- Hang, N. T. T., & Oanh, Đ. T. H. (2012). Identification of parasitic groups creating cysts in catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Can Tho University Journal of Science*, 22c, 155–164 (in Vietnamese).
- Harun, N. O., Wang, T., & Secombes, C. J. (2011). Gene expression profiling in naïve and vaccinated rainbow trout after *Yersinia ruckeri* infection: Insights into the mechanisms of protection seen in vaccinated fish. *Vaccine*, 29(26), 4388–4399. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.003>
- Huang, L. Y., Wang, K. Y., Xiao, D., Chen, D. F., Geng, Y., Wang, J., He, Y., Wang, E. L., Huang, J. L., & Xiao, G. Y. (2014). Safety and immunogenicity of an oral DNA vaccine encoding Sip of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* delivered by live attenuated *Salmonella typhimurium*. *Fish and Shellfish Immunology*, 38(1), 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.02.017>
- Khoi, L. M., Dung, T. T., Hang, B. T. B., Seng, E. K., Hian, S. K., Hoa, T. T. T., & Thy, Đ. T. M. (2021). Evaluation of the immunological effectiveness of the vaccine against hemorrhagic disease caused by *Aeromonas hydrophila* on catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Can Tho University Journal of Science*, 57(3), 181–190 (in Vietnamese). <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2021.100>
- Khoi, L. M., Trung, N. B., Hieu, H. T., & Dung, T. T. (2023). 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*). *Can Tho University Journal of Science*, 59(2 SE-), 154–164 (in Vietnamese). <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2023.075>
- 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>
- Kordon, A. O., Kalindamar, S., Majors, K., Abdelhamed, H., Tan, W., Karsi, A., & Pinchuk, L. M. (2020). Live attenuated *Edwardsiella ictaluri* vaccines enhance the protective innate immune responses of channel catfish B cells. *Developmental & Comparative Immunology*, 109, 103711. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103711>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu, C. lan, Wangkahart, E., Huang, J. wei, Huang, Y. xiong, Huang, Y., Cai, J., Jian, J. chang, & Wang, B. (2024). Immune response and protective efficacy of *Streptococcus agalactiae* vaccine coated with chitosan oligosaccharide for different immunization strategy in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 145, 109353. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109353>
- Ly, L. T. T., Nguyen, D. N., Vo, P. H., & Doan, C. Van. (2009). Hemorrhage disease of cultured tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Mekong Delta (Vietnam). *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 61. <https://doi.org/10.46989/001c.20557>

- Mohamad, A., Mursidi, F. A., Zamri-Saad, M., Amal, M. N. A., Annas, S., Monir, M. S., Loqman, M., Hairudin, F., Al-Saari, N., & Ina-Salwany, M. Y. (2022). Laboratory and field assessments of oral vibrio vaccine indicate the potential for protection against vibriosis in cultured marine fishes. *Animals*, 12(2), 133. <https://doi.org/10.3390/ani12020133>
- Montero, D., Torrecillas, S., Serradell, A., Nedoluzhko, A., Fernández-Montero, Á., Makol, A., Monzón-Atienza, L., Valdenegro, V., Sanahuja, I., Galindo-Villegas, J., & Acosta, F. (2024). Phylogenics enhance welfare and vaccine efficacy against *Vibrio anguillarum* in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 585, 740714. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740714>
- Munang'andu, H. M., & Evensen, Ø. (2019). Correlates of protective immunity for fish vaccines. *Fish and Shellfish Immunology*, 85, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.060>
- Nakanishi, T., & Otake, M. (1997). Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. *Developments in Biological Standardization*, 90, 59–68.
- Raida, M. K., & Buchmann, K. (2008). Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine*, 26(8), 1050–1062. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.12.029>
- Ramírez-Paredes, J. G., Mendoza-Roldan, M. A., Lopez-Jimena, B., Shahin, K., Metselaar, M., Thompson, K. D., Penman, D. J., Richards, R. H., & Adams, A. (2019). Whole cell inactivated autogenous vaccine effectively protects red Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against francisellosis via intraperitoneal injection. *Journal of Fish Diseases*, 42(8), 1191–1200. <https://doi.org/10.1111/jfd.13041>
- Ramírez-Paredes, J. G., Verner-Jeffreys, D. W., Papadopoulou, A., Monaghan, S. J., Smith, L., Haydon, D., Wallis, T. S., Davie, A., Adams, A., & Migaud, H. (2020). A commercial autogenous injection vaccine protects ballan wrasse (*Labrus bergylta*, Ascanius) against *Aeromonas salmonicida* vpa type V. *Fish and Shellfish Immunology*, 107, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.09.040>
- Ringø, E., Olsen, R. E., Jensen, I., Romero, J., & Lauzon, H. L. (2014). Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 24(4), 1005–1032. <https://doi.org/10.1007/s11160-014-9361-y>
- Sakai, M., Hikima, J. I., & Kono, T. (2021). Fish cytokines: current research and applications. *Fisheries Science*, 87, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s12562-020-01476-4>
- Sakai, T., Yuasa, K., Sano, M., & Iida, T. (2009). Identification of *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda* by species-specific polymerase chain reaction targeted to the upstream region of the fimbrial gene. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21(2), 124–132. <https://doi.org/10.1577/H08-061.1>
- Secombes, C. J., Zou, J., Laing, K., Daniels, G. D., & Cunningham, C. (1999). Cytokine genes in fish. *Aquaculture*, 172(1–2), 93–102. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00441-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00441-4)
- Silvaraj, S., Yasin, I. S. M., Karim, M. M. A., & Saad, M. Z. (2020). Elucidating the efficacy of vaccination against vibriosis in Lates calcarifer using two recombinant protein vaccines containing the outer membrane protein k (R-ompk) of *Vibrio alginolyticus* and the DNA chaperone j (r-dnaj) of *Vibrio harveyi*. *Vaccines*, 8(4), 1–19. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040660>
- Thinh, N. H., Kuo, T. Y., Hung, L. T., Loc, T. H., Chen, S. C., Evensen, & Schuurman, H. J. (2009). Combined immersion and oral vaccination of Vietnamese catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) confers protection against mortality caused by *Edwardsiella ictaluri*. *Fish and Shellfish Immunology*, 27(6), 773–776. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.08.012>
- Veenstra, K. A., Wang, T., Alnabulsi, A., Douglas, A., Russell, K. S., Tubbs, L., Arous, J. Ben, & Secombes, C. J. (2017). Analysis of adipose tissue immune gene expression after vaccination of rainbow trout with adjuvanted bacterins reveals an association with side effects. *Molecular Immunology*, 88, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.05.026>
- Veenstra, K. A., Wang, T., Russell, K. S., Tubbs, L., Ben Arous, J., & Secombes, C. J. (2021). Montanide™ ISA 763A VG and ISA 761 VG induce different immune pathway responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) when used as adjuvant for an *Aeromonas salmonicida* bacterin. *Fish and Shellfish Immunology*, 114, 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.04.024>
- Vinitantharat, S., Gravningen, K., & Greger, E. (1999). Fish vaccines. *Advances in Veterinary Medicine*, 41(C), 539–550. [https://doi.org/10.1016/S0065-3519\(99\)80040-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3519(99)80040-8)
- Wangkahart, E., Secombes, C. J., & Wang, T. (2019). Studies on the use of flagellin as an immunostimulant and vaccine adjuvant in fish aquaculture. *Frontiers in Immunology*, 9, 3054. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03054>
- Zou, J., & Secombes, C. J. (2016). The function of fish cytokines. *Biology*, 5(2), 23. <https://doi.org/10.3390/biology5020023>