

TIỀM NĂNG SỬ DỤNG CHŨNG *Edwardsiella ictaluri* ĐỘT BIẾN GEN *wzz* LÀM VACCINE PHÒNG NGỪA BỆNH GAN THẬN MŨ CHO CÁ TRA GIỐNG

Bùi Thị Thanh Tịnh¹, Trần Hạnh Triết¹, Trần Văn Hương¹,
Vũ Thị Thanh Hương¹, Dương Hoa Xô¹, Nguyễn Quốc Bình¹

TÓM TẮT

Bệnh gan thận mũ trên cá Tra (*Pangasionodon hypophthalmus*) do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây ra đã và đang gây nhiều tổn thất lớn cho ngành nuôi và xuất khẩu cá Tra vì tỷ lệ gây chết cá lên đến 60 - 80% và tần suất xuất hiện cao. Sử dụng vaccine là vấn đề cấp bách vì kháng sinh gây kháng thuốc và là rào cản cho xuất khẩu. Tuy nhiên, loại vaccine, phương pháp chủng ngừa và việc sử dụng vaccine vào giai đoạn phát triển nào của cá Tra vẫn đang là vấn đề cần nghiên cứu. Trung tâm Công nghệ sinh học TP. Hồ Chí Minh đã tiến hành các nghiên cứu về chủng *E. ictaluri* đột biến nhược độc có tiềm năng làm vaccine phòng bệnh gan thận mũ và chủng *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* (O- antigen chain length determinant gene) được tạo ra bằng phương pháp knockout gen là chủng cho hiệu quả bảo vệ tốt nhất (Bằng độc quyền sáng chế số 14407 cấp ngày 04/8/2015). Các thử nghiệm ở quy mô phòng thí nghiệm cho thấy, chủng vi khuẩn nhược độc này an toàn cho cá khi ngâm ở mật độ 10^7 CFU ml⁻¹ và có hiệu quả bảo vệ (RPS) khi ngâm một lần ở giai đoạn cá bột là 30% và giai đoạn cá giống là 65%, đồng thời cho RPS cao nhất (94%) khi ngâm hai lần ở giai đoạn cá bột và cá giống. Đây là chủng *E. ictaluri* nhược độc có tiềm năng làm vaccine ngâm để phòng ngừa bệnh gan thận mũ cho cá Tra giống.

Từ khoá: *Edwardsiella ictaluri*, vaccine sống nhược độc, cá Tra (*Pangasionodon hypophthalmus*), bệnh gan thận mũ

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nuôi trồng thủy sản là một ngành kinh tế mũi nhọn của Việt Nam, trong đó nghề nuôi cá Tra đóng góp rất lớn cho kim ngạch xuất khẩu của cả nước. Theo Tổng cục Thủy sản Việt Nam, tổng giá trị xuất khẩu năm 2017 đạt 1,78 tỷ USD, tăng 4,3% so với năm 2016. Tuy nhiên, nghề nuôi cá Tra hiện nay đang gặp khó khăn do chưa kiểm soát được dịch bệnh. Một trong những bệnh gây thiệt hại lớn cho người nuôi phải kể đến là bệnh gan thận mũ, bệnh nhiễm trùng huyết (bệnh đốm đỏ), khi bùng phát có thể gây chết cá từ 60 - 80% (Crumlish *et al.*, 2002). Để đối phó với bệnh, người nông dân sử dụng nhiều loại kháng sinh, tuy nhiên việc sử dụng kháng sinh một cách bừa bãi như hiện nay sẽ gây nhiều tác hại như dư lượng kháng sinh trong sản phẩm, vi khuẩn kháng thuốc và nhiều tác hại tới môi trường. Vì vậy, cùng với sự lớn mạnh của ngành nuôi trồng thủy sản Việt Nam, việc sử dụng vaccine để hạn chế dịch bệnh là vấn đề hết sức cấp thiết.

Các nghiên cứu cho thấy *E. ictaluri* là tác nhân gây bệnh sơ cấp. Vi khuẩn này có thể xâm nhập vào cá theo hai con đường: cơ quan khứu giác (Miyazaki and Plumb, 1985; Waltman *et al.*, 1986) và đường tiêu hóa (Waltman *et al.*, 1986). Đa số các nghiên cứu khác đã xác nhận vi khuẩn *E. ictaluri* là nguyên nhân gây bệnh gan thận mũ ở cá Tra (Hawke *et al.*, 1981; Yuasa *et al.*, 2003; Đồng Thanh Hà và Đỗ Thị Hòa, 2008; Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh

Phương, 2009). Cá có biểu hiện bệnh sau 3 - 4 ngày nhiễm bệnh với tốc độ lây lan nhanh chóng. Trong ao nuôi, cá được phát hiện nhiễm bệnh gan thận mũ chủ yếu từ giai đoạn cá hương (3 tuần tuổi) đến giai đoạn cá giống với tỷ lệ chết rất cao và rải rác đến giai đoạn cá thịt (Tùng Thanh Dung và *ctv.*, 2004). Vì vậy, để giảm thiệt hại do tỷ lệ cá chết cao gây ra, việc xử lý vaccine sớm từ giai đoạn cá bột và tập trung từ giai đoạn cá bột đến giai đoạn cá giống là cần thiết.

Vaccine sống nhược độc là một trong những hướng nghiên cứu đang được sử dụng để ngăn ngừa bệnh gan thận mũ trên cá Tra. Trong đó, knockout gen là phương pháp rất hữu hiệu được sử dụng để bất hoạt các gen độc lực hoặc các gen cần thiết cho quá trình sinh dưỡng của vi khuẩn trong vật chủ. Các chủng này vẫn có thể kích thích hệ thống miễn dịch của vật chủ theo con đường gây bệnh của chủng hoang dại nhưng độc lực không đủ mạnh để gây chết vật chủ. Theo Bastin và cộng tác viên (1993), gen *wzz* điều hòa sự hình thành chiều dài đặc trưng của chuỗi O antigen. Các nghiên cứu khác cho thấy chủng đột biến gen *wzz* ở các loài vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* có độc lực thấp hơn so với chủng hoang dại (Burrows *et al.*, 1997; Najdenski *et al.*, 2003). Dựa trên những nghiên cứu này, chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* nhược độc (WzM) an toàn cho cá và có hiệu quả bảo vệ cao ở quy mô phòng thí nghiệm (> 60%) đã được tạo ra và được cấp bằng độc quyền sáng

¹ Phòng Công nghệ Sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh

chế (số 14407 cấp ngày 04/8/2015). Đây là chủng *E. ictaluri* nhược độc có tiềm năng làm vaccine ngậm cho cá Tra.

Trong nghiên cứu này, chủng *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* (WzM) được dùng để ngậm cá từ giai đoạn cá bột đến giai đoạn cá giống nhằm tìm ra phương thức xử lý chủng nhược độc thích hợp trên cá Tra để phòng bệnh gan thận mũ và từ đó có thể ứng dụng ở quy mô đồng ruộng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* hoang dại 5H: được phân lập từ mẫu cá bệnh tại huyện Côn Tròn, tỉnh Tiền Giang vào năm 2015.

- Chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* đột biến gen *wzz* (WzM): được tạo ra từ chủng *E. ictaluri* được phân lập tại tỉnh An Giang và được cấp Bằng độc quyền sáng chế (số 14407 cấp ngày 04/8/2015).

- Cá thí nghiệm: Cá bột được mua từ các trại sản xuất cá Tra giống được nuôi trong bể composite 500 lít tại phòng thí nghiệm Trung tâm Công nghệ sinh học TP. Hồ Chí Minh và tiếp tục nuôi lên thành cá Tra giống 2,5 tháng tuổi để sử dụng cho các thí nghiệm.

- Cặp môi đặc hiệu cho chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* với sản phẩm khuếch đại 191 bp có trình tự F2SerC: 5'-TCTGGTTCTGGCCGAATATGGACTC - 3' và R2A serC: 5'-CGTAATCAAACCAACACCGGGTATT - 3'.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị cá thí nghiệm

Cá bột mua từ các trại sản xuất cá Tra giống được nuôi trong bể composite 500 lít tại phòng thí nghiệm Trung tâm Công nghệ sinh học TP. HCM. Ở giai đoạn cá bột, cá được cho ăn moina, artemia. Giai đoạn 16 - 20 ngày tuổi, cá sử dụng thức ăn là trùn chỉ. Đến giai đoạn 21 - 45 ngày tuổi cho cá ăn thức ăn công nghiệp 30 độ đạm xay nhỏ để vừa với cỡ miệng cá. Thường xuyên xi phông bể nhằm loại trừ thức ăn thừa để tránh tình trạng ô nhiễm môi trường nước. Trong quá trình nuôi định kỳ 1 - 2 ngày thay nước một lần (mỗi lần thay từ 30% - 40% lượng nước) ở tất cả các bể. Các bể nuôi được bố trí hệ thống sục khí hoạt động 24/24 giờ. Cá 2,5 tháng tuổi được dùng cho các thử nghiệm. Trước khi thử nghiệm, cá được kiểm tra ngẫu nhiên bằng cách mổ quan sát bệnh tích và xác định không nhiễm *E. ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* bằng cách cấy

trải mẫu gan và thận trên môi trường thạch brain heart infusion (BHI), ủ ở 28°C/48 h. Các khuẩn lạc mọc trên môi trường được kiểm tra bằng quan sát hình thái và PCR với cặp môi đặc hiệu cho chủng *E. ictaluri* và *Aeromonas hydrophila*.

Phản ứng PCR với thể tích 25µl gồm các thành phần như: 12,5µl DreamTaq Master mix 2X; 0,5µl mỗi xuôi 0,2mM và mỗi ngược 0,2mM; 1µl DNA của vi khuẩn; 10,5µl nước vô trùng. Chu trình nhiệt phản ứng PCR: 95°C - 5 phút, 30 chu kỳ (95°C - 30 giây, 54°C - 30 giây, 72°C - 30 giây), 72°C - 10 phút, giữ sản phẩm ở 4°C.

2.2.2. Chuẩn bị chủng vi khuẩn *E. ictaluri* hoang dại và đột biến

Để chuẩn bị dịch vi khuẩn trước khi thử nghiệm, lấy một ống giống được giữ ở -80°C tăng sinh trong 5 mL môi trường brain heart infusion (BHI) lỏng có bổ sung kháng sinh colistin (20 µg mL⁻¹), nuôi cấy qua đêm ở điều kiện lắc 250 vòng/phút ở 28°C, trong 24 giờ. Sau đó, 1 mL dịch nuôi cấy được cấy chuyển vào 100 mL BHI lỏng có bổ sung kháng sinh colistin (20 µg mL⁻¹) và nuôi cấy 250 vòng/phút ở 28°C. Dịch nuôi cấy được ly tâm ở 2000 × g/20 phút ở 4°C để loại bỏ dịch nổi thu sinh khối, sau đó sinh khối được huyền phù và pha loãng đến OD₆₀₀ ~ 1,0 đối với chủng hoang dại và OD₆₀₀ ~ 1,3 đối với chủng đột biến (tương đương với mật độ 10⁹ CFU mL⁻¹) bằng dung dịch NaCl 0,65 % theo Thune và cộng tác viên (1999). Mật độ vi khuẩn được kiểm tra bằng cách cấy trải trên môi trường *Edwardsiella ictaluri* medium (EIM) có bổ sung kháng sinh colistin (20 µg mL⁻¹).

2.2.3. Xác định LD₅₀ của chủng *Edwardsiella ictaluri* 5H hoang dại

Trước khi tiến hành đánh giá hiệu quả bảo vệ của chủng đột biến WzM trên cá giống, liều gây chết 50% (LD₅₀) của chủng hoang dại cần được xác định để dùng cho các thí nghiệm công độc tiếp theo. Cá giống khoảng 2,5 tháng tuổi được bố trí vào các bể composite 60 lít, mỗi bể 15 cá. Cá được ngậm với chủng hoang dại 5H ở các nồng độ 1,1 × 10⁵, 1,1 × 10⁶, 1,1 × 10⁷ CFU mL⁻¹ trong vòng 30 phút, ở nhiệt độ 24 - 26°C. Cá ngậm với dung dịch NaCl 0,65% được dùng làm đối chứng âm. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Sau thời gian ngậm, cá được chuyển vào bể nuôi 60L và theo dõi trong vòng 14 ngày. Số lượng cá chết và biểu hiện của triệu chứng bệnh tích được ghi nhận hàng ngày. Mẫu cá chết trong thử nghiệm được mổ lấy gan và thận, dịch gan thận được trải trên môi trường BHI, ủ ở 28°C/48h. Các khuẩn lạc mọc được kiểm tra bằng PCR với cặp môi đặc hiệu F2SerC/R2SerC cho kích thước 191bp.

Xác định LD₅₀ của chủng vi khuẩn *E. ictaluri* 5H hoang dại theo công thức Reed và Muench (1938): $LD_{50} = 10^{(a+x)}$ Trong đó: 10^a là nồng độ tại đó gây chết 50% số cá gây nhiễm; $x = (Pa - 50)/(Pa - Pu)$; Pa, Pu: là tỷ lệ cận trên và cận dưới của nồng độ gây chết 50%.

2.2.4. Hiệu quả bảo vệ của chủng đột biến WzM

Chủng đột biến WzM an toàn cho cá và cho hiệu quả bảo vệ tốt nhất trong các chủng đột biến nhược độc (bằng độc quyền sáng chế số 14407 cấp ngày 04/8/2015). Vì vậy, hiệu quả bảo vệ của chủng đột biến WzM trên cá Tra giống được khảo sát bằng phương pháp ngâm lần 1 ở giai đoạn cá bột và ngâm lần 2 ở giai đoạn cá giống và sau đó cá được công độc với chủng hoang dại 5H (Bảng 1).

Bảng 1. Các nghiệm thức khảo sát hiệu quả bảo vệ của chủng đột biến WzM sau khi công độc cá Tra với chủng hoang dại 5H

Nghiệm thức	Mật độ chủng đột biến WzM (CFU mL ⁻¹) dùng để ngâm cá Tra		Mật độ chủng hoang dại 5H (CFU mL ⁻¹) dùng để công độc cá Tra giống
	Giai đoạn cá bột	Giai đoạn cá giống	
NT1	1,2 × 10 ⁷	1,5 × 10 ⁷	LD ₅₀
NT2	1,2 × 10 ⁷	không ngâm	LD ₅₀
NT3	không ngâm	1,5 × 10 ⁷	LD ₅₀
NT4	không ngâm	không ngâm	LD ₅₀
NT5	không ngâm	không ngâm	không ngâm

Cá bột (3000 con/bể) sau khi nở khoảng 4 giờ vẫn còn noãn hoàn được ngâm với chủng đột biến WzM ở nồng độ 1,2 × 10⁷ CFU mL⁻¹ trong vòng 30 phút ở nhiệt độ 24 - 26°C và có sục khí trong bể 15L. Sau thời gian ngâm, cá bột được chuyển vào bể composite 500 lít để nuôi đến giai đoạn cá hương 21 ngày tuổi. Tỷ lệ sống của cá Tra bột lên cá hương ở tất cả các nghiệm thức được ghi nhận.

Cá hương được tiếp tục nuôi thành cá giống 2,5 tháng tuổi trong các bể composite 500 lít. Sau đó, cá được chuyển sang các bể composite 60 lít (30 con/bể) để thuần dưỡng trong vòng 1 tuần và tiến hành ngâm với chủng đột biến WzM lần 2 với mật độ 1,5 × 10⁷ CFU mL⁻¹ trong vòng 30 phút ở nhiệt độ 24 - 26°C và có sục khí trong bể 15L. Sau khi ngâm, cá giống được chuyển vào bể 60 lít và theo dõi trong 14 ngày. Số cá chết và các biểu hiện triệu chứng bệnh gan thận mũ được ghi nhận hàng ngày.

Sau 21 ngày kể từ khi cá giống được ngâm với chủng đột biến WzM, cá giống được ngâm với chủng hoang dại 5H ở mật độ LD₅₀ (Bảng 1) trong vòng 30 phút ở nhiệt độ 24 - 26°C. Sau khi ngâm,

cá được chuyển trở lại bể 60 lít và theo dõi trong 14 ngày. Số cá chết và các biểu hiện triệu chứng bệnh gan thận mũ được ghi nhận hàng ngày. Mẫu cá chết trong thử nghiệm được mổ lấy gan và thận, dịch gan thận được trải trên môi trường BHI, ủ ở 28°C/48h. Các khuẩn lạc mọc được kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu F2SerC/R2SerC cho kích thước 191bp.

Hiệu quả bảo vệ được xác định thông qua tỷ lệ sống tương đối RPS (Relative percentage survival) theo công thức Amend (1981):

$$RPS (\%) = [1 - \text{tỷ lệ cá chết do chủng thử nghiệm} / \text{tỷ lệ cá chết ở nghiệm thức đối chứng}] \times 100.$$

2.2.5. Phân tích thống kê

Tất cả các số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) với phân tích ANOVA một yếu tố, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được xác định thông qua giá trị p < 0,05.

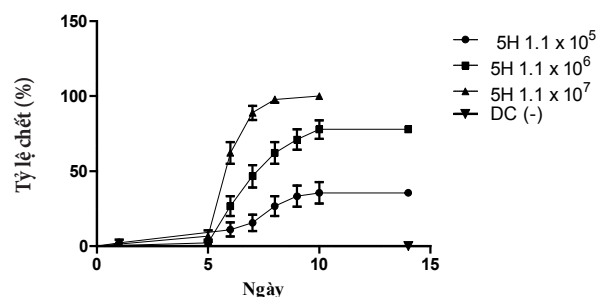
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Tất cả các nội dung được thực hiện từ tháng 6/2017 đến tháng 10/2017 tại khu thử nghiệm, Phòng Công nghệ sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ sinh học TP. Hồ Chí Minh.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Giá trị LD₅₀ của chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* 5H hoang dại

Trong thử nghiệm xác định LD₅₀ của chủng vi khuẩn *E. ictaluri* 5H bằng phương pháp ngâm trên cá Tra, tỷ lệ cá chết sau khi ngâm với chủng 5H ở các nồng độ 1,1 × 10⁵, 1,1 × 10⁶, 1,1 × 10⁷ CFU mL⁻¹ lần lượt là 36% (± 7,77), 78% (± 3,85), 100% (± 0,00); trong khi đó, không có cá chết ở nghiệm thức đối chứng âm (Hình 1) (p < 0,05). Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc phân lập từ mẫu cá chết đều có kích thước 191 bp, phù hợp với kích thước đặc trưng của *E. ictaluri* (Hình 2). Từ đó, giá trị LD₅₀ của chủng hoang dại 5H được xác định là 5 × 10⁵ CFU mL⁻¹.



Hình 1. Tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày sau khi công độc cá Tra 2 - 3 tháng tuổi với chủng *E. ictaluri* 5H bằng phương pháp ngâm

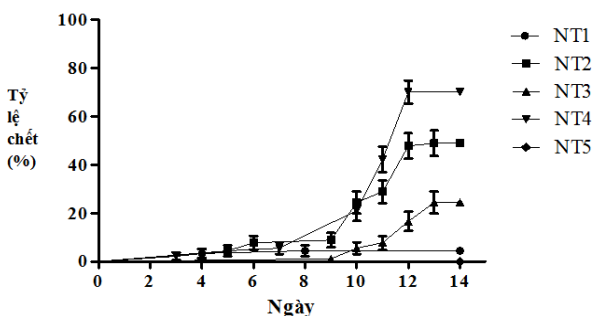


Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc phân lập từ cá chết

Ghi chú: Giếng 1 - 3: Mẫu cá chết sau khi ngâm *E. ictaluri* hoang dại nồng độ 10^5 CFU mL^{-1} ; Giếng 4 - 6: Mẫu cá chết sau khi ngâm *E. ictaluri* hoang dại nồng độ 10^6 CFU mL^{-1} ; Giếng 7 - 9: Mẫu cá chết sau khi ngâm *E. ictaluri* hoang dại nồng độ 10^6 CFU mL^{-1} ; 10. Chứng (+); 11. Chứng (-); M. Thang DNA 100 bp.

3.2. Hiệu quả bảo vệ của chủng đột biến WzM

Trong thử nghiệm ngâm cá với chủng đột biến WzM lần 1 ở giai đoạn cá bột, sau 21 ngày theo dõi, tỷ lệ cá sống ở các nghiệm thức tương đương nhau được trình bày ở Bảng 2 ($p > 0,05$). Kết quả này cho thấy chủng WzM không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của cá bột trong quá trình ương nuôi lên giai đoạn cá hương trong bể composite. Tương tự, trong thử nghiệm ngâm cá với chủng WzM lần 2 ở giai đoạn cá giống, sau 14 ngày theo dõi, không có cá chết nào được ghi nhận ở tất cả các nghiệm thức. Điều này chứng tỏ, chủng WzM ở mật độ $1,5 \times 10^7$ CFU mL^{-1} hoàn toàn an toàn với cá sau khi ngâm.

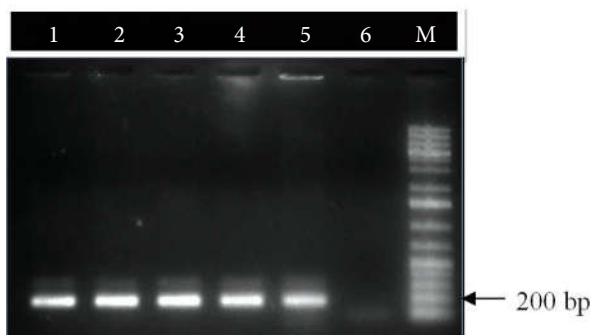


Hình 3. Tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày sau khi công độc với chủng *E. ictaluri* 5H hoang dại bằng phương pháp ngâm ở nhóm cá Tra đã được ngâm với chủng đột biến WzM trước đó và nhóm cá đối chứng



Hình 4. Cá có biểu hiện bệnh gan thận mù sau khi công độc với chủng *E. ictaluri* hoang dại

Sau 14 ngày kể từ khi công độc với chủng hoang dại 5H ở mật độ LD_{50} , tỷ lệ cá chết ở tất cả các nghiệm thức được trình bày ở bảng 2. Chủng đột biến WzM khi ngâm với cá ở cả hai giai đoạn cá bột và cá giống (NT1) cho hiệu quả bảo vệ cao nhất với RPS là 94%, trong khi chỉ ngâm ở từng giai đoạn (cá bột - NT2 hoặc cá giống - NT3) thì hiệu quả bảo vệ đạt được thấp hơn, lần lượt là 30% và 65%. Kết quả này cho thấy chủng WzM đều cho hiệu quả bảo vệ cá giống trước sự xâm nhiễm của chủng *E. ictaluri* hoang dại kể cả khi ngâm cá ở từng giai đoạn phát triển của cá (cá bột hoặc cá giống) hay cả hai giai đoạn. Tuy nhiên, để đạt được hiệu quả phòng ngừa bệnh gan thận mù tốt nhất, cá Tra nên được ngâm với chủng đột biến WzM ở giai đoạn cá bột và ngâm nhắc lại ở giai đoạn cá giống. Cá chết được mổ và quan sát gan, thận có biểu hiện bệnh lý đặc trưng của *E. ictaluri*: gan có xuất hiện đốm trắng (Hình 4). Kết quả điện di các sản phẩm PCR các khuẩn lạc từ 5 mẫu cá chết đều cho kích thước 191bp, phù hợp kích thước đặc trưng của *E. ictaluri* hoang dại (Hình 5).



Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc phân lập từ cá chết

Giếng 1 - 4. Mẫu cá chết sau khi công độc với chủng *E. ictaluri* hoang dại; 5. Chứng (+); 6. Chứng (-); M. Thang DNA 100bp

Bảng 2. Tỷ lệ sống của cá bột và tỷ lệ cá chết và hiệu quả bảo vệ của chủng đột biến WzM trên cá Tra giống ở các nghiệm thức sau khi công độc với chủng *E. ictaluri* 5H bằng phương pháp ngâm

Nghiệm thức	Tỷ lệ sống (%) của cá bột \pm SD	Tỷ lệ cá chết (%) của cá giống \pm SD	RPS (%)
NT1	27,33 \pm 2,517	4 \pm 5,13	94
NT2	27,33 \pm 5,686	49 \pm 9,81	30
NT3	28,00 \pm 3,606	24 \pm 16,29	65
NT4	27,67 \pm 4,726	70 \pm 14,80	-
NT5	26,00 \pm 3,606	0	-

Hiệu quả bảo vệ của chủng đột biến WzM khi ngâm với cá Tra ở từng giai đoạn phát triển của cá (cá bột hoặc cá giống) trong nghiên cứu này tương tự như kết quả thu được từ nghiên cứu của nhóm tác giả Klesius và Shoemaker (1999). Trong nghiên cứu của nhóm tác giả này, chủng *E. ictaluri* nhược độc kháng rifampicin (RE-33, US patent No. 6019981) được sử dụng làm vaccine sống nhược độc với tên gọi thương mại AQUAVAC - ESC™ cho cá hồi nước lạnh tại Mỹ với hiệu quả bảo vệ 64,6%. Ngoài ra, nhóm nghiên cứu này còn sử dụng chủng RE-33 trên cá nheo 7 ngày tuổi và ghi nhận hiệu quả bảo vệ từ 58,7 đến 77,5 % (Shoemaker *et al.*, 1999).

Trong khi đó, hiệu quả bảo vệ của chủng đột biến WzM khi ngâm với cá Tra ở giai đoạn cá bột và nhắc lại ở giai đoạn cá giống trong nghiên cứu này tương tự với kết quả nghiên cứu của Plumb và cộng tác viên (1995). Nhóm tác giả này đã sử dụng chủng *E. ictaluri* bất hoạt bằng formalin trên cá Tra con bằng phương pháp ngâm hoặc cho ăn với các nghiệm thức như ngâm một lần, ngâm hai lần, ngâm và kết hợp cho ăn. Tỷ lệ sống ở các nghiệm thức này lần lượt là 56,7%, 64,2% và 68,8%; trong khi tỷ lệ sống của lô đối chứng là 43,6%. Tương tự, Thune và cộng tác viên (1999) đã khảo sát hiệu quả bảo vệ của chủng *E. ictaluri* đột biến gen *aroA* trên cá nheo khoảng 8 tháng tuổi, trọng lượng trung bình 9,8 g bằng phương pháp ngâm với các mật độ $2,7 \times 10^7$ CFU mL⁻¹ và $2,7 \times 10^8$ CFU mL⁻¹. Sau 4 tuần, cá được ngâm nhắc lại với chủng đột biến ở mật độ giống lần đầu. Và sau 4 tuần tiếp theo, cá được ngâm công độc với chủng hoang dại ở mật độ $4,5 \times 10^7$ CFU mL⁻¹. Kết quả thu được cho thấy cá thử nghiệm có tỷ lệ sống 54,1 - 63,8 % khi ngâm một lần và 77,3 - 94,4 % khi ngâm nhắc lại lần hai với chủng đột biến. Từ đó, nhóm tác giả đã đưa ra kết luận rằng việc ngâm nhắc lại lần 2 giúp tăng đáng kể hiệu quả bảo vệ của chủng đột biến trên cá nheo đối với dịch bệnh do *E. ictaluri* gây ra.

IV. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn *E. ictaluri* đột biến gen *wzz* (WzM) khi được sử dụng ở nồng độ 10^7 CFU mL⁻¹ để ngâm cá Tra trong vòng 30 phút ở giai đoạn cá bột và ngâm nhắc lại lần hai ở giai đoạn cá giống hoàn toàn an toàn cho cá và cho hiệu quả bảo vệ cao (94%). Kết quả này chứng tỏ chủng đột biến WzM hoàn toàn có tiềm năng làm vaccine giúp phòng bệnh gan thận mù cho cá Tra xuyên suốt các giai đoạn phát triển của cá.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Từ Thanh Dung, M. Crumlish, Nguyễn Thị Như Ngọc, Nguyễn Quốc Thịnh và Đặng Thụy Mai Thy, 2004. Xác định vi khuẩn gây bệnh trắng gan trên cá tra. *Tạp chí Khoa học - Đại học Cần Thơ, chuyên ngành Thủy sản*. 137-143.
- Đồng Thanh Hà và Đỗ Thị Hòa, 2008. Nghiên cứu xác định tác nhân gây bệnh “mù ở gan thận” trên cá Tra (*Pangasius hypophthalmus*) nuôi tại Bến Tre. *Kỷ yếu hội nghị sinh viên NCKH 2008-2009*. Đại học Nha Trang: 1-9.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2009. Độc lực của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phân lập từ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bệnh mù gan. *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, 12: 64 - 69.
- Amend, D.F, 1981. Potency Testing of Fish Vaccines. *Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines*, 49: 447 - 454.
- Bastin, D.A, Stevenson, G., Brown, P.K., Haase, A., and Reeves, P.R., 1993. Repeat unit polysaccharides of bacteria: a model for polymerization resembling that of ribosomes and fatty acid synthetase, with a novel mechanism for determining chain length. *Mol Microbiol* 7:725-734.
- Burrows, L.L., Chow, D., and Lam, J.S., 1997. *Pseudomonas aeruginosa* B-band O-antigen chain length is modulated by Wzz (Rol). *J Bacteriol*, 179:1482-1489.
- Crumlish, M., Dung, T.T., Turnbull, J.F., Ngoc, N.T.N., and Ferguson, H.W., 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish *Pangasius hypophthalmus* cultured in Mekong delta, Viet Nam. *Journal of fish diseases* 2002, 25: 733-736
- Hawke, J.P., Mcwhorter, A.C., Steigerwalt, A.G., & Brenners, D.J, 1981. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the Causative Agent of Enteric Septicemia of Catfish. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31 (4): 396 - 400.
- Klesius, P.H., & Shoemaker, C. A, 1999. Development and use of modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine against enteric septicemia of catfish. *Advances in veterinary medicine*, 41: 523 - 37.
- Miyazaki, T., and Plumb, J.A., 1985. Histopathology of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases*, 8 (4): 389-392.
- Najdenski, H., Golkocheva, E., Vesselinova, A., Bengoechea, J.A., and Skurnik, M., 2003. Proper expression of the O-antigen of lipopolysaccharide is essential for the virulence of *Yersinia enterocolitica* O:8 in experimental oral infection of rabbits. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 38 (2): 97-106.

- Plumb, J. A., Vinitnantharat, S., Paterson, W. D., Salenius, K., A.F.S.F.H.S.**, 1995. Prevention of enteric septicemia in catfish by vaccination. *Diseases in Asia Aquaculture*, 2: 399 - 404.
- Reed, L.J., & H. Muench**, 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Journal of Epidemiology*, 27 (3): 493 - 497.
- Shoemaker C, Klesius P, Bricker J**, 1999. Efficacy of a modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine in channel catfish as young as seven days post hatch. *Aquaculture* 176(3):189 - 193.
- Thune, R.L., Fernandez, D.H., & Battista, J.R.**, 1999. An *aroA* Mutant of *Edwardsiella ictaluri* Is Safe and Efficacious as a Live, Attenuated Vaccine. *Journal of Aquatic Animal Health* 11(4):358–372.
- Waltman, W.D., Shotts, E.B., & Hsu, T.C.**, 1986. Biochemical characteristics of *Edwardsiella ictaluri*. *Applied and environmental microbiology*, 51(1): 101 - 4.
- Yuasa, K., Kholidin, E.B., Panigoro, N., & Hatai, K.**, 2003. First Isolation of *Edwardsiella ictaluri* from Cultured Striped Catfish *Pangasius hypophthalmus* in Indonesia. *Fish Pathology*, 38 (4): 181-183.

***Edwardsiella ictaluri* wzz mutant as a potential vaccine for preventing bacillary necrosis on catfish (*Pangasionodon hypophthalmus*)**

Bui Thi Thanh Tinh, Tran Hanh Triet, Tran Van Huong,
Vu Thi Thanh Huong, Duong Hoa Xo, Nguyen Quoc Binh

Abstract

Bacillary necrosis on catfish (*P. phthalmus*) infected by *Edwardsiella ictaluri* causes major economic losses because of high mortality rates (60 - 80 %) and occur at high frequency. Vaccination is an urgent issue as use of antibiotic leads to drug resistance and hinders export. However, the type of the vaccine as well as the mode of vaccination, stage of fish development to vaccinate is the problems to resolve. Biotechnology Center of Ho Chi Minh conducted studies on live attenuated *Edwardsiella ictaluri* strains against bacillary necrosis and found the *Edwardsiella ictaluri* wzz mutant (O-antigen chain length determinant gene) was created by knockout gene method which gave the best results. Laboratory-scale experiments showed that this strain was safe and had efficacious in Tra catfish by one time immersion at fried stage and 2.5-month-old Tra catfish with relative percent survival were 30% and 65%, respectively, while it was 95% for the twice immersion fish at fried stage and 2.5-month-old Tra catfish. This is an attenuated *Edwardsiella ictaluri* strains have potentials used as immersion vaccine for Tra catfish.

Keywords: *Edwardsiella ictaluri*, modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine, Tra catfish (*Pangasionodon hypophthalmus*), Bacillary necrosis

Ngày nhận bài: 2/6/2018
Ngày phản biện: 20/6/2018

Người phản biện: PGS.TS. Phạm Minh Đức
Ngày duyệt đăng: 16/7/2018

TẠO CHỦNG *VIBRIO HARVEYI* ĐỘT BIẾN GEN WZZ CÓ KHẢ NĂNG BIỂU HIỆN PROTEIN VỎ VP28 CỦA VI RÚT GÂY BỆNH ĐỐM TRẮNG WSSV (WHITE SPOT SYNDROME VIRUS) TRÊN TÔM

Mai Thu Thảo¹, Trần Phạm Vũ Linh¹, Ngô Huỳnh Phương Thảo¹,
Lâm Võ Nguyên¹, Nguyễn Quốc Bình¹

TÓM TẮT

Trên thế giới đã có nhiều cách tiếp cận để phát triển các chế phẩm ngăn ngừa bệnh đốm trắng ở tôm. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tiếp cận bằng cách gây đột biến gen trên chủng *Vibrio harveyi* gây bệnh phát sáng trên tôm và biểu hiện protein vỏ VP28 của vi rút gây bệnh đốm trắng trên chủng này. Cassette HKT_{wzz} (ΔHKT_{wzz}) gồm trình tự H_{wzz} (phần đầu gen *wzz*); K (trình tự gen kháng Kanamycin), T_{wzz} (phần cuối gen *wzz*) được tạo ra bằng PCR overlap. Sau đó, trình tự Ptac-VP28 được chèn vào ΔHKT_{wzz} nhờ vào vị trí enzyme *NdeI* nằm trên cassette. ΔHKT_{wzz} có gắn Ptac-VP28 được chèn vào pGP704 và tạo dòng trong *E. coli* SM10λpir. Chủng đột biến được tạo ra bằng phương pháp tiếp hợp giữa chủng cho là *E. coli* SM10λpir::pGP704::ΔHKT_{wzz}::Ptac-VP28 và chủng nhận *Vibrio harveyi* hoang dại BL1 (được thu nhận từ ao tôm bệnh ở Bạc Liêu) dựa trên cơ chế tái tổ hợp tương đồng trên vùng trình tự H_{wzz} và T_{wzz}. Các kết quả kiểm tra biểu hiện bằng phương pháp SDS-PAGE và Western Blot cho thấy chủng đột biến có khả năng biểu hiện protein vỏ VP28.

Từ khóa: Knock-out gen, pGP704, SM10λpir, tiếp hợp, tái tổ hợp tương đồng

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh