

Evaluation of the protective efficacy of inactivated vaccines from wild-type *Streptococcus agalactiae* (GBS) on red Tilapia (*Oreochromis* sp.)

Hau V. Le¹, Mai T. Tran², Co V. Trinh³, Hieu C. N. Bui¹, & Thao P. H. Ngo¹

¹Department of Aquacultural Biotechnology, Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Faculty of Applied Sciences, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: April 25, 2023

Revised: August 10, 2023

Accepted: September 06, 2023

Keywords

Haemorrhagic disease

Inactivated vaccine

Oreochromis sp.

Red tilapia

Streptococcus agalactiae

Corresponding author

Le Van Hau

Email:

lvhau.snn@tphcm.gov.vn

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae causing eye edema and haemorrhagic disease on red tilapia is a serious problem for the aquaculture industry. The experiment was conducted to evaluate the protective efficacy of formalin-inactivated *S. agalactiae* AG5 (Group B *Streptococcus*, GBS) vaccine on red tilapia (*Oreochromis* sp.) by feeding method. The experiment was arranged in a completely randomized design and fish were fed vaccine-mixed feeds with different concentrations of 10^4 ; 10^5 ; 10^6 ; 10^7 ; 10^8 CFU/g of feed, respectively. At 3 weeks after being fed vaccines, fish were infected with wild-type *S. agalactiae* AG5 strain by injecting 100 μ L of medium containing a dose of $LD_{50} = 6.87 \times 10^3$ CFU/mL into the abdomen. The effectiveness of relative percentage survival (RPS) protection was determined within 1 week after infection. Samples of dead fish were recorded with symptoms and brain samples were cultured on TSA medium and incubated at 28°C for 24 h. The colonies were examined using PCR test with F1/IMOD-specific primer pairs. The results showed that the inactivated *S. agalactiae* AG5 (GBS) vaccine had the highest protective effect on red tilapia of 50% at the vaccine dose of 10^7 CFU/g of feed. The study also showed that red tilapia had an immune response with the mean antibody titers in the vaccine treatments, ranging from 2.24 ± 0.20 to 3.59 ± 0.42 ($P < 0.05$).

Cited as: Le, H. V., Tran, M. T., Trinh, C. V., Bui, H. C. N., & Ngo, T. P. H. (2024). Evaluation of the protective efficacy of inactivated vaccines from wild-type *Streptococcus agalactiae* (GBS) on red Tilapia (*Oreochromis* sp.). *The Journal of Agriculture and Development* 23(1), 25-39.

Đánh giá hiệu quả bảo vệ của vắc-xin bất hoạt từ *Streptococcus agalactiae* (GBS) hoang dại trên cá rô phi đỏ (*Oreochromis* sp.)

Lê Văn Hậu^{1*}, Trần Thị Mai², Trịnh Văn Có³, Bùi Nguyễn Chí Hiếu¹ & Ngô Huỳnh Phương Thảo¹

¹Phòng Công Nghệ Sinh Học Thủy Sản, Trung Tâm Công Nghệ Sinh Học TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

²Khoa Khoa Học Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

³Khoa Khoa Học Ứng Dụng, Trường Đại Học Tôn Đức Thắng, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 25/04/2023

Ngày chỉnh sửa: 10/08/2023

Ngày chấp nhận: 06/09/2023

Từ khóa

Bệnh phù mắt xuất huyết

Cá rô phi đỏ

Oreochromis sp.

Streptococcus agalactiae

Vắc-xin bất hoạt

Tác giả liên hệ

Lê Văn Hậu

Email:

lvhau.snn@tphcm.gov.vn

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh phù mắt, xuất huyết trên cá rô phi đỏ đang là vấn đề gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành nuôi trồng thủy sản. Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả bảo vệ của vắc-xin *S. agalactiae* AG5 (thuộc nhóm B, GBS) bất hoạt bằng formol trên cá rô phi đỏ (*Oreochromis* sp.) bằng phương pháp cho ăn. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên và cá được cho ăn thức ăn đã trộn vắc-xin với nồng độ lần lượt là 10^4 ; 10^5 ; 10^6 ; 10^7 ; 10^8 CFU/g. Sau 3 tuần, tiến hành cảm nhiễm với chủng *S. agalactiae* AG5 bằng phương pháp tiêm $100 \mu\text{L}$ vào ổ bụng theo liều $\text{LD}_{50} = 6,87 \times 10^3$ CFU/mL, theo dõi trong 1 tuần sau cảm nhiễm để xác định hiệu quả bảo vệ RPS. Mẫu cá chết được ghi nhận triệu chứng và cấy ria mẫu não trên môi trường TSA, ủ ở 28°C trong 24 giờ. Sau đó, các khuẩn lạc được kiểm tra bằng PCR với cặp primer đặc hiệu F1/IMOD. Kết quả cho thấy vắc-xin bất hoạt *S. agalactiae* AG5 (GBS) cho hiệu quả bảo vệ trên cá rô phi đỏ cao nhất là 50% ở liều vắc-xin nồng độ 10^7 CFU/g. Đồng thời, nghiên cứu cho thấy cá rô phi đỏ có đáp ứng miễn dịch với hiệu giá kháng thể trung bình ở các nghiệm thức sử dụng vắc-xin từ $2,24 \pm 0,20$ đến $3,59 \pm 0,42$ ($P < 0,05$).

1. Đặt Vấn Đề

Ở nước ta những năm gần đây, cá rô phi đỏ (*Oreochromis* sp.) được nuôi trồng phổ biến và rộng rãi ở các tỉnh miền Đông và Tây Nam Bộ, mang lại nguồn giá trị kinh tế lớn. Tuy nhiên, việc chuyển đổi cơ cấu nuôi trồng sang nuôi thâm canh đã gây nên nhiều hệ lụy đối với môi trường, nghiêm trọng hơn là gây ra nhiều loại dịch bệnh. Một trong những bệnh nguy hiểm đối với cá rô phi đỏ (*Oreochromis* sp.) là bệnh

phù mắt, xuất huyết do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây ra. Bệnh có tần suất xuất hiện từ 95 - 100% ở các tháng có nhiệt độ cao với tỷ lệ gây chết cộng dồn lên đến 42 - 100% đàn cá nuôi, làm thiệt hại nghiêm trọng cho nghề nuôi cá rô phi tại Việt Nam; do việc dùng kháng sinh không đúng cách, vi khuẩn kháng kháng sinh nên điều trị bệnh bằng kháng sinh không hiệu quả (Pham & ctv., 2013). Vì vậy, việc tìm ra giải pháp thay thế cho kháng sinh để phòng bệnh phù mắt, xuất

huyết trên cá rô phi an toàn, hiệu quả và giảm thiểu ô nhiễm môi trường là vô cùng cần thiết.

Vắc-xin bất hoạt thường được tạo ra từ việc làm mất khả năng lây nhiễm của mầm bệnh thông qua các quá trình như nhiệt độ, bức xạ hay sử dụng formol (Munang'andu & ctv., 2014; Ma & ctv., 2019). Vắc-xin bất hoạt được xem là an toàn do kháng nguyên của chúng không có khả năng lây nhiễm, ổn định và chi phí thấp (Biering & ctv., 2005; Baxter, 2007). Vắc-xin phòng bệnh do *S. agalactiae* ở cá rô phi đã được nghiên cứu và ứng dụng phổ biến tại nhiều nơi trên thế giới (Evans & ctv., 2004; Giordano & ctv., 2010; Chen & ctv., 2012). Phương pháp chế tạo vắc-xin bất hoạt bằng formol được áp dụng rộng rãi và được nhiều nhà khoa học áp dụng hiện nay. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng chủng *Streptococcus agalactiae* AG5 (Group B *Streptococcus*, GBS) hoang dại phân lập từ mẫu bệnh phẩm cá rô phi đỏ nuôi bè tại huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang để điều chế vắc-xin bất hoạt bằng formol nhằm hướng đến nâng cao hiệu quả bảo vệ RPS của vắc-xin trong phòng bệnh phù mát, xuất huyết trên cá rô phi đỏ.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 được phân lập trên mẫu cá rô phi đỏ nuôi bè tại Chợ Mới, An Giang và đã được định danh sinh học phân tử (Le & ctv., 2022).

Hóa chất sử dụng trong phòng thí nghiệm: TSA (Tryptone soya agar, Himedia); TSB (Tryptone soya broth, Himedia), formol 37% (Merk), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Merk).

Hệ thống thí nghiệm được bố trí tại phòng thí nghiệm thuộc Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh, gồm bể composite 500 lít và 1.000 lít được dùng để ương cá thí nghiệm từ cá bột và bể nhựa 60 lít được dùng để bố trí các

thí nghiệm. Trước khi sử dụng, bể được vệ sinh kỹ bằng xà phòng và chlorine, phơi khô, sau đó cấp nước vào bể và sục khí trước khi bố trí cá thí nghiệm và trong thời gian thực hiện thí nghiệm.

Cá bột được mua từ trại sản xuất cá rô phi ở Tiền Giang được nuôi trong bể composite 500 lít theo quy trình nuôi cá sạch bệnh tại Trung tâm Công nghệ Sinh học TP.HCM. Cá trọng lượng 5 - 7 g/con được sử dụng cho các thử nghiệm, cá được kiểm tra ngẫu nhiên bằng cách mổ quan sát bệnh tích và xác định không nhiễm bệnh bằng cách cấy ria mẫu nội tạng và não trên môi trường TSA, ủ ở 28°C, trong 24 giờ. Quan sát hình thái nếu có xuất hiện khuẩn lạc nghi ngờ mọc lên môi trường sẽ được kiểm tra bằng và PCR với cặp primer đặc hiệu cho chủng *S. agalactiae*, sản phẩm được điện di trên gel agarose 1,5%.

2.2.1. Định danh, đặc điểm sinh hóa của chủng *S. agalactiae* AG5

Định danh chủng *S. agalactiae* AG5 thuộc Group B *Streptococcus* (GBS) với mỗi đặc hiệu: F-GBS/R-GBS có trình tự F-GBS: 5'-CGCTGAGGTTTGGTGTTTACA-3'; R-GBS: 5'-CACTCCTACCAACGTTCTTC-3' (Mousavi & ctv., 2016). Chu kỳ nhiệt của phản ứng bao gồm: 94°C trong 5 phút; sau đó thực hiện 94°C trong 30 giây, 56°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút, lặp lại chu kỳ trên trong 30 lần; 7 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được điện di trên gel 1% agarose (abm) trong dung dịch đệm TAE 0,5X (10 mM Tris, 5 mM acetate, 0,1 mM EDTA). Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu với DNA của vi khuẩn *S. agalactiae* (Group B *Streptococcus*, GBS) có kích thước tương ứng 405 bp.

Xác định kiểu huyết thanh: Sử dụng theo hướng dẫn Kit Strep-B-Latex (GBS; Đan Mạch).

Kiểm tra khả năng dung huyết: Cấy ria khuẩn lạc trên môi trường thạch 5% máu cừu (Công ty

TNHH Nam Khoa). Ủ 28°C trong 48 giờ sau đó xác định kiểu dung huyết α , β (tan thạch máu), γ (không làm tan thạch máu).

2.1.3. Chuẩn bị vắc-xin bất hoạt

Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 thuần được nhân sinh khối trong môi trường TSB và lắc 250 vòng/phút, 28°C, 24 giờ. Dịch nuôi cấy được ly tâm ở 4.000 vòng/phút, 15 phút, 4°C để loại bỏ dịch nổi thu sinh khối, sau đó sinh khối được huyền phù trong nước muối sinh lý (0,85% NaCl) với thể tích bằng với thể tích ban đầu. Kiểm tra mật độ vi khuẩn bằng phương pháp đo mật độ quang học ở bước sóng 620 nm ($OD = 1,1 - 1,2$ tương ứng mật độ 10^9 CFU/mL) và trải đĩa ủ ở điều kiện 28°C trong 24 giờ, sau đó đếm khuẩn lạc.

Tiếp tục, dịch vi khuẩn được bất hoạt bằng dung dịch formol 37% với thể tích là 625 μ L formol/50 mL dung dịch huyền phù, sử dụng máy khuấy từ trong 24 giờ, trong tủ 4°C nhằm đảm bảo ổn định tính kháng nguyên (Munang'andu &

ctv., 2014; Ma & ctv., 2019); bổ sung 1 mL dung dịch $Na_2S_2O_5$ 15% để trung hòa formol trong 72 giờ. Dung dịch vi khuẩn bất hoạt được ly tâm ở 4.000 vòng/phút, 15 phút, 4°C để loại bỏ dịch nổi, sau đó huyền phù trong nước muối sinh lý 0,85% với thể tích bằng với thể tích ban đầu. Dịch khuẩn được rửa thêm 2 lần để loại bỏ hoàn toàn formalin. Khả năng sống sót của vi khuẩn sau khi bất hoạt được kiểm tra bằng cách trải dịch khuẩn trên đĩa môi trường TSA, ủ 28°C trong thời gian 24 giờ. Vi khuẩn bất hoạt hoàn toàn (không có khuẩn lạc phát triển trên đĩa TSA) mới được sử dụng làm vắc-xin. Cuối cùng sinh khối được huyền phù trong nước muối sinh lý 0,85% và pha loãng đến $OD_{620} \sim 1,1 - 1,2$ (mật độ vi khuẩn tương đương 10^9 CFU/mL). Bảo quản dịch khuẩn bất hoạt ở 4°C.

2.1.4. Chuẩn bị thức ăn cho cá

Sử dụng thức ăn công nghiệp dạng viên dành cho cá rô phi, trộn theo công thức nêu tại Bảng 1. Thời gian bảo quản thức ăn đã trộn vắc-xin là 1 tuần ở 4°C.

Bảng 1. Công thức phối trộn vắc-xin *S. agalactiae* AG5 bất hoạt vào thức ăn

| Nghiệm thức (NT) (CFU/g) | Nồng độ cuối vắc-xin | Công thức thành phần phối trộn | Ghi chú |
|--------------------------|----------------------|---|---|
| NT1 | 10^8 | 1 mL vắc-xin gốc (10^9 CFU/mL) + 4 mL nước muối sinh lý 0,85% sau đó trộn với 10 g thức ăn | Sấy 41°C trong thời gian 60 phút. Độ ẩm Rh = $11 \pm 0,5\%$ |
| NT2 | 10^7 | 1 mL vắc-xin (đã pha loãng thành nồng độ 10^8 CFU/mL) + 4 mL nước muối sinh lý 0,85% sau đó trộn với 10 g thức ăn | |
| NT3 | 10^6 | 1 mL vắc-xin (đã pha loãng thành nồng độ 10^7 CFU/mL) + 4 mL nước muối sinh lý 0,85% sau đó trộn với 10 g thức ăn | |
| NT4 | 10^5 | 1 mL vắc-xin (đã pha loãng thành nồng độ 10^6 CFU/mL) + 4 mL nước muối sinh lý 0,85% sau đó trộn với 10 g thức ăn | |
| NT5 | 10^4 | 1 mL vắc-xin (đã pha loãng thành nồng độ 10^5 CFU/mL) + 4 mL nước muối sinh lý 0,85% sau đó trộn với 10 g thức ăn | |

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định LD₅₀ của chủng *S. agalactiae* AG5 hoang dại

Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 được lấy ra từ tủ -80°C, tiến hành cấy ria hoạt hoá trên đĩa môi trường TSA, ủ ở 28°C trong thời gian 24 giờ. Chủng được tiếp tục tăng sinh trong môi trường TSB từ khuẩn lạc, lắc 250 rpm ở điều kiện 28°C trong thời gian 24 giờ. Thực hiện ly tâm 4.000 rpm, 4°C với thời gian 10 phút. Thu cận loại bỏ dịch nổi, sau đó huyền phù cận với nước muối sinh lý 0,85% sau cho OD = 1,1 - 1,2 (mật độ tương ứng 10⁹ CFU/mL). Tiến hành pha loãng giảm 10 lần, trải 100 µL dịch pha loãng trên đĩa môi trường TSA, ủ ở 28°C trong thời gian 24 giờ và đếm khuẩn lạc kiểm tra mật độ.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 6 nghiệm thức, trong đó: 5 nghiệm thức NT1, NT2, NT3, NT4, NT5 tiêm với chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 lần lượt tương ứng 5 nồng độ 10⁷; 10⁶; 10⁵; 10⁴; 10³ CFU/mL; nghiệm thức đối chứng (NT6) tiêm nước muối sinh lý 0,85%. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mật độ 10 con/lần lặp lại, tiêm với lượng 100 µL/cá, trọng lượng cá thí nghiệm 5 - 7 g/con. Dịch khuẩn được tiêm vào phần bụng phía dưới của vây bụng, hướng về phía trước một góc 45°. Sau đó, cá được thả lại bể nuôi 60 lít và theo dõi, ghi nhận biểu hiện triệu chứng và số lượng cá chết trong vòng 14 ngày. Cá được cho ăn ngày 2 lần, lượng thức ăn cho ăn tương đương 5% trọng lượng của cá. Cá chết theo từng ngày sẽ được thu nhận, những mẫu cá có biểu hiện đặc trưng như lồi mắt được mổ và cấy dịch ổ bụng và não cá trên môi trường TSA ủ 28°C trong thời gian 24 giờ. Hình thái khuẩn lạc được quan sát và kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu F1/IMOD có trình tự F1 (5' GAGTTTGATCATGGGTCAG 3') và IMOD (5' ACCAACATGTGTTAATTACTC 3') (Channarong & ctv., 2012); chu kì nhiệt của phản ứng bao gồm: 95°C trong 5 phút; sau đó

thực hiện 95°C trong 1 phút, 58°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút, lặp lại chu kỳ trên trong 35 lần; 7 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được điện di trên gel 1% agarose (abm) trong dung dịch đệm TAE 0,5X (10 mM Tris, 5 mM acetate, 0,1 mM EDTA). Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu với DNA của vi khuẩn *S. agalactiae* có kích thước tương ứng 220 bp.

Xác định LD₅₀ chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 hoang dại theo phương pháp của Reed & Muench (1938) theo công thức:

$$LD_{50} = 10^{a-x}$$

Trong đó:

a là số lũy thừa mà tại đó vi khuẩn gây chết cá thấp nhất (trên 50%)

x được tính dựa vào công thức:

$$x = (Pa - 50) / (Pa - Pu)$$

Với Pa là tỉ lệ cận trên và Pu là tỉ lệ cận dưới của nồng độ gây chết 50%.

2.2.2. Đánh giá tính an toàn của vắc-xin trên cá rô phi

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 3 nghiệm thức, trong đó có 1 nghiệm thức đối chứng, cá được cho ăn thức ăn không trộn vắc-xin (Đối chứng âm); 2 nghiệm thức còn lại cá được cho ăn thức ăn đã trộn vắc-xin ở 2 nồng độ 10⁸ và 10⁹ CFU/g (Bảng 2). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mật độ 20 con/bể 60 lít, phòng có máy lạnh điều hoà nhiệt độ ổn định ở 28°C, có hệ thống thổi khí và cấp thoát nước độc lập cho từng bể nuôi. Cá được cho ăn 1 lần duy nhất vào ngày bắt đầu thử nghiệm và theo dõi liên tục trong 3 tuần. Nếu không gây chết cá thì vắc-xin được đánh giá an toàn cho vật chủ.

Bảng 2. Bố trí thí nghiệm đánh giá tính an toàn của vắc-xin bất hoạt bằng phương pháp cho ăn

| Nghiệm thức (NT) (CFU/g) | Nồng độ | Số lần lặp lại | Số cá mỗi bể thí nghiệm (con) |
|-----------------------------|-----------------|----------------|-------------------------------|
| NT1 | 10 ⁹ | 3 | 20 |
| NT2 | 10 ⁸ | 3 | 20 |
| Đối chứng âm | - | 3 | 20 |

2.2.3. Đánh giá hiệu quả bảo vệ của vắc-xin bằng phương pháp cho ăn

Cho cá ăn thức ăn trộn vắc-xin tạo miễn dịch

Thí nghiệm gồm 7 nghiệm thức. Trong đó, 5 nghiệm thức, cá được cho ăn thức ăn đã trộn vắc-xin với nồng độ lần lượt là 10⁴; 10⁵; 10⁶; 10⁷; 10⁸ CFU/g. Ở nghiệm thức đối chứng dương, cá được ăn với thức ăn không trộn vắc-xin nhưng được tiêm công độc với chủng *S. agalactiae* AG5. Ở nghiệm thức đối chứng âm, cá được cho ăn thức ăn không trộn vắc-xin và không công độc với chủng *S. agalactiae* AG5. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần với mật độ cá là 20 con/bể, có hệ thống thổi khí và cấp thoát nước độc lập cho từng bể nuôi. Cá được cho ăn thức ăn trộn vắc-xin 1 lần/tuần, lượng thức ăn cho ăn tương đương 5% trọng lượng của cá, cho ăn lặp lại liên tục trong vòng 3 tuần. Nước trong bể sẽ thay 3 ngày một lần, thay 50 - 80% lượng nước. Thí nghiệm được thực hiện trong phòng có máy lạnh điều hòa nhiệt độ ổn định ở 28°C (phù hợp với nhiệt độ gây độc của vi khuẩn gây bệnh).

Xác định hiệu quả bảo vệ RPS của vắc-xin bất hoạt

Sau 21 ngày kể từ ngày cho ăn thức ăn trộn vắc-xin theo các nồng độ khác nhau, cá được gây cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 bằng phương pháp tiêm liều LD₅₀ và theo dõi trong vòng 1 tuần. Cá chết theo từng ngày được thu nhận, mẫu cá có biểu hiện đặc trưng sẽ được mổ quan sát và cấy ria dịch bụng và não cá trên môi trường TSA, ủ ở 28°C trong 24 giờ. Hình thái

vi khuẩn lạc được quan sát và kiểm tra bằng PCR với cặp primer đặc hiệu F1/IMOD.

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

$$RPS (\%) = (1 - A/B) \times 100$$

(A: Tỷ lệ cá chết của nghiệm thức sử dụng vắc-xin; B: Tỷ lệ cá chết của nghiệm thức đối chứng).

2.2.4. Xác định hiệu quả kháng thể

Ly trích huyết thanh: Sử dụng kim tiêm 1 mL, lấy máu tại mạch chủ cuống đuôi cho vào ống eppendorf 1,5 mL và để yên 2 - 3 giờ ở 4°C, sau đó ly tâm 6.000 vòng/phút trong 5 phút. Thu huyết thanh và sử dụng thực hiện phản ứng ngưng kết kháng nguyên - kháng thể.

Chuẩn bị kháng nguyên: vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 được tăng sinh và bất hoạt bằng formol, rửa sạch formol bằng nước muối sinh lý và bảo quản trong 4°C (tương tự 2.1.3)

Phản ứng vi ngưng kết kháng nguyên - kháng thể: Được thực hiện trên đĩa nhựa (microplate) 96 giếng theo phương pháp của Roberson (1990). Dùng 40 µL nước muối sinh lý 0,85% cho vào các giếng đã 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 ½. Cuối cùng, 40 µL vắc-xin được cho vào các giếng và trộn đều bằng pipet. Mỗi đĩa 96 giếng có sử dụng một đối chứng

dương và một đối chứng âm (nước muối sinh lý 0,85%). Để yên 4 - 5 giờ ở nhiệt độ phòng. Kết quả dương tính (+) khi đáy giếng tạo thành một lớp ngưng kết trải rộng và kết quả âm tính (-) khi đáy giếng chỉ có một chấm nhỏ màu trắng. Hiệu giá kháng thể là tần số xuất hiện kháng thể ở độ pha loãng cao nhất có hiện tượng ngưng kết. Hiệu giá kháng thể trung bình (HGKTTB) là số trung bình của hiệu giá kháng thể trong cùng một nghiệm thức (Tu & ctv., 2013; Nguyen & ctv., 2019).

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

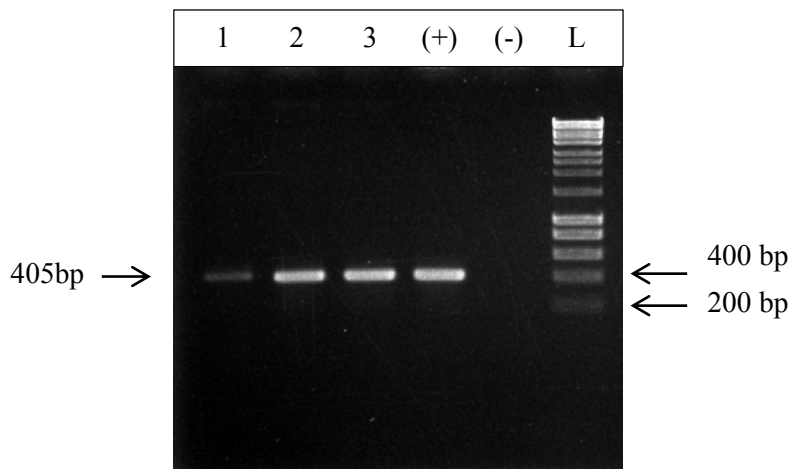
Tất cả các dữ liệu được xử lý phân tích ANOVA một nhân tố và phép thử Duncan ở

mức ý nghĩa $P < 0,05$ và vẽ biểu đồ bằng phần mềm GraphPad Prism 9.

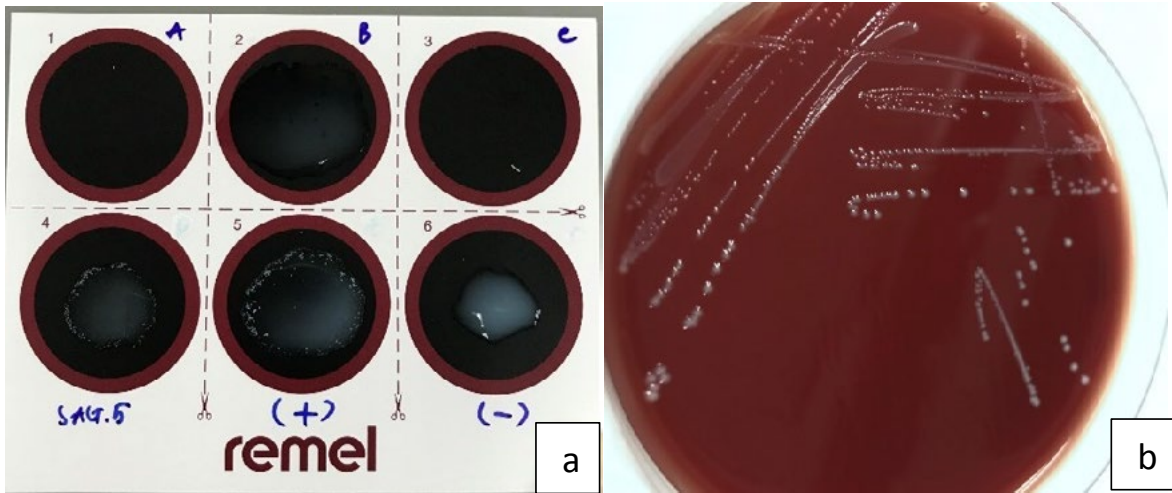
3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Định danh, đặc điểm sinh hóa chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5

Kết quả định danh chủng *S. agalactiae* AG5 thuộc Group B *Streptococcus* (GBS) với mỗi F-GPS/R-GPS cho kích thước sản phẩm tương ứng 405 bp (Hình 1). Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 cho phản ứng ngưng kết (GBS) ở Hình 2.



Hình 1. Kết quả điện di PCR các mẫu DNA *S. agalactiae* với cặp primer đặc hiệu GBS: F-GBS/R-GBS. Giếng 1 - 3: DNA *S. agalactiae* VL40, AG5, Q9.9; Giếng (+): Đối chứng dương *S. agalactiae* GBS được cung cấp bởi Đại học Nông Lâm Huế; Giếng (-); Đối chứng âm; Giếng (L): Thang DNA chuẩn 1 kb.



Hình 2. Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 cho phản ứng ngưng kết (GBS) (a); chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 cho kết quả dung huyết γ (không gây tan huyết) trên môi trường thạch máu cừu 5% (b).

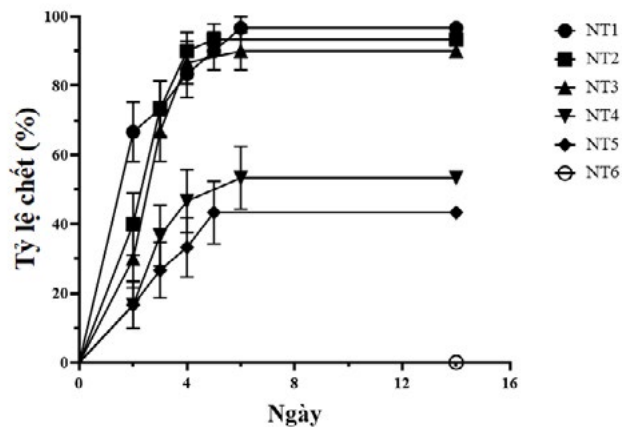
3.2. Vắc-xin bất hoạt từ chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5

Sinh khối vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 sau lên men được huyền phù với nước muối sinh lý có giá trị OD là 1,2 với mật độ tương ứng sau trải kiểm tra mật độ đạt $2,3 \times 10^9$ CFU/mL. Sau khi bất hoạt bằng formol, vắc-xin được trải kiểm tra trên môi trường TSA và không thấy mọc khuẩn lạc, điều đó cho thấy chủng vi khuẩn *S. agalactiae*

AG5 đã hoàn toàn bất hoạt và không có khả năng gây bệnh cho vật chủ.

3.3. Giá trị LD_{50} của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5

Sau 14 ngày thí nghiệm cảm nhiễm với chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 tỷ lệ cá chết được trình bày ở Hình 3.



Hình 3. Tỷ lệ cá chết tích lũy (%) khi tiêm chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 hoang dại ở các nồng độ vi khuẩn khác nhau vào ổ bụng cá trong thời gian 14 ngày theo dõi.

Bảng 3. Kết quả xác định liều gây chết 50% (LD₅₀) của chủng *S. agalactiae* AG5 hoang dại trên cá rô phi đỏ giống

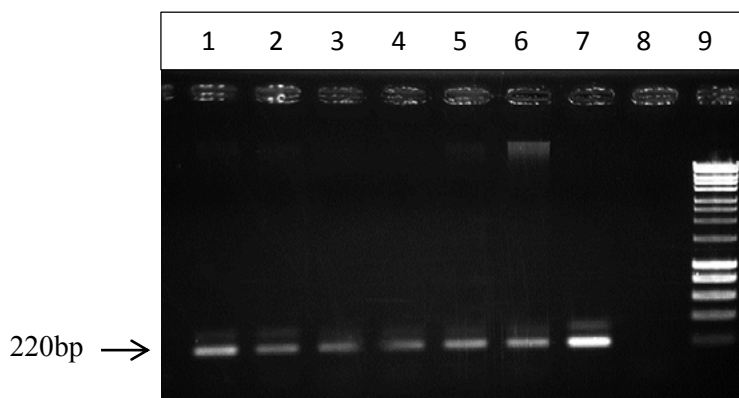
| Nghiệm thức (NT) | Nồng độ (CFU/mL) | Tỷ lệ cá chết (%) ± độ lệch chuẩn |
|------------------|------------------|-----------------------------------|
| NT1 | 10 ⁷ | 96,67*** ± 4,71 |
| NT2 | 10 ⁶ | 93,33*** ± 9,43 |
| NT3 | 10 ⁵ | 90,00*** ± 8,16 |
| NT4 | 10 ⁴ | 53,33** ± 17,00 |
| NT5 | 10 ³ | 43,33* ± 4,71 |
| Đối chứng | 0 | 0 |

Ghi chú: * Khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$), ** Khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,01$), *** khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,001$).

Trong thử nghiệm xác định LD₅₀ của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 bằng phương pháp tiêm vào ổ bụng, tỷ lệ cá chết sau khi tiêm với chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 ở các nồng độ 10³; 10⁴; 10⁵; 10⁶; 10⁷ CFU/mL lần lượt là 43,33 ± 4,71%; 53,33 ± 17,00%; 90,00 ± 8,16%; 93,33 ± 9,43%; 96,67 ± 4,71%, không có cá chết ở nghiệm thức đối chứng âm (tỷ lệ cá chết là 0%; Bảng 3). Phân tích số liệu bằng phần mềm GraphPad Prism 9 cho thấy các nghiệm thức có ý nghĩa

thống kê ($P < 0,001$). Giá trị LD₅₀ của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 được xác định là 6,87 x 10³ CFU/mL.

Các khuẩn lạc cấy rìa từ mẫu cá chết được tách DNA và kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu, sản phẩm được điện di cho kết quả có kích thước tương ứng 220 bp (Hình 4.). Có thể thấy cá chết trong thử nghiệm nguyên nhân là do *S. agalactiae* AG5 gây ra.



Hình 4. Kết quả điện di PCR khuẩn lạc sau khi công độc với cặp primer đặc hiệu F1/IMOD. Giếng 1 - 6: DNA khuẩn lạc cấy rìa từ mẫu cá chết; Giếng 7: Đối chứng (+) *S. agalactiae* được cung cấp bởi Đại học Nông Lâm Huế; Giếng 8: Đối chứng (-); Giếng 9: Thang DNA chuẩn 1 kb.

3.4. Kết quả đánh giá tính an toàn của vắc-xin trên cá rô phi

Bảng 4. Tỷ lệ cá sống ở thử nghiệm đánh giá tính an toàn của vắc-xin trên cá rô phi giống bằng phương pháp cho ăn

| Nghiệm thức (NT) | Vắc-xin | Nồng độ vắc-xin (CFU/g) | Tỷ lệ sống (%) \pm độ lệch chuẩn |
|------------------|-----------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| NT1 | <i>S. agalactiae</i> AG5 bất hoạt | 10^9 | $100 \pm 0,0$ |
| NT2 | <i>S. agalactiae</i> AG5 bất hoạt | 10^8 | $100 \pm 0,0$ |
| NT3 | Đối chứng âm | 0 | $100 \pm 0,0$ |

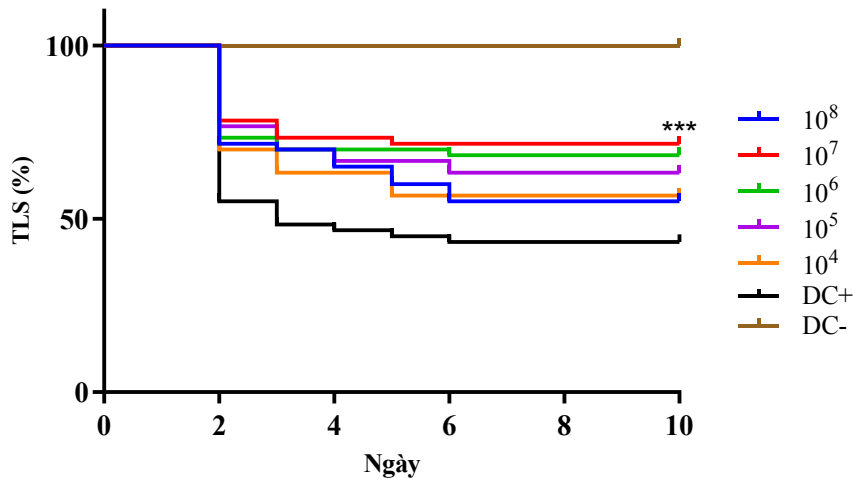
Tình trạng của cá sau 3 tuần tiêm vắc-xin: cá bơi nhanh nhẹn, phản ứng nhanh với tiếng động, vây và đuôi không bị mòn rách, thân cá không có vết trầy xước hay xuất huyết. Tỷ lệ sống của cá ở các nghiệm thức tiêm vắc-xin là 100% (Bảng 4).

Như vậy, vắc-xin bất hoạt tạo từ chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 hoàn toàn an toàn cho cá.

3.5. Hiệu quả bảo vệ RPS của vắc-xin bất hoạt bằng phương pháp cho ăn



Hình 5. Hệ thống thử nghiệm hiệu quả bảo vệ RPS (relative percentage survival) vắc-xin bất hoạt chủng *S. agalactiae* AG5 trên cá rô phi cỡ 5 - 7 g/con (trái); trọng lượng và kích cỡ cá rô phi cỡ dùng trong thử nghiệm (phải).



Hình 6. Tỷ lệ sống (TLS) sót tích lũy thử nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ RPS (relative percentage survival) sau cảm nhiễm chủng *S. agalactiae* AG5 hoang dại liều LD₅₀.

Kết quả cảm nhiễm với chủng vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 ở nồng độ LD₅₀ được thể hiện ở Bảng 5. Các số liệu đã được xử lý thống kê cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,001$).

Bảng 5. Tỷ lệ cá chết và hiệu quả bảo vệ của vắc-xin bằng phương pháp cho ăn

| Nghiệm thức (NT) | Nồng độ vắc-xin (CFU/g) | Tỷ lệ cá chết (%) ± độ lệch chuẩn | Relative percentage survival (RPS) (%) |
|---------------------|-------------------------|-----------------------------------|--|
| NT1 | 10 ⁸ | 45,00 ^{ns} ± 7,01 | 20,59 |
| NT2 | 10 ⁷ | 28,33 ^{***} ± 2,36 | 50,00 |
| NT3 | 10 ⁶ | 31,67 ^{***} ± 2,36 | 44,11 |
| NT4 | 10 ⁵ | 36,67 ^{**} ± 2,36 | 35,29 |
| NT5 | 10 ⁴ | 43,33 ^{ns} ± 6,24 | 23,54 |
| NT6 (Đối chứng (+)) | 0 | 56,67 ± 4,71 | - |
| NT7 (Đối chứng (-)) | 0 | 00,00 | - |

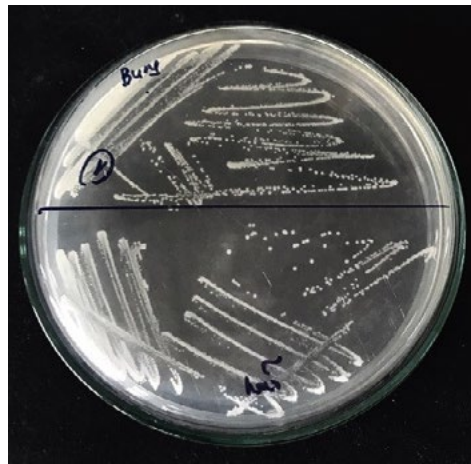
Ghi chú: ** Khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,01$), *** khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,001$), ns không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

Dựa vào Bảng 5. có thể thấy rằng, trong điều kiện phòng thí nghiệm, vắc-xin bất hoạt từ vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 nồng độ 10⁴; 10⁵; 10⁶ và 10⁸ CFU/g có tỷ lệ cá chết trên 30%, hiệu quả bảo vệ RPS dưới 45% có thể do cơ thể của cá dung nạp một lượng lớn kháng nguyên vượt mức cho phép

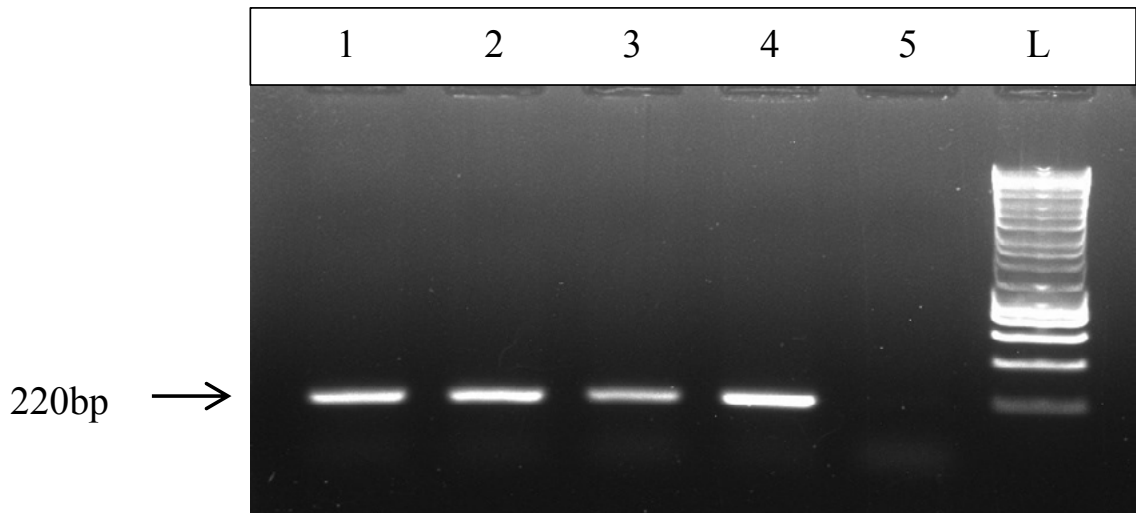
nên ảnh hưởng khả năng sinh miễn dịch trong cơ thể. Ở nghiệm thức sử dụng thức ăn trộn vắc-xin bất hoạt ở nồng độ 10⁷ CFU/g, hiệu quả bảo vệ cao nhất đạt 50%. Vắc-xin tiêm được xem có hiệu quả khi có chỉ số RPS cao hơn 60% (Amend, 1981). Đối với vắc-xin cho ăn cho thấy hiệu quả

bảo vệ RPS thấp hơn vắc-xin tiêm, nghiên cứu ảnh hưởng vắc-xin *S. agalactiae* bất hoạt trên cá rô phi đồ áp dụng thông qua phương pháp cho ăn, hiệu quả bảo vệ RPS chỉ đạt 45% (Ismail & ctv., 2016). So với kết quả trong nghiên cứu này cho thấy vắc-xin *S. agalactiae* AG5 bất hoạt có tỉ lệ hiệu quả bảo vệ RPS cao hơn. Khuyến cáo cần điều chỉnh lượng vắc-xin bất hoạt ở nồng độ 10^7 CFU/g thức ăn để mang lại hiệu quả tốt nhất.

Cá chết theo từng ngày được thu nhận, mẫu cá có biểu hiện đặc trưng được mổ và cấy ria mẫu não cá trên môi trường TSA, ủ ở 28°C trong vòng 24 giờ, xuất hiện khuẩn lạc tương tự *S. agalactiae* (Hình 7). Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc với cặp mồi F1/IMOD từ mẫu cá chết ở các nghiệm thức đều cho kết quả dương tính với *S. agalactiae* khi có kích thước sản phẩm tương ứng 220 bp (Hình 8). Điều này cho thấy cá chết trong thử nghiệm là do vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 gây ra.



Hình 7. Khuẩn lạc vi khuẩn *S. agalactiae* AG5 được cấy ria từ dịch ổ bụng và não cá chết sau 24 giờ ủ ở 28°C.



Hình 8. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc phân lập từ mẫu cá chết với cặp primer F1/IMOD. Giếng 1 - 3: DNA mẫu cá chết; Giếng 4: ĐC (+); DNA *S. agalactiae*; Giếng 5: ĐC (-); Giếng L: thang DNA chuẩn 1 kb.

Theo nghiên cứu của Nguyen & Dang (2019), bằng phương pháp tiêm cá với vắc-xin *S. agalactiae* bất hoạt, hiệu lực của vắc-xin là 80,1% ở nghiệm thức tiêm 0,05 mL vắc-xin/cá và 88,1% ở 2 nghiệm thức tiêm 0,1 mL và 0,2 mL vắc-xin/cá; thí nghiệm tiêm vắc-xin *S. agalactiae* bất hoạt của Nguyen & ctv. (2019), hiệu quả đạt 62,5%. Một nghiên cứu khác của nhóm tác giả Ho & ctv. (2019) khi tiến hành làm thử nghiệm đánh giá tính an toàn và hiệu lực của vắc-xin Han-Streptila từ chủng *S. agalactiae* với phương pháp tiêm trên cá rô phi có khối lượng từ 10 g/con trở lên, hiệu quả đạt 66,9% sau 24 tuần. Phương pháp cho ăn trên cá có khối lượng từ 2,5 g/con trở lên hiệu quả đạt 63,9% sau 24 tuần. Như vậy, có thể thấy hiệu quả bảo vệ mà phương pháp tiêm vắc-xin mang lại cao hơn so với phương pháp cho ăn thức ăn chứa vắc-xin. Nguyên nhân là khi sử dụng phương pháp tiêm, vắc-xin đi trực tiếp vào cơ thể cá, làm cho lượng kháng thể sinh ra nhiều dẫn đến hiệu quả bảo vệ cao. Còn đối với phương pháp cho ăn, một nhược điểm của phương pháp này là việc không đồng nhất về hiệu quả đã được nhiều nghiên cứu chỉ ra do các kháng nguyên sẽ bị giảm đi do ảnh hưởng của các enzyme tiêu hóa trong ruột cá (Hart & ctv., 1988; Nakanishi & Ototake, 1997). Tuy nhiên, phương pháp tiêm

để gây stress cho cá, đòi hỏi cá phải có kích thước lớn trong khi dịch bệnh thường xuất hiện trong giai đoạn sớm của cá. Hơn nữa, phải thực hiện tiêm trên từng cá thể, do đó người dân phải có trang thiết bị, mất nhiều thời gian, khó áp dụng cho ao nuôi diện rộng. Còn phương pháp cho ăn tuy hiệu quả bảo vệ thấp hơn nhưng đơn giản về yêu cầu kỹ thuật, dễ áp dụng cho các ao nuôi có diện tích lớn, mật độ cao, tốn ít công lao động, chi phí thấp, thời gian xử lý ngắn, ít gây tổn hại cho cá và không phải phụ thuộc vào kích thước của cá. Vì vậy, tùy theo hoàn cảnh thực tế mà ta lựa chọn phương pháp sử dụng vắc-xin phù hợp.

3.6. Hiệu giá kháng thể

Hiệu giá kháng thể trung bình (HGKTTB) ở cá rô phi đo trước khi sử dụng vắc-xin ở tất cả các nghiệm thức có giá trị từ $0,20 \pm 0,04$ đến $0,24 \pm 0,03$ khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Kết quả sau 3 tuần sử dụng vắc-xin bằng phương pháp cho ăn cho thấy tất cả các nghiệm thức có sử dụng vắc-xin đều tăng (dao động $2,24 \pm 0,20$ đến $3,59 \pm 0,42$) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng không sử dụng vắc-xin $0,27 \pm 0,14$ ($P < 0,05$). Kết quả cho thấy cá rô phi đo có đáp ứng miễn dịch với vắc-xin *S. agalactiae* AG5 bất hoạt được thể hiện tại Bảng 6.

Bảng 6. Hiệu giá kháng thể trung bình của cá rô phi đo trước và sau khi cảm nhiễm với *S. agalactiae* AG5

| Nghiệm thức (NT) | Trước khi cho ăn vắc-xin | Sau khi ăn vắc-xin 3 tuần, trước cảm nhiễm | Sau cảm nhiễm 10 ngày |
|------------------|--------------------------|--|-----------------------|
| NT1 | $0,22 \pm 0,03^{aA}$ | $2,24 \pm 0,20^{aB}$ | $2,18 \pm 0,06^{aB}$ |
| NT2 | $0,22 \pm 0,05^{aA}$ | $3,76 \pm 0,43^{dB}$ | $3,59 \pm 0,42^{dB}$ |
| NT3 | $0,24 \pm 0,03^{aA}$ | $3,29 \pm 0,23^{bB}$ | $2,91 \pm 0,16^{bC}$ |
| NT4 | $0,21 \pm 0,04^{aA}$ | $3,19 \pm 0,13^{bB}$ | $2,94 \pm 0,14^{bB}$ |
| NT5 | $0,20 \pm 0,04^{aA}$ | $3,43 \pm 0,31^{cB}$ | $3,22 \pm 0,23^{cB}$ |
| Đối chứng + | $0,21 \pm 0,02^{aA}$ | $0,27 \pm 0,14^{aA}$ | $0,21 \pm 0,14^{aA}$ |

Ghi chú: Các số liệu có ký tự khác nhau trong cùng một cột (a, b, c) hoặc một hàng (A, B, C) thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Hiệu quả vắc-xin được đánh giá thông qua việc định lượng mức kháng thể và đánh giá tỉ lệ sống của cá cho ăn vắc-xin sau khi cảm nhiễm với tác nhân gây bệnh (Caipang & ctv., 2009). Kết quả nghiên cứu này tương tự với báo cáo của Nguyen & Dang (2019) và Le & ctv. (2021) sau 3 tuần tiêm vắc-xin bắt hoạt cho thấy các lô cá sử dụng vắc-xin tạo đáp ứng miễn dịch với hiệu giá kháng thể trung bình có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với cá không tiêm vắc-xin. Tuy nhiên, kết quả trong nghiên cứu này cho thấy hiệu quả bảo vệ và hiệu giá kháng thể thấp hơn, có thể do phương pháp cho ăn không tạo đáp ứng miễn dịch tốt cho cá bằng phương pháp tiêm.

4. Kết Luận

Nghiên cứu này đã tạo được vắc-xin bắt hoạt từ chủng hoang dại *S. agalactiae* AG5 (GBS) bằng formol với mật độ vi khuẩn tương đương 10^9 CFU/mL. Kết quả vắc-xin được đánh giá an toàn cho cá với hiệu quả bảo vệ RPS khi cho ăn vắc-xin bắt hoạt ở nồng độ 10^4 ; 10^5 ; 10^6 và 10^8 CFU/g có tỷ lệ cá chết trên 30%, hiệu quả bảo vệ dưới 45%. Ở nghiệm thức sử dụng nồng độ 10^7 CFU/g, hiệu quả bảo vệ cao nhất đạt 50%. Kết quả nghiên cứu cho thấy cá rô phi đỏ có đáp ứng miễn dịch sau 3 tuần cho ăn vắc-xin với hiệu giá kháng thể trung bình ở các nghiệm thức sử dụng vắc-xin từ $2,24 \pm 0,20$ đến $3,59 \pm 0,42$.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và chưa từng được công bố trong bất kỳ nghiên cứu nào khác.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Amend, D. F. (1981). Potency testing of fish vaccines. *Developments in Biological Standardization* 49, 447-454.
- Baxter, D. (2007). Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occupational Medicine* 57(8), 552-556. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqm110>.
- Biering, E., Villoing, S., Sommerset, I., & Christie, K. E. (2005). Update on viral vaccines for fish. *Developments in Biologicals* 121, 97-113.
- Caipang, C. M. A., Brinchmann, M. F., & Kiron, V. (2009). Profiling gene expression in the spleen of Atlantic cod, *Gadus morhua* upon vaccination with *Vibrio anguillarum* antigen. *Comparative biochemistry and physiology. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 153(3), 261-267. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.03.005>.
- Channarong, R., Pattanapon, K., Nopadon, P., & Janenuj, W. (2012). Duplex PCR for simultaneous and unambiguous detection of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* associated with *Streptococcosis* of cultured Tilapia in Thailand. *Thai Journal of Veterinary Medicine* 42(2), 153-158.
- Chen, M., Wang, R., Li, L. P., Liang, W. W., Li, J., Huang, Y., Lei, A. Y., Huang, W. Y., & Gan, X. (2012). Screening vaccine candidate strains against *Streptococcus agalactiae* of tilapia based on PFGE genotype. *Vaccine* 30(42), 6088-6092. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.044>.
- Evans, J. J., Klesius, P. H., & Shoemaker, C. A. (2004). Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine* 22(27-28), 3769-3773. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.012>.
- Giordano, L. G. P., Muller, E. E., Klesius, P., & Silva, V. G. D. (2010). Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. *Aquaculture Research* 41(10), 1539-1544. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02449.x>.
- Hart, S., Wrathmell, A., Harris, J. E., & Grayson, T. H. (1988). Gut immunology in fish: A review. *Developmental and Comparative Immunology* 12, 453-480. [https://doi.org/10.1016/0145-305x\(88\)90065-1](https://doi.org/10.1016/0145-305x(88)90065-1).

- Ismail, M. S., Siti-Zahrah, A., Ridzuan, M. S. M., Azmai, M. N. A., Firdaus-Nawi, M., & ZamriSaad, M. (2016). Feed-based vaccination regime against streptococcosis in red tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*. *BMC Veterinary Research* 12(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0834-1>.
- Le, H. V., Pham, M. T. H., Le, H. L. P., & Ngo, T. H. P. (2022). Screening antagonistic *Bacillus* spp. strains against *Streptococcus agalactiae* causing popeye and hemorrhage in Tilapia (*Oreochromis* sp.). *Hue University of Agriculture and Forestry Journal of Agricultural Science and Technology* 6(1), 2751-2761. <https://doi.org/10.46826/huaf-jasat.v6n1y2022.796>.
- Le, K. M., Tu, D. T., Bui, H. T. B., Seng, E. K., Hian, S. K., Tran, H. T. T., & Dang, T. 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(3B), 181-190. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2021.100>.
- Ma, J., Bruce, T. J., Jones, E. M., & Cain, K. D. (2019). A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches. *Microorganisms* 7(11), 569. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110569>.
- Mousavi, S. M., Hosseini, S. M., Mashouf, R. Y., & Arabestani, M. R. (2016). Identification of group B streptococci using 16S rRNA, cfb, scpB, and atr genes in pregnant women by PCR. *Acta Medica Iranica* 54(12), 765-770.
- Munang'andu, H. M., Mutoloki, S., & Evensen, Ø. (2014). Non-replicating vaccines. In Gudding, G., Lillehaug, A., & Evensen, Ø. (Eds.). *Fish vaccination* (22-32). <https://doi.org/10.1002/9781118806913>.
- Nakanishi, T., & Ototake, M. (1997). Antigen uptake and immune response after immersion vaccination. *Developments in Biological Standardization* 90, 59-68.
- Nguyen, P. N., Nguyen, L. T. H., Nguyen, H. T. X., Sandra, A., Janina, Z. C., & Kim, D. T. (2019). Protection of formalin-killed vaccine against *Streptococcus agalactiae* (serotype III) in Tilapia (*Oreochromis* sp.). *Science and Technology Journal of Agriculture and Rural Development* 22, 100-108.
- Nguyen, U. H. N., & Dang, O. T. H. (2019). Immune responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) vaccinated with in-activated *Streptococcus agalactiae* vaccine. *Can Tho University Journal of Science* 55(4B), 123-131. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2019.116>.
- Pham, Q. H., Ho, T. T., Nguyen, V. H., Huynh, L. T. M., & Le, K. V. (2013). Biochemical characteristics of *Streptococcus* spp. isolated from tilapia with hemorrhagic disease in some Northern provinces of Vietnam. *Journal of Science and Development* 11(4), 506-513.
- Reed, L. J., & Muench, H. A. (1938). A simple method of estimating fifty percent end points. *American Journal of Epidemiology* 27(3), 493-497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>.
- Roberson, B. B. (1990). Bacterial agglutination. In Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S., & van Muiswinkel, W. B. (Eds.). *Techniques in fish immunology* (1st ed., 1-86). New Jersey, USA: SOS Publications.
- Tu, D. T., Tran, C. H., Nguyen, U. H. N., & Ma, T. L. D. (2013). The immune response ability of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) against *Edwardsiella ictaluri*. *Can Tho University Journal of Science* 26, 269-276.