

## ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA CÁ ĐIỀU HỒNG (*OREOCHROMIS SP.*) CHỨNG VACCINE AQUAVAC STREP SA

Đặng Thị Hoàng Oanh<sup>1</sup> và Nguyễn Thị Kiều<sup>1</sup>

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

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 15/07/2012

Ngày chấp nhận: 22/03/2013

### Title:

Immune responses in red tilapia (*Oreochromis sp.*) vaccinated with Aquavac Strep sa

### Từ khóa:

Cá điều hồng, *Streptococcus agalactiae*, vaccine, kháng thể

### Keywords:

Red tilapia, *Streptococcus agalactiae*, vaccination, antibody

### ABSTRACT

Immune responses of red tilapia (*Oreochromis sp.*) vaccinated with Aquavac Strep sa was studied in experimental condition. Experiment was set up with 4 trials in triplicate including 1 control and 3 vaccine injection with concentrations 0.05 ml, 0.1 ml and 0.2ml/fish, respectively. Samples were collected in four times at 7 days interval starting from 7 days post vaccination. Results from haematological analysis revealed no significant reduction ( $p > 0,05$ ) in total number red blood cell in groups vaccinated with 0,05m and 0,1ml/fish compared with the control group but it was significant ( $p < 0,05$ ) in group vaccinated with 0,2ml/fish at the fourth sampling. The number of white blood cells, lymphocytes, neutrophils, monocytes and thrombocyte in vaccinated groups were higher than in the control group. Average antibody titers in vaccinated groups were higher than in the control group and reach the highest value at the third sampling time.

### TÓM TẮT

Đặc tính miễn dịch của cá điều hồng (*Oreochromis sp.*) chủng vaccine Aquavac Strep sa được tìm hiểu qua thực nghiệm. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức lặp lại 3 lần gồm 1 nghiệm thức đối chứng và 3 nghiệm thức được tiêm vaccine với nồng độ lần lượt là 0,05 ml, 0,1ml và 0,2ml/cá. Mẫu cá được thu 4 đợt, mỗi đợt cách nhau 7 ngày kể từ ngày thứ 7 sau khi tiêm vaccine. Kết quả cho thấy mật độ tế bào hồng cầu ở các nghiệm thức tiêm vaccine 0,05ml/cá và 0,1ml/cá giảm không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng nhưng có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) ở nghiệm thức tiêm vaccine 0,2ml/cá ở đợt thu mẫu thứ 4. Mật độ bạch cầu, tế bào lympho, bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn nhân và tiểu cầu ở các nghiệm thức tiêm vaccine cao hơn nghiệm thức đối chứng. Hiệu giá kháng thể trung bình ở các nghiệm thức tiêm vaccine đều cao hơn đối chứng và đạt cao nhất ở đợt thu mẫu thứ 3.

## 1 GIỚI THIỆU

Trong những năm qua, ngành nuôi trồng thủy sản của Việt Nam đã đạt được những thành tựu đáng kể, không ngừng tăng nhanh về

diện tích sản lượng, đóng góp một phần không nhỏ vào tổng kim ngạch xuất khẩu của cả nước. Trong khi nghề nuôi cá tra, cá basa đang gặp một số khó khăn nhất định do dịch bệnh, giá cả thị trường lên xuống thất thường

thì nghề nuôi cá điêu hồng đang phát triển nhanh chóng, góp phần đáng kể trong việc phát triển kinh tế. Tiền Giang, Vĩnh Long và Đồng Tháp là những tỉnh nuôi cá điêu hồng có hiệu quả và sản lượng cao nhất trong khu vực đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Ngoài khu vực ĐBSCL, cá điêu hồng còn được nuôi nhiều ở khu vực miền Đông dọc theo sông La Ngà, tỉnh Đồng Nai, hồ Dầu Tiếng, tỉnh Tây Ninh.

Cá điêu hồng đang là một đối tượng được thị trường ưa chuộng, thịt cá có giá trị dinh dưỡng cao, thơm ngon và dễ chế biến. Cá điêu hồng trở thành nguồn cung cấp thực phẩm quen thuộc trong nước và dần dần tiếp cận thị trường thế giới thông qua chế biến xuất khẩu. Bên cạnh sự phát triển nhanh chóng của nghề nuôi là sự xuất hiện bệnh trên cá điêu hồng ngày càng nhiều hơn. Trong đó bệnh do vi khuẩn gây thiệt hại nhiều nhất cho nghề nuôi cá điêu hồng. Trong đó, một số loài vi khuẩn phổ biến như: *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., đã được ghi nhận là gây hao hụt lớn ở cá điêu hồng nuôi trong bè.

Người nuôi chủ yếu sử dụng thuốc kháng sinh để trị bệnh, việc sử dụng thuốc kháng sinh không đúng nguyên tắc đã dẫn đến hiện tượng 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 người tiêu dùng. Cho nên, 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.

Aquavac Strep sa là vaccine bất hoạt được sử dụng để phòng bệnh do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* trên cá rô phi và một số loài cá khác. Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả thử nghiệm về đáp ứng miễn dịch của cá điêu hồng hồng chủng vaccine Aquavac Strep sa nhằm cung cấp thông tin về khả năng ứng dụng vaccine này để phòng bệnh cho cá điêu hồng nuôi thương phẩm.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Hệ thống thí nghiệm

Hệ thống thí nghiệm được bố trí tại phòng thí nghiệm ướn, Bộ môn Sinh học và Bệnh học

Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ, gồm có: (1) bể composite (2 m<sup>3</sup>) được dùng để trữ cá thí nghiệm (trước khi sử dụng bể được vệ sinh kỹ bằng xà phòng và chlorine 200 ppm, phơi khô, sau đó cấp nước vào 2/3 bể và sục khí liên tục); (2) bể nhựa (250L) được dùng để bố trí các nghiệm thức thí nghiệm (bể cũng được vệ sinh kỹ, cấp nước, sục khí 1 – 2 ngày trước khi bố trí thí nghiệm).

### 2.2 Cá thí nghiệm

Cá điêu hồng được mua từ trại cá giống ở Tiền Giang có trọng lượng từ 15 – 20 g/con. Cá được chuyển về phòng thí nghiệm và dưỡng trong bể composite có sục khí khoảng một tuần và cho cá ăn thức ăn công nghiệp theo nhu cầu. Kiểm tra tình trạng sức khỏe của cá trước khi bố trí thí nghiệm.

### 2.3 Vaccine

Vaccine Aquavac Strep sa sử dụng thí nghiệm do Công ty Intervet (Vietnam) cung cấp. Vaccine được chủng cho cá bằng phương pháp tiêm (theo hướng dẫn của nhà sản xuất).

### 2.4 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức và lặp lại 3 lần gồm 3 nghiệm thức tiêm vaccine với các nồng độ lần lượt là 0,05; 0,1 và 0,2 ml/cá và 1 nghiệm thức đối chứng tiêm nước muối sinh lý (0.9% NaCl). Mật độ bố trí 15 con cá/bể. Thí nghiệm được bố trí trong điều kiện có sục khí và siphon đáy. Sau khi tiêm vaccine 7 ngày thì tiến hành thu mẫu (3 con cá/nghiệm thức), mỗi đợt thu mẫu cách nhau 7 ngày và thu 4 đợt.

### 2.5 Xác định các chỉ tiêu huyết học

Máu cá được thu bằng ống tiêm 1ml rút máu cá ở động mạch chủ và cho vào ống eppendorf đã được tiệt trùng và áo bằng dung dịch chống đông heparin.

*Định lượng hồng cầu (Natt và Herrick, 1952)*

10μl máu được cho vào ống nghiệm nhựa có chứa 1990μl dung dịch Natt & Herrick. Lắc nhẹ cho đều ống nghiệm. Mật độ hồng cầu được xác định bằng buồng đếm hồng cầu thông qua sự

quan sát dưới kính hiển vi quang học (40X). Đầu tiên xem ở vật kính 10X, định vị 5 vùng đếm (vùng ký hiệu chữ C), đưa vào giữa thị trường, chuyển sang vật kính 40X. Mật độ hồng cầu được tính theo công thức:  $C \times 10 \times 5 \times 200$  (tb/mm<sup>3</sup>) với C là tổng số hồng cầu trên 5 vùng đếm.

#### Định lượng và định loại bạch cầu

Mẫu máu đã được cố định trên lame được nhuộm bằng dung dịch nhuộm Wright & Giemsa (Chinabut và ctv., 1991). Theo thứ tự như sau: (1) nhuộm với dung dịch Wright trong 3 - 5 phút; (2) ngâm trong dung dịch pH 6,2 - 6,8 trong 5 - 6 phút; (3) nhuộm với dung dịch Giemsa trong 20 - 30 phút; (4) ngâm trong dung dịch pH 6,2 trong 15 - 30 phút; và (5) rửa sạch lại bằng nước cất, để mẫu khô tự nhiên và đọc mẫu. Quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính X100. Định loại bạch cầu theo Chinabut và ctv. (1991).

#### Tổng bạch cầu (TBC) (Hrubec và ctv., 2000)

Đếm tổng số hồng cầu và bạch cầu trên 1.500 tế bào trên mẫu nhuộm. Tổng bạch cầu được xác định bằng công thức:  $TBC$  (tb/mm<sup>3</sup>) = (số bạch cầu x mật độ hồng cầu trên buồng đếm)/số hồng cầu trên mẫu.

#### Từng loại bạch cầu (Hrubec và ctv., 2000)

Đếm tổng số bạch cầu bằng 200 tế bào. Mật độ từng loại bạch cầu (tb/mm<sup>3</sup>) = (số lượng mỗi loại BC x mật độ TBC)/200.

### 2.6 Xác định hiệu giá kháng thể

*Thu mẫu máu:* Dùng kim tiêm 1ml châm nhẹ vào phần cuống đuôi để lấy máu từ động mạch chủ ở cột sống (Houston, 1990). Cho máu vào ống eppendorf 1,5 ml và để yên 2 - 3 giờ trong ngăn mát tủ lạnh, sau đó đem ly tâm

6.000 vòng/phút trong 5 phút (Phạm Công Thành, 2010). Rút lấy phần huyết thanh phía trên cho vào ống eppendorf rồi đem xác định hàm lượng kháng thể.

*Chuẩn bị kháng nguyên:* Chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* týp 2 ĐH1nã (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012) được sử dụng để chuẩn bị kháng nguyên. Vi khuẩn sau khi được nuôi tăng sinh được bất hoạt bằng dung dịch formalin (4%) trong 4 giờ. Xác vi khuẩn được rửa sạch formaline bằng nước muối sinh lý và bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh hoặc ở - 20 °C.

*Phản ứng vi ngưng kết kháng nguyên kháng thể:* Phản ứng được thực hiện trong đĩa 96 giếng theo phương pháp của Roberson (1990). 40μl nước muối sinh lý được cho vào các giếng được đánh số từ 2 đến 12. Cho 40 μl huyết thanh vào giếng số 1 và 2. Từ giếng 2 trở đi pha loãng huyết thanh bằng nước muối sinh lý với nồng độ pha loãng bằng 1/2. Cuối cùng cho 40μl huyền dịch xác vi khuẩn vào các giếng rồi trộn đều. Mỗi đĩa 96 giếng có sử dụng một đôi chứng dương và một đôi chứng âm. Để yên 4 - 5 giờ ở nhiệt độ phòng rồi đọc kết quả: dương tính (+) khi đáy giếng tạo thành một lớp ngưng kết trải rộng; âm tính (-) khi đáy giếng chỉ có một chấm nhỏ màu trắng.

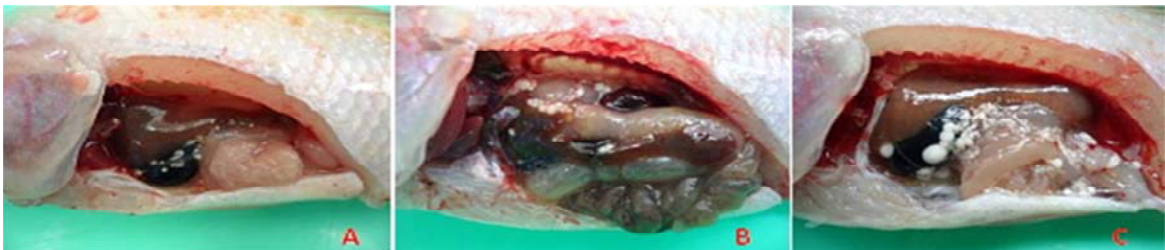
### 2.7 Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel và SPSS.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Tình trạng của cá sau khi tiêm vaccine

Nhìn chung cá khỏe bơi lội nhanh nhẹn, phản ứng nhanh với tiếng động, các vây không bị mòn/rách, trên thân không có vết trầy xước,



**Hình 1:** Nội quan của cá sau khi tiêm vaccine ở các nồng độ khác nhau

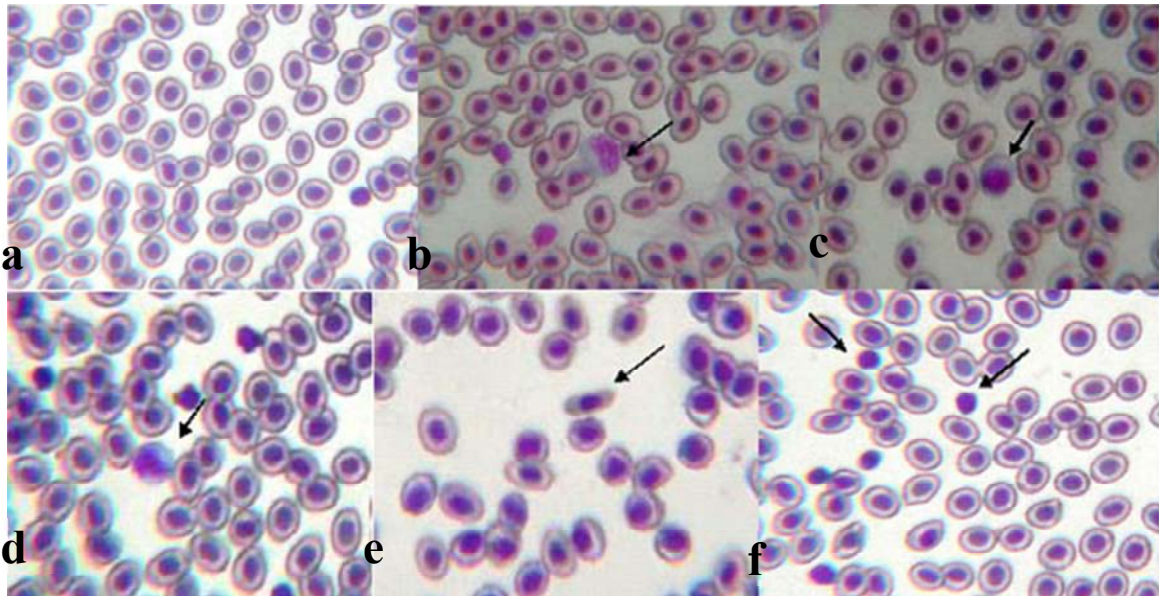
A. 0,05ml/con, B. 0,1ml/con và C. 0,2 ml/con

xuất huyết, mang cá đỏ tươi sáng bóng. Cá sau khi được chủng vaccine có biểu hiện chung là bơi lơ đãng và chìm xuống đáy bể. Khi giải phẫu quan sát trong xoang nội quan thì thấy gan có màu vàng nâu, tỳ tạng, thận và tim có màu đỏ đậm. Cấu trúc các cơ quan rắn chắc, không có biểu hiện sưng to hoặc nhũn, không có dịch và bên trong xoang nội quan có nhiều hạt vaccine (Hình 1).

### 3.2 Sự biến đổi các chỉ tiêu huyết học của cá điều hồng sau khi được chủng vaccine với các nồng độ khác nhau

#### 3.2.1 Hồng cầu

Quan sát dưới kính hiển vi, hồng cầu có



Hình 2: Các dạng tế bào máu cá điều hồng (40X)

(a) tế bào hồng cầu. (b) Bạch cầu đơn nhân. (c) Bạch cầu trung tính có nhân lệch tâm. (d) Bạch cầu trung tính có nhân phân thùy. (e) Tiểu cầu. (f) Tế bào lympho

Sau 4 đợt thu mẫu thì mật độ hồng cầu của cá ở các nghiệm thức tiêm vaccine đều thấp hơn so với cá ở nhóm cá đối chứng (Bảng 1). Mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức thí nghiệm dao động từ  $1,76 \times 10^6$  đến  $2,47 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup> phù hợp với kết quả của Glomski và Pica (2006) khi theo dõi sự biến động số lượng hồng cầu ở cá nước ngọt ( $1- 3,5 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup> (trích dẫn bởi Đỗ Thị Thanh Hương, 2010).

Ở đợt thu mẫu thứ 1 mật độ hồng cầu ở cá tiêm vaccine 0,05ml/con là cao nhất ( $2,29 \times 10^6$

tb/mm<sup>3</sup>), tiếp theo là ở nồng độ 0,1ml/con ( $2,25 \times 10^6$ tb/mm<sup>3</sup>) và thấp nhất là ở nồng độ 0,2 ml/con ( $2,17 \times 10^6$ /mm<sup>3</sup> ). Tuy nhiên, sự khác biệt về mật độ hồng cầu giữa các nghiệm thức tiêm vaccine và nghiệm thức đối chứng không có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ). Mật độ hồng cầu ở các đợt thu mẫu lần thứ 2,3,4 giảm dần. Nghiệm thức tiêm vaccine với nồng độ càng cao thì mật độ hồng cầu càng thấp. Ở các đợt thu mẫu lần 2 và 3 mật độ hồng cầu có giảm nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ) giữa các nghiệm thức và với nghiệm

thức đối chứng. Ở lần thu mẫu thứ 4, mật độ hồng cầu ở nghiệm thức tiêm vaccine 0,2ml/con là thấp nhất  $1,76 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup>, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) so với các nghiệm thức khác nhưng có ý nghĩa thống kê với nghiệm thức đối chứng ( $p < 0,05$ ).

Lượng hồng cầu trong thí nghiệm giảm qua các đợt thu mẫu là do sau khi tiêm vaccine xảy ra hiện tượng cá bỏ ăn hoặc ăn rất ít còn cá ở bể đối chứng vẫn ăn bình thường. Tỷ lệ máu cá biến động theo phương thức sống, trạng thái sinh lý của cơ thể cá và thay đổi theo môi

trường sống. Cá vận động nhiều lượng máu sẽ nhiều hơn cá vận động ít. Tỷ lệ máu gia tăng theo tuổi và giai đoạn thành thực của cá. Cá sống trong điều kiện dinh dưỡng tốt thì lượng máu nhiều hơn so với cá thể cùng loài sống trong điều kiện dinh dưỡng kém (Evans, 1997 trích bởi Đỗ Thị Thanh Hương, 2010). Do điều kiện thí nghiệm, phải thay nước cá hằng ngày và điều kiện dinh dưỡng không ổn định làm cho cá liên tục bị stress. Đây có thể là nguyên nhân chính làm cho lượng hồng cầu bị giảm qua các lần thu mẫu.

**Bảng 1: Mật độ hồng cầu (tế bào x 10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)**

Nghiệm thức	Số mẫu	Mật độ hồng cầu (tế bào x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )			
		Đợt 1	Đợt 2	Đợt 3	Đợt 4
Đối chứng	9	2,39 ± 0,36 <sup>a</sup>	2,47 ± 0,29 <sup>a</sup>	2,39 ± 0,17 <sup>a</sup>	2,40 ± 0,33 <sup>a</sup>
0,05 ml/con	9	2,29 ± 0,56 <sup>a</sup>	2,22 ± 0,60 <sup>a</sup>	2,01 ± 0,76 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,58 <sup>a</sup>
0,1 ml/con	9	2,25 ± 0,26 <sup>a</sup>	2,12 ± 0,50 <sup>a</sup>	2,03 ± 0,59 <sup>a</sup>	1,87 ± 0,52 <sup>a</sup>
0,2 ml/con	9	2,17 ± 0,51 <sup>a</sup>	2,14 ± 0,57 <sup>a</sup>	2,04 ± 0,71 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,19 <sup>b</sup>

Các giá trị trong cùng một cột (a, b) có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ), và ngược lại

### 3.2.2 Bạch cầu

#### Tổng bạch cầu

Qua 4 lần thu mẫu, tổng số lượng bạch cầu của cá ở nghiệm thức tiêm vaccine luôn tăng cao so với cá ở nghiệm thức đối chứng (Bảng 2). Tổng bạch cầu tăng dần qua các đợt thu mẫu 1, 2, 3 nhưng bắt đầu giảm ở đợt 4. Số lượng bạch cầu cũng tăng dần theo nồng độ vaccine tiêm cho cá. Riêng ở nghiệm thức đối chứng tổng bạch cầu tăng lên ở lần thu mẫu thứ 2 và ổn định qua các lần thu tiếp theo. Nghiệm thức tiêm vaccine với nồng độ 0,05ml/con có số lượng tổng bạch cầu cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) ở lần thu mẫu đầu tiên so với nghiệm thức đối chứng, nhưng lại không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) ở các lần thu mẫu tiếp theo. Các nghiệm thức tiêm vaccine ở nồng độ 0,1 ml/con và 0,2 ml/con đều cao hơn nghiệm thức đối chứng (có ý nghĩa thống kê;  $p < 0,05$ ) qua các lần thu mẫu.

Theo Houston (1990), bạch cầu có vai trò thực bào và đáp ứng miễn dịch chống lại các tác nhân lạ xâm nhập vào cơ thể. Sự gia tăng tổng lượng bạch cầu đã chứng tỏ khả năng kích thích gây ra đáp ứng miễn dịch của vaccine đối với cá. Trong cùng môi trường sống, cá được tiêm

vaccine thể hiện khả năng đáp ứng miễn cao hơn so với cá ở nhóm đối chứng. Mật độ tổng bạch cầu chịu tác động bởi hàm lượng đạm trong thức ăn, tuổi, trọng lượng của cá, các nhân tố môi trường, vi khuẩn, tình trạng sinh lý của cá (Trần Thị Bích Như, 2010). Bạch cầu có liên quan đến quá trình điều hòa chức năng miễn dịch, khi sinh vật sống trong môi trường chịu ảnh hưởng của mầm bệnh hay các yếu tố stress thì cơ thể phản ứng lại bằng cách gia tăng số lượng bạch cầu để đáp ứng với stress (Lê Kim Ngọc, 2009). Điều này giải thích cho sự tăng dần của mật độ bạch cầu qua các đợt thu mẫu 1, 2, 3 sau khi tiêm vaccine, nhưng do các nhân tố gây stress kéo dài làm suy giảm hệ thống miễn dịch dẫn đến mật độ bạch cầu giảm ở đợt thu mẫu thứ 4.

#### Bạch cầu đơn nhân

Số lượng bạch cầu đơn nhân (Hình 2b) ở cá tiêm vaccine cao hơn so với cá ở nghiệm thức đối chứng, cá được tiêm nồng độ vaccine cao thì tỷ lệ bạch cầu đơn nhân cao hơn cá được tiêm nồng độ thấp hơn. Số lượng bạch cầu đơn nhân ở nghiệm thức đối chứng qua 4 lần thu mẫu khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Tuy nhiên, số lượng bạch cầu đơn nhân của cá ở các nghiệm thức tiêm vaccine

cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) (ngoại trừ nghiệm thức tiêm vaccine ở nồng độ 0,05 ml/con) so với cá ở nghiệm thức đối chứng ở lần thu mẫu thứ 4.

Bạch cầu đơn nhân là tế bào tham gia vào hệ thống miễn dịch không đặc hiệu với vai trò thực bào, tiêu diệt kháng nguyên và đặc biệt là khả năng

trình diện kháng nguyên và để thực hiện bước khởi đầu của quá trình đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Sau 2 tuần tiêm vaccine thì tỷ lệ bạch cầu đơn nhân tăng cao nhất ở tất cả các nghiệm thức được tiêm vaccine giúp hệ thống miễn dịch nhận biết được kháng nguyên, sản xuất kháng thể chuyên biệt.

**Bảng 2: Mật độ bạch cầu (tế bào x 10<sup>4</sup>/mm<sup>3</sup>)**

Nghiệm thức	Số mẫu	Mật độ bạch cầu (tế bào x 10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )			
		Đợt 1	Đợt 2	Đợt 3	Đợt 4
Đối chứng	9	6,98 ± 3,60 <sup>aA</sup>	13,81 ± 3,92 <sup>aB</sup>	14,21 ± 3,61 <sup>aB</sup>	13,63 ± 2,57 <sup>aB</sup>
0,05ml/con	9	10,86 ± 3,66 <sup>bcA</sup>	15,10 ± 4,08 <sup>bcB</sup>	15,79 ± 4,62 <sup>aB</sup>	14,82 ± 4,34 <sup>aB</sup>
0,1ml/con	9	14,85 ± 2,11 <sup>bdA</sup>	20,84 ± 5,11 <sup>bdB</sup>	22,05 ± 7,14 <sup>bdB</sup>	20,58 ± 7,32 <sup>bcB</sup>
0,2ml/con	9	15,58 ± 2,84 <sup>bcA</sup>	22,55 ± 5,92 <sup>bdBC</sup>	24,16 ± 5,54 <sup>bdBC</sup>	21,98 ± 6,57 <sup>bcAC</sup>

Các giá trị trong cùng một dòng (A, B, C), một cột (a, b, c, d, e) có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ), và ngược lại

*Bạch cầu trung tính*

Mật độ bạch cầu trung tính (Hình 2c và 2d) của các nghiệm thức tiêm vaccine khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) qua các lần thu mẫu ngoại trừ nghiệm thức tiêm 0,05 ml/con trong đợt thu mẫu thứ 4 là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Số lượng bạch cầu trung tính ở nhóm cá đối chứng tăng dần ở các đợt thu mẫu 1, 2 và 3 rồi giảm nhẹ ở đợt thu mẫu thứ 4. Ở nghiệm thức tiêm 0,1 ml/con và 0,2 ml/con, tỷ lệ bạch cầu trung tính khác biệt có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) ở lần thu mẫu đợt 3 và không có ý nghĩa ( $p > 0,05$ ) ở các lần thu mẫu còn lại. Bạch cầu trung tính có vai trò trong phản ứng viêm, ngoài ra cũng có khả năng thực bào trước khi đại thực bào được huy động đến nên bạch cầu trung tính còn gọi là tiểu thực bào. Sự gia tăng về tỉ lệ và số lượng bạch cầu trung tính cho thấy hoạt động của hệ bạch huyết gia tăng để tiêu diệt các vi sinh vật lạ xâm nhập vào cơ thể (Ellis, 1988). Vì thế có thể giải thích rằng sau khi tiêm vaccine, hệ thống miễn dịch không đặc hiệu chịu sự kích thích của vaccine nên gia tăng số lượng bạch cầu trung tính.

*Tiểu cầu*

Giống như những động vật có xương sống khác, tiểu cầu (Hình 2e) đảm nhận vai trò quan trọng trong quá trình đông máu, đặc biệt trong tình trạng viêm nhiễm. Chúng giúp đông máu tại chỗ và tiết ra các chất vận mạch. Ngoài ra

tiểu cầu còn tham gia vào quá trình đáp ứng miễn dịch (Chinabut và ctv., 1991; Houston, 1990). Mật độ tiểu cầu tăng dần qua 3 đợt đầu thu mẫu và tăng cao nhất ở đợt thu mẫu thứ 3 nhưng bắt đầu giảm mạnh ở lần thu mẫu thứ 4 ở tất cả các nghiệm thức tiêm vaccine và đối chứng. Lượng tiểu cầu ở nhóm cá tiêm vaccine ở nồng độ 0,1ml/con và 0,2 ml/con có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) trong lần thu mẫu thứ nhất, còn mật độ tiểu cầu các nghiệm thức trong các đợt thu mẫu tiếp theo điều không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Theo Wedemeyer (1990) số lượng tiểu cầu của cá giảm khi thời gian đồng máu kéo dài và tăng trong trường hợp cá đang ở tình trạng stress mãn tính (Phạm Thanh Hương, 2006).

*Tế bào Lympho*

Mật độ tế bào lympho (Hình 2f) ở tất cả các nghiệm thức tiêm vaccine tăng dần trong 3 đợt đầu thu mẫu và giảm nhẹ ở đợt thu mẫu thứ 4 nhưng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) so với đợt thu mẫu thứ 3. Riêng nghiệm thức đối chứng thì mật độ tế bào lympho ở lần thu mẫu đợt 2 cao hơn có ý nghĩa so với đợt 1 ( $p < 0,05$ ) và ổn định trong các lần thu mẫu tiếp theo. Ở nghiệm thức tiêm vaccine 0,05 ml/cá thì mật độ tế bào lympho cao hơn nghiệm thức đối chứng qua các lần thu mẫu nhưng chỉ có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) ở lần thu mẫu thứ 1. Mật độ tế bào lympho ở các nghiệm thức tiêm vaccine 0,1 ml/con và 0,2 ml/con đều khác biệt

có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức tiêm 0,05 ml/con. Mật độ tế bào lympho ở nghiệm thức tiêm 0,2ml/con cao hơn so với 0,1 ml/con nhưng không có ý nghĩa khác biệt ( $p > 0,05$ ). Ở đợt thu mẫu thứ 4 mật độ tế bào lympho giảm nhẹ do các túi vaccine ở màng treo trong xoang nội quan cũng giảm dần. Nhưng vaccine vẫn tiếp tục tác động lên hệ miễn dịch của cá, giúp cơ thể cá duy trì một lượng tế bào lympho nhất định để sản xuất ra kháng thể chống lại sự xâm nhập của mầm bệnh.

### 3.3 Hiệu giá kháng thể

Hiệu giá kháng thể trung bình của cá ở nghiệm thức đối chứng ở đợt thu mẫu thứ 1 có giá trị bằng 0 và các đợt thu mẫu 2, 3, 4 có giá trị ổn định là  $0,33 \pm 0,58$  nhưng vẫn không có sự khác biệt ý nghĩa ( $p > 0,05$ ) giữa 4 đợt thu mẫu (Bảng 3). Điều này chứng tỏ là hệ thống miễn dịch ở nhóm cá đối chứng chưa được kích thích nên lượng kháng thể ở lần thứ nhất có giá trị bằng 0. Qua các đợt thu mẫu tiếp theo, hiệu giá kháng thể trung bình ở nghiệm thức đối chứng có tăng nhẹ.

**Bảng 3: Hiệu giá kháng thể trung bình giữa các nghiệm thức qua các đợt thu mẫu**

Nghiệm thức	Số mẫu	Hiệu giá kháng thể trung bình			
		Đợt 1	Đợt 2	Đợt 3	Đợt 4
Đối chứng	3	$0,00 \pm 0,58^{aA}$	$0,33 \pm 0,00^{aA}$	$0,33 \pm 0,58^{aA}$	$0,33 \pm 0,58^{aA}$
0,05ml/con	3	$1,00 \pm 0,50^{bA}$	$1,83 \pm 0,29^{bB}$	$2,17 \pm 0,16^{bcB}$	$1,83 \pm 0,58^{bcB}$
0,1ml/con	3	$1,17 \pm 0,29^{bA}$	$2,33 \pm 0,32^{bB}$	$3,00 \pm 0,24^{bB}$	$2,83 \pm 0,52^{bdB}$
0,2ml/con	3	$1,33 \pm 0,30^{bA}$	$2,67 \pm 0,23^{bBC}$	$3,50 \pm 0,50^{bdBD}$	$3,17 \pm 0,29^{bdB}$

Các giá trị trong cùng một dòng (A, B, C), một cột (a, b, c, d, e) có chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ), và ngược lại

Ở các nghiệm thức tiêm vaccine thì hiệu giá kháng thể trung bình tăng dần qua các đợt thu mẫu 1, 2, 3 và đạt cao nhất ở đợt thu mẫu thứ 3 và bắt đầu giảm ở đợt thu mẫu thứ 4 nhưng đều có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng. Nghiệm thức tiêm vaccine 0,05ml/con thì hiệu giá kháng thể trung bình đạt cao nhất  $2,17 \pm 0,16$  ở đợt thu mẫu thứ 3, cao gấp 6,5 lần so với nghiệm thức đối chứng. Nghiệm thức tiêm 0,1ml/con thì hiệu giá kháng thể trung bình đạt cao nhất  $3,00 \pm 0,24$  ở đợt thu mẫu thứ 3, cao gấp 9 lần so với đối chứng và gấp 1,3 lần so với nghiệm thức tiêm 0,05ml/con. Còn ở nghiệm thức tiêm 0,2 ml/con thì hiệu giá kháng thể trung bình cao nhất  $3,50 \pm 0,50$  gấp 10 lần so với nghiệm thức đối chứng, gấp 1,6 lần so với nghiệm thức tiêm 0,05ml/con, gấp 1,2 lần so với nghiệm thức tiêm 0,1ml/con. Kết quả cho thấy hiệu giá kháng thể trung bình tăng tỉ lệ theo nồng độ vaccine sử dụng. Mức độ sản xuất kháng thể trong đáp ứng miễn dịch nguyên phát có quan trọng thuận với liều lượng kháng nguyên đưa vào cơ thể (Bùi Quang Tề, 2004). Tuy nhiên, ở đợt thu mẫu thứ 1 và thứ 2 ở cả 3 nghiệm thức tiêm vaccine có sự chênh lệch hiệu giá kháng thể giữa các nghiệm thức nhưng

không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Ở đợt thu mẫu thứ 3 thì hiệu giá kháng thể trung bình của nghiệm thức tiêm 0,05 ml/con có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức tiêm 0,2 ml/con nhưng không có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức tiêm 0,1 ml/con. Ở đợt thu mẫu thứ 4, hiệu giá kháng thể trung bình ở nghiệm thức tiêm 0,05 ml/con khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức tiêm 0,1 ml/con và 0,2 ml/con còn giữa 2 nghiệm thức này lại khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Thune *et al.* (1997) thử nghiệm vaccine *E. ictaluri* trên cá nheo 12 ngày tuổi và 10 tuần tuổi cho thấy hiệu giá kháng thể ở cá khi chưa tiêm vaccine là 0 và tăng nhanh sau 10 tuần tiêm vaccine. Lượng kháng thể này duy trì ở mức cao trong vòng 8 tuần (hiệu giá kháng thể trung bình từ 7,8 đến 8,0), sau đó giảm xuống ở 4 tuần tiếp theo và dần bằng 0 (trích dẫn bởi Nguyễn Hoàng Nhật Uyên (2011)). So với kết quả thí nghiệm này thì lượng hiệu giá kháng thể trung bình thu được ở nhóm cá ở nghiệm thức đối chứng không tiêm vaccine ở đợt thu mẫu thứ nhất bằng 0 là phù hợp. Nhưng hiệu giá kháng thể trung bình ở các nghiệm thức tiêm vaccine của Thune (1997) lại cao gấp 3,6 lần so với

nghiệm thức tiêm 0,05 ml/con; gấp 2,6 lần so với nghiệm thức tiêm 0,1 ml/con và gấp 2,2 lần so với nghiệm thức tiêm 0,2ml/con. Kết quả nghiên cứu sự biến động kháng thể đặc hiệu bảo vệ cá tra chống lại vi khuẩn *E. ictaluri* trong ao nuôi thâm canh của Nguyễn Hoàng Nhật Uyên (2011) thì hiệu giá kháng thể trung bình ở các ao tiêm vaccine ở tháng thứ nhất đạt  $2,98 \pm 2,07$ .

So với kết quả thu mẫu trong đợt 4 thì hiệu giá kháng thể trung bình ở nghiệm thức tiêm 0,05 ml/con thấp hơn 1,6 lần; nghiệm thức tiêm 0,1ml/con và 0,2 ml/con thì hiệu giá trung bình kháng thể có thấp và cao hơn nhưng không đáng kể. Hàm lượng kháng thể có liên quan đến tình trạng sinh lý, mật độ cao, chế độ dinh dưỡng không ổn định... làm cho vaccine không phát huy tốt hiệu quả. Cũng như các hệ thống sinh lý học khác, hệ thống miễn dịch sẽ bị tổn thương trong điều kiện sức khỏe kém. Điều kiện gây stress ức chế một số khía cạnh của phản ứng miễn dịch (Ellis, 1988). Nếu nhân tố gây stress quá nghiêm trọng hoặc kéo dài, vượt quá khả năng chịu đựng của cá, sẽ phá vỡ hệ thống miễn dịch của cá. Vì vậy, nếu cá chịu tác động của các nhân tố gây bệnh, hoặc sức khỏe kém do chất lượng môi trường xấu thì hiệu quả sử dụng vaccine sẽ bị sụt giảm.

#### 4 KẾT LUẬN

Số lượng tế bào hồng cầu ở cá điêu hồng sau khi tiêm vaccine Aquavac Strep Sa ở các nồng độ 0,05 ml/con, 0,1 ml/con và 0,2 ml/con đều giảm dần sau 4 tuần với so với nghiệm thức đối chứng. Tổng bạch cầu và số lượng các loại bạch cầu ở các nghiệm thức tiêm vaccine tăng dần qua các đợt thu mẫu và giảm nhẹ ở đợt thu mẫu cuối nhưng đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Hiệu giá kháng thể trung bình ở các nghiệm thức tiêm vaccine đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng và đạt giá trị cao nhất trong đợt thu mẫu thứ 3.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Quang Tề, Đỗ Thị Hòa, Nguyễn Hữu Dũng và Nguyễn Thị Muội, 2004. Bệnh học thủy sản, nhà xuất bản Nông Nghiệp, 239 – 240.
2. Chinabut, S., C. Limsuwan, P. Kitsawat, 1991. Histology of The Walking Catfish *Clarias Batrachus*. 96pp.
3. Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012. Phân lập và xác định đặc điểm của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* từ cá điêu hồng (*Oreochromis sp*) bệnh phù mắt và xuất huyết. Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ.
4. Ellis, A. E. 1988. General principles of fish vaccination. In Fish vaccination. A.E. Ellis, editor. Academic Press. San Diego, p. 1-19.
5. Hibiya, T. 1982. An atlas of fish histology. Normal and pathological features. Page 64-71.
6. Houston, H.A., 1990. Blood and circulation. In: C.B. Schreck and P.B. Moyle. Method for biology. American Fish society Bethesda, Maryland, USA. 665: 273-322.
7. Hrubec T. C., J. L. Cardinale and S. A. Smith, 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). Vet Clin Pathol. 29:7-12
8. Natt M. P., Herrick C. A., 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. Poult Sci. 31:735-738.
9. Phạm Thanh Hương, 2006. Xác định một số yếu tố huyết học trên cá tra bệnh vàng da ở tỉnh Cần Thơ. Luận văn tốt nghiệp. Khoa Thủy sản. 54 trang.
10. Phạm Công Thành, 2010 khảo sát đáp ứng miễn dịch cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*. Luận văn cao học Khoa Thủy sản, Đại học Nông Lâm.
11. Nguyễn Hoàng Nhật Uyên, 2011. Sự biến động kháng thể đặc hiệu bảo vệ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) chống lại vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trong ao nuôi thâm canh. LVĐH. Khoa Thủy sản. Đại học Cần Thơ.
12. Thune, R.L., J.P. Hawke, D.H. Ferandez And M.L. Lawrence., 1997. In: R. Gudding, A. Lillehaug, P.J. Midtlyng, F. Brown (Eds), Fish Vaccinology, Dev. Biol. Stand. Karger Basel P. 125-134.
13. Trần Thị Mỹ Hân, 2010. Theo dõi tác động của vaccine phòng bệnh gan thận mù lên các chỉ tiêu huyết học của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Luận văn tốt nghiệp đại học, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.