

ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA CÁ RÔ PHI (*Oreochromis niloticus*) CHUNG VẮC-XIN *Streptococcus agalactiae* BẤT HOẠT

Nguyễn Hoàng Nhật Uyên và Đặng Thị Hoàng Oanh*

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đặng Thị Hoàng Oanh (email: dthoanh@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 27/12/2018

Ngày nhận bài sửa: 05/03/2019

Ngày duyệt đăng: 30/08/2019

Title:

Immune responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) vaccinated with in-activated *Streptococcus agalactiae* vaccine

Từ khóa:

Cá rô phi, kháng thể, *Streptococcus agalactiae*, vắc xin

Keywords:

Antibody, *Oreochromis niloticus*, *Streptococcus agalactiae*, vaccination

ABSTRACT

This study was conducted to determine the efficacy of inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine on tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerling. The experiment is a completely randomised design with three replications of four treatments where fish were vaccinated with 0.05, 0.1, 0.2 ml vaccine/fish and non-vaccinated (control). Three weeks after vaccination, fish were challenged with *S. agalactiae* and followed-up for 3 weeks post challenge to determine the relative percentage survival rate (RPS%). Blood samples were collected every week to analyse hematological parameters and specific antibody concentration. The results showed that inactivated *S. agalactiae* vaccine has immunostimulatory effect in tilapia and lasting at least 4 weeks post vaccination. The hematological parameters and specific antibody concentration in vaccinated fish were statistically significantly higher ($P < 0,05$) than un-vaccinated fish. The RPS% of tested vaccine was 80.1% when injected 0.05 ml vaccine/individual and 88.1% for both doses of 0.1 ml and 0.2 ml vaccine/individual.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định hiệu lực của vắc xin *Streptococcus agalactiae* bất hoạt trên cá rô phi (*Oreochromis niloticus*). Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, gồm 1 nghiệm thức đối chứng và 3 nghiệm thức tiêm vắc xin bất hoạt với thể tích tiêm lần lượt là 0,05 ml; 0,1 ml và 0,2 ml/cá. Sau 3 tuần tiêm vắc xin, cá được cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae* và theo dõi trong 3 tuần sau cảm nhiễm để xác định chỉ số bảo hộ (RPS%). Mẫu máu cá được thu định kỳ mỗi tuần/lần để phân tích các chỉ tiêu huyết học và hàm lượng kháng thể đặc hiệu. Kết quả ghi nhận là vắc xin *S. agalactiae* bất hoạt có khả năng kích thích miễn dịch ở cá rô phi và kéo dài ít nhất đến 4 tuần sau khi tiêm vắc xin. Các chỉ tiêu huyết học và hiệu giá kháng thể trung bình ở cá tiêm vắc xin tăng có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với cá không tiêm vắc xin. Chỉ số bảo hộ 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.

Trích dẫn: Nguyễn Hoàng Nhật Uyên và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2019. Đáp ứng miễn dịch của cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) chung vắc-xin *Streptococcus agalactiae* bất hoạt. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(4B): 123-131.

1 GIỚI THIỆU

Cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) là đối tượng nuôi thủy sản quan trọng ở nước ta. Khi nghề nuôi cá rô phi phát triển theo hướng thâm canh hóa thì bệnh ở cá rô phi xảy ra thường xuyên và gây thiệt hại nhiều hơn cho người nuôi. Trong số các bệnh thường gặp ở cá rô phi, bệnh phù mắt và xuất huyết do liên cầu khuẩn *Streptococcus agalactiae* là bệnh gây tỷ lệ chết cao, trung bình là 42,6% và có thể đến 100% (Phạm Hồng Quân và ctv., 2013).

Người nuôi cá rô phi chủ yếu sử dụng kháng sinh để trị bệnh phù mắt và xuất huyết, việc sử dụng kháng sinh không đúng nguyên tắc đã gây ra hiện tượng kháng thuốc. Ngoài ra, dư lượng kháng sinh ở cá rô phi nuôi còn ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng. Cho nên, sử dụng vắc xin phòng bệnh và thay thế kháng sinh được xem là một giải pháp.

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 *et al.*, 2004; Pretto-Giordano *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012). Ở Việt Nam, đã có một số nghiên cứu bước đầu thử nghiệm vắc xin trên các đối tượng nuôi thủy sản nhưng chưa có nhiều nghiên cứu vắc xin phòng bệnh trên cá rô phi. Trong bài báo này, kết quả nghiên cứu về đáp ứng miễn dịch của cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) chủng vắc xin *Streptococcus agalactiae* bất hoạt được trình bày nhằm cung cấp thêm thông tin về khả năng ứng dụng vắc xin phòng bệnh cho cá rô phi nuôi thương phẩm tạo tiền đề cho những nghiên cứu ngoài thực địa và sản xuất thử nghiệm vắc xin bất hoạt ứng dụng rộng rãi cho nghề nuôi cá rô phi ở nước ta.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Hệ thống thí nghiệm

Hệ thống thí nghiệm được bố trí tại phòng thí nghiệm thuộc Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ, gồm bể composite (2 m³) được dùng để trữ cá thí nghiệm và bể nhựa (150 L) được dùng để bố trí các thí nghiệm thức 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 ngày trước khi bố trí cá thí nghiệm và trong thời gian thực hiện thí nghiệm.

2.2 Cá thí nghiệm

Cá rô phi (cỡ 20 – 25 gram/con) khỏe mạnh được mua từ trại giống ở Cần Thơ được chuyển về phòng thí nghiệm và nuôi dưỡng khoảng một tuần trong bể composite có sục khí liên tục. Trước khi bố trí thí nghiệm, 30 cá được chọn ngẫu nhiên để kiểm tra và

xác định là cá không nhiễm ký sinh trùng và vi khuẩn.

2.3 Chuẩn bị vắc xin bất hoạt

Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* thuần được nuôi trong 100 ml môi trường Brain Heart Broth (BHB, Merck) và để ở 28°C trong 36 giờ. Sau đó, vi khuẩn được làm bất hoạt bằng dung dịch 4% formalin trong 24 giờ ở 4°C. Khả năng sống của vi khuẩn sau khi bất hoạt được kiểm tra bằng cách nuôi trên đĩa brain heart agar (BHA, Merck) 28 °C trong 36 giờ. Vi khuẩn bất hoạt hoàn toàn (không có khuẩn lạc phát triển trên đĩa BHA) được sử dụng làm vắc xin. Dung dịch vi khuẩn bất hoạt được ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Phần dung dịch phía trên được rút bỏ và vi khuẩn được rửa 3 lần bằng dung dịch PBS để loại formalin. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy so màu quang phổ với bước sóng 610 nm và điều chỉnh OD khoảng 0,1 ± 0,02 (tương ứng với mật độ vi khuẩn 10⁸ CFU/ml).

2.4 Bố trí thí nghiệm

Tiêm vắc xin gây miễn dịch: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 thí nghiệm thức (mỗi thí nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi bể 50 cá), gồm: 1 thí nghiệm thức đối chứng tiêm nước muối sinh lý (dung dịch 0,85% NaCl) và 3 thí nghiệm thức tiêm vắc xin với các liều lần lượt là 0,05; 0,1 và 0,2 ml vắc xin /cá. Vắc- xin được tiêm vào phần bụng phía dưới của vây bụng, hướng về phía trước 1 góc 45°. Cá được cho ăn thức ăn viên (Cargill) 2 lần/ngày và cho cá ăn theo nhu cầu. Thay nước 2 ngày/lần (20-30% thể tích) và ghi nhận nhiệt độ và pH của các bể thí nghiệm.

Gây cảm nhiễm công cường độc: Sau 21 ngày tiêm vắc xin, cá được gây cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae* bằng liều LD₇₀ (Pretto-Giordano *et al.*, 2010) đã xác định từ thí nghiệm thăm dò. Cá ở thí nghiệm thức 1 (đối chứng) được bố trí thành 6 bể (mỗi bể 20 con), 3 bể được gây cảm nhiễm bằng cách tiêm 0,1 ml vi khuẩn/cá (đối chứng dương) và 3 bể được tiêm 0,1 ml nước muối sinh lý/cá (đối chứng âm). Cá ở thí nghiệm thức 2, 3 và 4 (tiêm vắc xin) được bố trí thành 3 bể cho mỗi thí nghiệm thức (mỗi bể 20 con) và được gây cảm nhiễm bằng cách tiêm 0,1 ml vi khuẩn/cá.

Theo dõi thí nghiệm và thu mẫu: Trước khi tiêm vắc xin (thu mẫu đợt 0) thu ngẫu nhiên 9 cá từ các bể. Sau khi tiêm vắc xin, định kì thu mẫu 1 lần/tuần và thu trong 3 tuần, mỗi thí nghiệm thức thu 9 con (3 cá/bể). Sau khi gây cảm nhiễm, ghi nhận dấu hiệu bệnh lý, tỷ lệ chết và tái phân lập vi khuẩn từ não bằng cách lấy mẫu cấy lên đĩa BHA rồi để ở 28 °C trong 36 giờ. Định kỳ thu mẫu 1 lần/tuần và thu trong 3 tuần, mỗi thí nghiệm thức thu 9 con (3 cá/bể).

Xác định hiệu lực của vắc xin: Hiệu lực của vắc xin được xác định bằng chỉ số bảo hộ tương đối (Relative percentage survival - RPS) và tính bằng công thức: $RPS (\text{điểm cuối}) = (1 - A/B) \times 100$ (A: % cá chết do *S.agalactiae* của nhóm tiêm vắc xin; B: % cá chết do *S.agalactiae* của nhóm đối chứng).

2.5 Xác định các chỉ tiêu huyết học

Phương pháp thu mẫu máu: Cá được gây mê bằng benzocain (Merck) (theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Vùng gần cuống đuôi của cá được lau sạch, rồi lấy máu bằng từ động mạch chủ ở cột sống (Houston, 1990) và cho vào ống eppendorf đã được tiệt trùng và áo bằng dung dịch chống đông heparin (Sigma).

Định lượng hồng cầu (Natt and Herrick, 1952): 10 μ l máu được cho vào ống nghiệm chứa 1990 μ l dung dịch Natt and Herrick và lắc nhẹ. Mật độ hồng cầu được xác định bằng buồng đếm hồng cầu và tính theo công thức: $C \times 10 \times 5 \times 200$ (tb/mm³), với C là tổng số hồng cầu trên 5 vùng đếm.

Định lượng và định loại bạch cầu: Mẫu máu được cố định trên lame và nhuộm bằng dung dịch nhuộm Wright and Giemsa (Chinabut *et al.*, 1991). Quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100X và định loại bạch cầu theo Chinabut *et al.* (1991).

Tổng bạch cầu (TBC) (Hrubec *et al.*, 2000): Đếm tổng số 1.500 tế bào hồng cầu và bạch cầu trên mẫu nhuộm. TBC được tính bằng công thức: $TBC (tb/mm^3) = (\text{số bạch cầu} \times \text{mật độ hồng cầu trên buồng đếm}) / \text{số hồng cầu}$.

Tùng loại bạch cầu (Hrubec *et al.*, 2000): Đếm tổng số bạch cầu bằng 200 tế bào. Mật độ từng loại bạch cầu (tb/mm³) = (số lượng mỗi loại BC x mật độ TBC)/200.

2.6 Xác định hiệu lực kháng thể

Ly trích huyết thanh: Lấy 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. Rút lấy phần huyết thanh phía trên cho vào ống eppendorf khác và sử dụng thực hiện phản ứng ngưng kết kháng nguyên - kháng thể.

Chuẩn bị kháng nguyên: vi khuẩn *S. agalactiae* được bất hoạt bằng dung dịch 4% formalin và được rửa sạch formalin bằng nước muối sinh lý và bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh.

Phản ứng vi ngưng kết kháng nguyên - kháng thể: Được thực hiện trên các đĩa nhựa (microplate) 96 giếng theo phương pháp của Roberson *et al.* (1990). Đầu tiên, cho 40 μ l nước muối sinh lý vào các giếng đã đánh số từ 2 đến 12 và cho 40 μ l huyết thanh được cho 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, 40 μ l huyền dịch xác vi khuẩn được cho vào các giếng rồi trộn đều. Mỗi đĩa 96 giếng có sử dụng một đối chứng dương (mẫu huyết thanh đã biết hiệu lực ngưng kết với kháng nguyên) và một đối chứng âm (nước muối sinh lý). Để yên 4-5 giờ ở nhiệt độ phòng. Đọc 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 lực kháng thể là tần số xuất hiện kháng thể ở độ pha loãng cao nhất có hiện tượng ngưng kết. Hiệu lực kháng thể trung bình (HGKTTB) là số trung bình của hiệu lực kháng thể trong cùng một nghiệm thức (Lê Thượng Khởi và *ctv.*, 2013).

2.7 Xử lý số liệu

Sự khác biệt về các chỉ tiêu huyết học và HGKTTB giữa các nghiệm thức thí nghiệm được xử lý thống kê ANOVA 1 nhân tố (ở mức ý nghĩa $P < 0,05$) bằng phần mềm SPSS 21.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

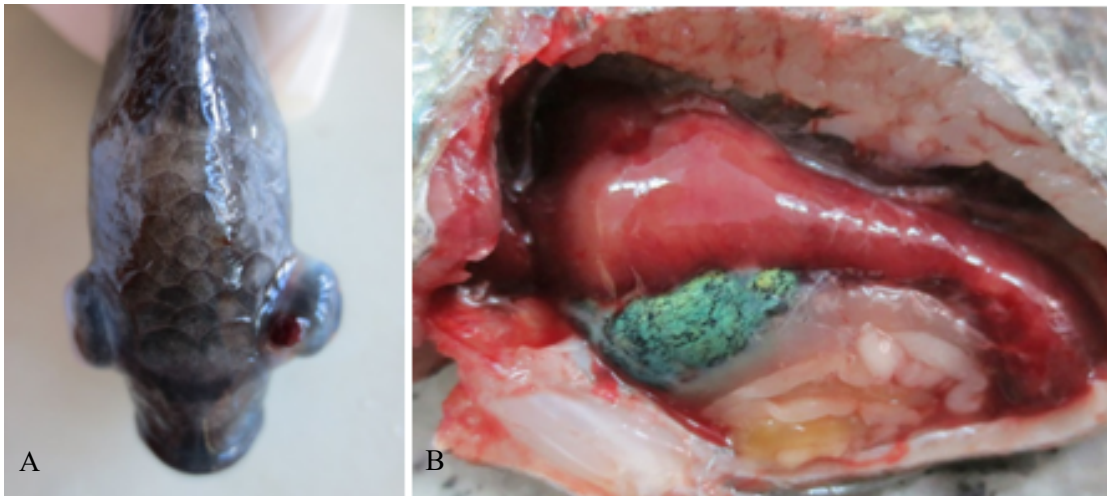
3.1 Chỉ số bảo hộ tương đối của vắc xin

Tình trạng của cá sau khi tiêm vắc xin

Cá thí nghiệm bơi lội nhanh nhẹn, phản ứng nhanh với tiếng động, các vây không bị mòn/rách, trên thân không có vết trầy xước hay xuất huyết, mang cá đỏ tươi sáng bóng. Cấu trúc các cơ quan rắn chắc, không có biểu hiện sưng to hoặc nhũn, không có dịch. Tỷ lệ sống của cá ở các nghiệm thức sau 3 tuần tiêm vắc xin là 100%.

Tỷ lệ chết và chỉ số bảo hộ tương đối

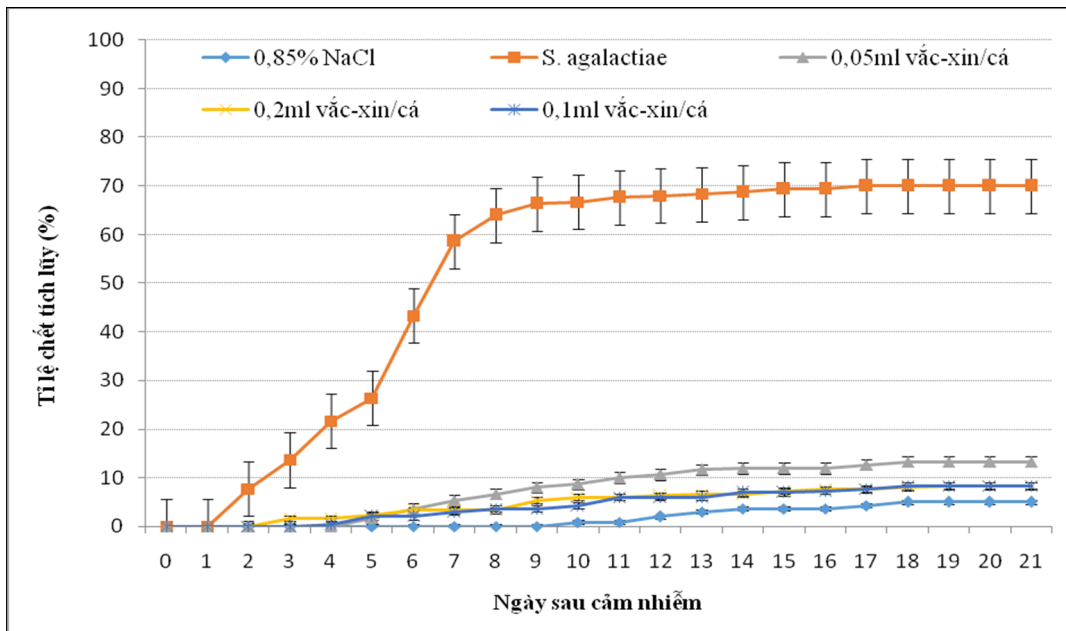
Sau 2 ngày cảm nhiễm, cá ở nghiệm thức đối chứng dương (không tiêm vắc xin, tiêm vi khuẩn) bắt đầu có biểu hiện bệnh lý là bỏ ăn, bơi lờ đờ trên mặt nước, mắt phù và đục, xuất huyết, mật cá sưng to, trong xoang bụng của hầu hết các mẫu cá được kiểm tra đều có dịch (Hình 1). Vi khuẩn tái phân lập từ não của các mẫu cá cảm nhiễm được xác định là *S. agalactiae*. Tỷ lệ cá chết tăng nhanh sau 8 ngày và ngừng chết sau 17 ngày cảm nhiễm, tỷ lệ chết là 70% (Hình 2).



Hình 1: Dấu hiệu bệnh lý bên ngoài (A) và bên trong (B) cá rô phi cảm nhiễm *S. agalactiae*

Ở các nghiệm thức tiêm vắc xin, thời gian cá biểu hiện bệnh chậm hơn. Tỷ lệ chết là 13,3% với liều tiêm 0,05 ml vắc xin/cá và 8,3% với liều tiêm 0,1 và 0,2 ml vắc xin/cá. Chỉ số RPS là 80,1% ở nghiệm thức tiêm 0,05 ml vắc xin/cá và 88,1% ở 2 nghiệm thức tiêm 0,1ml và 0,2 ml vắc xin/cá (Hình 2). Kết quả trên tương tự thí nghiệm phòng bệnh do

S. agalactiae trên cá rô phi cỡ 30g/con bằng cách tiêm vắc xin bất hoạt của Evans *et al.* (2004) với chỉ số RPS là 80%. Thí nghiệm tiêm vắc xin *S. agalactiae* bất hoạt liều 2×10^8 CFU/ml cho cá rô phi cỡ 20g của Pretto-Giordano *et al.* (2010) đạt chỉ số RPS là 83,6% sau 30 ngày tiêm. Ở liều tiêm vắc xin 0,1 ml và 0,2 ml/cá có chỉ số RPS như nhau và đạt giá trị cao nhất.



Hình 2: Tỷ lệ chết tích lũy (%) của cá ở các nghiệm thức thí nghiệm

3.2 Sự biến đổi các chỉ tiêu huyết học của cá rô phi sau khi tiêm các liều vắc xin khác nhau

3.2.1 Hồng cầu

Trước khi tiêm vắc xin, mật độ hồng cầu của cá thí nghiệm dao động từ $1,26 \times 10^6$ đến $1,48 \times 10^6$ tb/mm³ (Bảng 1). Sau 3 tuần tiêm vắc xin, mật độ

hồng cầu của cá ở các nghiệm thức tiêm vắc xin tăng trong khoảng từ $2,10 \times 10^6$ đến $2,38 \times 10^6$ tb/mm³, khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) so với mật độ hồng cầu của cá ở nghiệm thức đối chứng. Mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức thí nghiệm phù hợp với sự biến động số lượng hồng cầu ở cá nước ngọt ($1 - 3,5 \times 10^6$ tb/mm³) (Đặng Thị Hoàng Oanh

và Nguyễn Thị Kiều, 2013). Sau cảm nhiễm vi khuẩn, mật độ hồng cầu biến động ở tất cả các nghiệm thức cảm nhiễm, giảm ở tuần thứ nhất sau cảm nhiễm, sau đó tăng nhẹ ở tuần thứ hai và tiếp

tục giảm ở tuần thứ ba sau cảm nhiễm. Số lượng hồng cầu giảm là do vi khuẩn tấn công và làm vỡ các tế bào hồng cầu (McNulty *et al.*, 2003).

Bảng 1: Mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức qua các lần thu mẫu (tế bào x 10⁶/mm³)

Trước khi cảm nhiễm công cường độ				
Nghiệm thức	Tuần 0	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3
Không tiêm vắc xin	1,39 ± 0,27 ^{aA}	1,56 ± 0,42 ^{aA}	1,58 ± 0,16 ^{aA}	1,78 ± 0,80 ^{aA}
0,05ml vắc xin	1,26 ± 0,03 ^{aC}	1,85 ± 0,0 ^{aB}	1,49 ± 0,27 ^{aC}	2,25 ± 0,71 ^{aA}
0,1ml vắc xin	1,48 ± 0,42 ^{aA}	2,02 ± 0,46 ^{aA}	1,76 ± 0,21 ^{aA}	2,10 ± 0,79 ^{aA}
0,2ml vắc xin	1,35 ± 0,18 ^{aB}	1,50 ± 0,29 ^{aAB}	1,60 ± 0,32 ^{aAB}	2,38 ± 0,61 ^{aA}
Sau khi cảm nhiễm công cường độ				
Nghiệm thức	Tuần 4	Tuần 5	Tuần 6	
Không tiêm vắc xin	0,85% NaCl tiêm vi khuẩn	1,74 ± 0,17 ^{aA}	1,67 ± 0,39 ^{aA}	1,88 ± 0,36 ^{aA}
0,05ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	1,37 ± 0,36 ^{aA}	1,87 ± 0,98 ^{aA}	1,60 ± 0,65 ^{aA}
0,1ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	1,45 ± 0,27 ^{aB}	2,33 ± 0,51 ^{aA}	2,0 ± 0,49 ^{aAB}
0,2ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	1,51 ± 0,32 ^{aA}	1,92 ± 0,38 ^{aA}	1,74 ± 0,19 ^{aA}
		1,76 ± 0,79 ^{aA}	2,21 ± 0,79 ^{aA}	1,90 ± 0,52 ^{aA}

Các giá trị có ký tự khác nhau trong cùng một cột (a, b) hoặc một hàng (A, B, AB) thì khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05).

3.2.2 Bạch cầu

Tổng bạch cầu

Sau 2 tuần tiêm vắc xin, tổng bạch cầu ở tất cả các nghiệm thức tiêm vắc xin tăng và khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05) so với nghiệm thức không tiêm vắc xin (Bảng 2). Ở tuần thứ 3 sau khi tiêm vắc xin, tổng bạch cầu ở nghiệm thức tiêm 0,1 và 0,2 ml vắc xin/cá tương đương nhau và khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức 0,05 ml vắc xin/cá (Bảng 2). Hai tuần sau cảm nhiễm, tổng bạch cầu ở hai nghiệm thức tiêm 0,1 và 0,2 ml vắc xin/cá tăng cao nhất

(tương ứng với 21,9 ± 2,36 x 10³ tb/mm⁴ và 21,9 ± 2,37 x 10⁴ tb/mm³) khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05) so với nghiệm thức không tiêm vắc xin và nghiệm thức tiêm 0,05 ml vắc xin/cá (Bảng 2). Kết quả tương tự cũng được ghi nhận ở cá điều hồng tiêm vắc xin *Aquavac Strept* trong nghiên cứu của Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thị Kiều (2013). Bạch cầu có vai trò thực bào và đáp ứng miễn dịch chống lại các tác nhân lạ xâm nhập vào cơ thể (Houston, 1990). Sự gia tăng tổng bạch cầu chứng tỏ khả năng kích thích miễn dịch của vắc xin đối với cá thí nghiệm.

Bảng 2: Mật độ tổng bạch cầu ở các nghiệm thức qua các lần thu mẫu (tế bào x 10⁴/mm³)

Trước khi cảm nhiễm công cường độ				
Nghiệm thức	Tuần 0	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3
Không tiêm vắc xin	6,15±1,1 ^{aA}	5,74± 1,15 ^{bA}	6,92 ± 0,67 ^{bA}	6,98 ± 0,19 ^{cA}
0,05ml vắc xin	7,5±2,8 ^{aB}	10,12 ± 0,0 ^{aA}	8,77 ± 1,52 ^{aAB}	8,55 ± 0,66 ^{bB}
0,1ml vắc xin	7,62±1,2 ^{aC}	9,38 ± 0,48 ^{aB}	10,93 ± 1,93 ^{aA}	11,79 ± 1,65 ^{aA}
0,2ml vắc xin	6,7±11,2 ^{aC}	8,95 ± 1,27 ^{aB}	9,91 ± 1,92 ^{aA}	10,61 ± 1,54 ^{aA}
Sau khi cảm nhiễm công cường độ				
Nghiệm thức	Tuần 4	Tuần 5	Tuần 6	
Không tiêm vắc xin	0,85% NaCl tiêm vi khuẩn	6,87± 2,25 ^{cAB}	6,41 ± 0,6 ^{cB}	7,72 ± 0,45 ^{dA}
0,05ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	13,06 ± 1,26 ^{bA}	9,34 ± 3,46 ^{cB}	9,48 ± 0,68 ^{cB}
0,1ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	12,26 ± 0,57 ^{bB}	15,82 ± 2,06 ^{bA}	12,45 ± 3,74 ^{bAB}
0,2ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	20,92 ± 0,35 ^{aA}	21,9 ± 2,36 ^{aA}	19,73 ± 2,51 ^{aA}
		22,0 ± 3,23 ^{aA}	21,9 ± 2,37 ^{aA}	17,45 ± 1,82 ^{aB}

Các giá trị có ký tự khác nhau trong cùng một cột (a, b, c) hoặc một hàng (A, B, AB) thì khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05).

Tế bào lympho

Số lượng tế bào lympho bắt đầu tăng sau 1 tuần tiêm vắc xin và đạt cao nhất sau 3 tuần. Số lượng tế bào lympho giữa các nghiệm thức tiêm vắc xin và

nghiệm thức đối chứng khác biệt có ý nghĩa (P<0,05), nhưng không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức tiêm các liều vắc xin khác nhau (Bảng 3). Sau cảm nhiễm, số lượng tế bào lympho tiếp tục tăng. Ở các nghiệm thức tiêm vắc xin, số lượng tế

bào lympho cao hơn nghiệm thức không tiêm vắc xin và không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức tiêm các liều vắc xin khác nhau (dao động trong khoảng từ $125,1 \pm 18,4$ đến $141,7 \pm 9,01 \times 10^3$ tế bào/mm³).

Số lượng tế bào lympho ở các nghiệm thức tiêm vắc xin cao hơn nghiệm thức không tiêm cho thấy

vắc xin có tác động lên miễn dịch đặc hiệu của cá. Tế bào lympho là một trong những loại bạch cầu quan trọng của cả hệ miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu đảm nhiệm chức năng bảo vệ cơ thể bằng miễn dịch tế bào và miễn dịch dịch thể (Lê Thị Hoàng Mỹ, 2007).

Bảng 3: Mật độ tế bào lympho ở các nghiệm thức qua các lần thu mẫu (tế bào x 10³/mm³)

Trước khi cảm nhiễm công cường độ				
Nghiệm thức	Tuần 0	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3
Không tiêm vắc xin	35,3 ± 3,9 ^{aB}	39,6 ± 2,50 ^{bA}	37,7 ± 5,19 ^{bA}	40,5 ± 7,83 ^{cA}
0,05ml vắc xin	32,1 ± 8,71 ^{aC}	55,9 ± 2,01 ^{aB}	68,5 ± 9,64 ^{aA}	53,7 ± 7,11 ^{cAB}
0,1ml vắc xin	32,0 ± 5,82 ^{aC}	50,5 ± 4,97 ^{aB}	70,9 ± 5,26 ^{aA}	68,7 ± 0,0 ^{bA}
0,2ml vắc xin	34,2 ± 5,06 ^{aC}	56,4 ± 1,92 ^{aB}	64,1 ± 10,0 ^{aB}	74,3 ± 4,87 ^{aA}
Sau khi cảm nhiễm công cường độ				
Nghiệm thức		Tuần 4	Tuần 5	Tuần 6
Không tiêm vắc xin	0,85% NaCl	49,5 ± 11,7 ^{cA}	46,4 ± 4,92 ^{cA}	56,1 ± 17,6 ^{cA}
	tiêm vi khuẩn	71,3 ± 15,1 ^{bA}	84,2 ± 19,0 ^{bA}	64,8 ± 9,4 ^{cA}
0,05ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	110,1 ± 12,3 ^{aA}	131,7 ± 16,8 ^{aA}	125,1 ± 18,4 ^{aA}
0,1ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	111,8 ± 18,1 ^{aB}	141,7 ± 9,01 ^{aA}	136,8 ± 14,4 ^{aA}
0,2ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	105,2 ± 17,3 ^{aB}	136,5 ± 17,8 ^{aA}	129,1 ± 7,50 ^{aA}

Các giá trị có ký tự khác nhau trong cùng một cột (a, b, c) hoặc một hàng (A, B, C, AB) thì khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05).

Bạch cầu trung tính

Ba tuần sau khi tiêm vắc xin, mật độ bạch cầu trung tính ở các nghiệm thức tiêm vắc xin cao hơn có ý nghĩa thống kê (P<0,05) so với nghiệm thức không tiêm vắc xin (Bảng 4). 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 (Vũ Triệu An và Homberg, 2001). Ở tuần đầu tiên sau cảm nhiễm, số lượng bạch cầu trung tính tăng mạnh ở các nghiệm thức cảm nhiễm chứng tỏ có sự huy động các tế bào miễn dịch ở cá để tiêu diệt các vi sinh vật lạ xâm nhập vào cơ thể (Ellis, 1988).

Sau khi gây cảm nhiễm, mật độ tế bào trung tính ở nghiệm thức đối chứng không biến động nhiều. Tuy nhiên, mật độ tế bào trung tính tăng nhanh ở các nghiệm thức tiêm vắc xin, ở các nghiệm thức tiêm vắc xin số lượng tế bào trung tính cao hơn có ý nghĩa (P<0,05) so với nghiệm thức không tiêm vắc xin. Mật độ tế bào trung tính giữa hai nghiệm thức tiêm 1 ml và 2 ml/cá không khác biệt có ý nghĩa (P>0,05) (dao động trong khoảng từ $5,30 \pm 0,76$ đến $8,72 \pm 1,11 \times 10^3$ tế bào/mm³), nhưng cao hơn (P<0,05) nghiệm thức tiêm 0,05 ml/cá (dao động trong khoảng từ $3,25 \pm 0,64$ đến $4,13 \pm 0,71$ tế bào/mm³).

Bảng 4: Mật độ bạch cầu trung tính ở các nghiệm thức qua các lần thu mẫu (tế bào x 10³/mm³)

Trước khi cảm nhiễm công cường độ				
Nghiệm thức	Tuần 0	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3
Không tiêm vắc xin	2,28 ± 0,38 ^{aAB}	2,40 ± 0,17 ^{cA}	2,36 ± 0,25 ^{aAB}	2,12 ± 0,15 ^{bB}
0,05ml vắc xin	1,99 ± 0,26 ^{aB}	3,08 ± 0,0 ^{aA}	2,25 ± 0,4 ^{aB}	3,07 ± 0,1 ^{aA}
0,1ml vắc xin	1,91 ± 0,93 ^{aB}	2,75 ± 0,0 ^{bA}	2,53 ± 0,69 ^{aA}	2,74 ± 3,15 ^{aA}
0,2ml vắc xin	2,10 ± 0,49 ^{aB}	2,19 ± 1,35 ^{cB}	2,68 ± 0,35 ^{aA}	3,08 ± 7,36 ^{aA}
Sau khi cảm nhiễm công cường độ				
Nghiệm thức		Tuần 4	Tuần 5	Tuần 6
Không tiêm vắc xin	0,85% NaCl	1,73 ± 0,15 ^{cA}	2,36 ± 0,56 ^{cA}	2,18 ± 0,88 ^{bcA}
	tiêm vi khuẩn	3,26 ± 0,5 ^{bbB}	4,30 ± 0,41 ^{bA}	1,83 ± 0,73 ^{cC}
0,05ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	4,13 ± 0,71 ^{bA}	3,90 ± 0,48 ^{bA}	3,25 ± 0,64 ^{bA}
0,1ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	8,72 ± 1,11 ^{aA}	7,55 ± 0,86 ^{aA}	5,30 ± 0,76 ^{aB}
0,2ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	7,12 ± 1,38 ^{aAB}	8,33 ± 1,62 ^{aA}	6,20 ± 0,80 ^{aB}

Các giá trị có ký tự khác nhau trong cùng một cột (a, b, c) hoặc một hàng (A, B, C, AB) thì khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05).

Bạch cầu đơn nhân

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 để thực hiện bước khởi đầu của quá trình đáp ứng miễn dịch đặc hiệu (Vũ Triệu An và Hombert, 2001). Mật độ bạch cầu đơn nhân ở tất cả các nghiệm thức thay đổi không đáng kể sau 3 tuần sau khi tiêm vắc xin (Bảng 5). Tuy nhiên, sau khi gây cảm nhiễm thì mật độ tế bào đơn nhân ở tất

cả các nghiệm thức tiêm vắc xin tăng và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) giữa các nghiệm thức tiêm vắc xin liều cao so với nghiệm thức tiêm vắc xin liều thấp và nghiệm thức không tiêm vắc xin (Bảng 5). Ở tuần thứ ba sau cảm nhiễm, mật độ bạch cầu đơn nhân nghiệm thức tiêm 0,2 ml vắc xin/cá ($15,26 \pm 0,94$ tế bào/ mm^3) cao hơn ($P < 0,05$) mật độ bạch cầu đơn nhân ở nghiệm thức tiêm 0,05 ml vắc xin/cá ($6,77 \pm 1,28$ tế bào/ mm^3) và nghiệm thức tiêm 0,1 ml vắc xin/cá ($13,23 \pm 1,35$ tế bào/ mm^3).

Bảng 5: Mật độ bạch cầu đơn nhân ở các nghiệm thức qua các lần thu mẫu (tế bào x $10^3/\text{mm}^3$)

Trước khi cảm nhiễm công cường độ				
Nghiệm thức	Tuần 0	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3
Không tiêm vắc xin	$3,70 \pm 1,05^{aA}$	$2,21 \pm 1,30^{bA}$	$2,47 \pm 0,81^{bA}$	$3,66 \pm 1,59^{aA}$
0,05ml vắc xin	$3,54 \pm 1,83^{aA}$	$4,73 \pm 1,07^{aA}$	$3,57 \pm 1,40^{abA}$	$4,51 \pm 1,06^{aA}$
0,1ml vắc xin	$5,25 \pm 0,82^{aA}$	$5,04 \pm 1,54^{aA}$	$5,55 \pm 1,15^{aA}$	$4,42 \pm 1,04^{aA}$
0,2ml vắc xin	$4,94 \pm 0,88^{aA}$	$3,78 \pm 0,95^{abAB}$	$4,53 \pm 1,52^{aAB}$	$3,36 \pm 0,69^{aB}$
Sau khi cảm nhiễm công cường độ				
Nghiệm thức	Tuần 4	Tuần 5	Tuần 6	
Không tiêm vắc xin	0,85% NaCl	$3,10 \pm 0,56^{cA}$	$2,38 \pm 0,77^{dA}$	$2,82 \pm 0,84^{dA}$
	tiêm vi khuẩn	$10,20 \pm 1,98^{bA}$	$7,0 \pm 1,54^{cB}$	$4,63 \pm 0,57^{cC}$
0,05ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	$10,04 \pm 1,59^{bA}$	$10,68 \pm 1,26^{bA}$	$6,77 \pm 1,28^{bB}$
0,1ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	$15,15 \pm 1,82^{aAB}$	$16,54 \pm 2,2^{aA}$	$13,23 \pm 1,35^{aB}$
0,2ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	$15,50 \pm 2,67^{aA}$	$14,73 \pm 2,10^{aA}$	$15,26 \pm 0,94^{aA}$

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

Tiểu cầu

Sau 2 tuần tiêm vắc xin, mật độ tiểu cầu ở nghiệm thức tiêm vắc xin 0,2 ml/cá ($16,90 \pm 2,78 \times 10^3$ tb/ mm^3) cao gấp 7 lần so với đối chứng ($2,25 \pm 1,30 \times 10^3$ tb/ mm^3) (Bảng 6). Tiểu cầu đảm nhận vai trò quan trọng trong quá trình đông máu, đặc biệt trong tình trạng viêm nhiễm và tham gia vào quá trình đáp ứng miễn dịch (Houston, 1990; Chinabut và ctv., 1991).

Sau khi gây cảm nhiễm, các nghiệm thức tiêm vắc xin có mật độ tiểu cầu thấp hơn so với trước khi gây cảm nhiễm, mặc dù vậy, các nghiệm thức tiêm vắc xin vẫn cao hơn các nghiệm thức đối chứng. Tiểu cầu giảm do mật độ vi khuẩn cao làm cho tiểu cầu mất chức năng và thoái hóa. Theo Ranzani-Paiva *et al.* (2004), số lượng tiểu cầu giảm nhanh khi có sự xuất hiện của vi khuẩn trong các cơ quan.

Bảng 6: Mật độ tiểu cầu ở các nghiệm thức qua các lần thu mẫu (tế bào x $10^3/\text{mm}^3$)

Trước khi cảm nhiễm công cường độ				
Nghiệm thức	Tuần 0	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3
Không tiêm vắc xin	$3,07 \pm 0,16^{aA}$	$3,33 \pm 1,01^{bA}$	$2,25 \pm 1,30^{cA}$	$2,72 \pm 0,0^{cA}$
0,05ml vắc xin	$3,76 \pm 1,24^{aC}$	$9,68 \pm 0,0^{aB}$	$12,39 \pm 2,80^{bA}$	$11,88 \pm 1,61^{bA}$
0,1ml vắc xin	$3,02 \pm 0,94^{aC}$	$9,11 \pm 0,58^{aB}$	$15,37 \pm 5,15^{abA}$	$15,16 \pm 2,65^{aA}$
0,2ml vắc xin	$2,86 \pm 0,59^{aC}$	$8,52 \pm 1,38^{aB}$	$16,90 \pm 2,78^{aA}$	$15,77 \pm 2,44^{aA}$
Sau khi cảm nhiễm công cường độ				
Nghiệm thức	Tuần 4	Tuần 5	Tuần 6	
Không tiêm vắc xin	0,85% NaCl	$2,05 \pm 1,0^{cAB}$	$1,55 \pm 0,0^{bB}$	$2,14 \pm 0,1^{cA}$
	tiêm vi khuẩn	$1,68 \pm 0,1^{bC}$	$1,44 \pm 0,0^{bB}$	$3,02 \pm 0,38^{bA}$
0,05ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	$6,78 \pm 1,94^{aA}$	$7,11 \pm 1,79^{aA}$	$5,76 \pm 1,42^{aA}$
0,1ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	$9,91 \pm 1,74^{aA}$	$9,80 \pm 2,35^{aA}$	$8,19 \pm 1,48^{aA}$
0,2ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	$7,70 \pm 2,24^{aA}$	$10,17 \pm 3,26^{aA}$	$7,33 \pm 1,06^{aA}$

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

3.3 Hiệu giá kháng thể

Hiệu giá kháng thể trung bình (HGKTTB) ở cá trước khi tiêm vắc xin (có giá trị từ 0 – 0,67) khác biệt không có ý nghĩa giữa các nghiệm thức ($P>0,05$). Sau 3 tuần tiêm vắc xin, HGKTTB ở tất cả các nghiệm thức tiêm vắc xin đều tăng (dao động từ $3,5 \pm 0,7$ ở nghiệm thức tiêm 0,05ml vắc xin/cá; $5,0 \pm 0,0$ ở nghiệm thức tiêm 0,1 ml vắc xin/cá) và khác biệt có ý nghĩa ($P<0,05$) so với nghiệm thức không tiêm vắc xin ($1,00 \pm 0,99$), nhưng không khác biệt có ý nghĩa ($P>0,05$) giữa các nghiệm thức tiêm vắc xin (Bảng 7).

Bảng 7: Hiệu giá kháng thể trung bình ở các nghiệm thức qua các lần thu mẫu

Trước khi cảm nhiễm công cường độ				
Nghiệm thức	Tuần 0	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3
Không tiêm vắc xin	$0,33 \pm 0,58^{aA}$	$1,00 \pm 0,00^{aA}$	$0,67 \pm 0,58^{aA}$	$1,00 \pm 0,99^{aA}$
0,05ml vắc xin	$0,00 \pm 0,00^{aB}$	$3,00 \pm 0,00^{bA}$	$3,00 \pm 0,99^{bA}$	$3,50 \pm 0,71^{bA}$
0,1ml vắc xin	$0,67 \pm 0,95^{aA}$	$3,50 \pm 0,7^{bcB}$	$2,00 \pm 0,99^{abAB}$	$5,00 \pm 0,00^{bB}$
0,2ml vắc xin	$0,33 \pm 0,58^{aC}$	$4,00 \pm 0,00^{cA}$	$2,00 \pm 0,99^{abB}$	$4,00 \pm 0,00^{bA}$
Sau khi cảm nhiễm công cường độ				
Nghiệm thức		Tuần 4	Tuần 5	Tuần 6
Không tiêm vắc xin	0,85% NaCl	$2,67 \pm 0,82^{aB}$	$2,67 \pm 0,52^{aB}$	$3,33 \pm 0,52^{aB}$
	tiêm vi khuẩn	$3,22 \pm 1,30^{abB}$	$3,71 \pm 1,11^{abB}$	$4,00 \pm 0,00^{abB}$
0,05 ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	$4,33 \pm 1,41^{bcC}$	$5,67 \pm 1,41^{cC}$	$5,44 \pm 1,42^{bcC}$
0,1 ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	$3,89 \pm 1,76^{abB}$	$5,56 \pm 1,59^{cB}$	$5,22 \pm 1,92^{abB}$
0,2 ml vắc xin	tiêm vi khuẩn	$5,56 \pm 1,24^{cA}$	$4,13 \pm 1,41^{bA}$	$4,56 \pm 1,51^{abA}$

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

Sau 1 tuần cảm nhiễm, trừ nghiệm thức đối chứng, các nghiệm thức còn lại có HGKTTB tăng, cao nhất ở nghiệm thức tiêm 0,2 ml vắc xin/con ($5,56 \pm 1,24$) khác biệt có ý nghĩa ($P<0,05$) so với các nghiệm thức còn lại. Lượng kháng thể ở các nghiệm thức tiêm vắc xin vẫn duy trì ở mức cao hơn so với nghiệm thức không tiêm vắc xin sau 2 và 3 tuần cảm nhiễm.

Theo Nguyễn Thị Mộng Hoàng và ctv. (2009), việc tiêm nhắc vào ngày thứ 14 sẽ kích thích đáp ứng miễn dịch thứ phát nên kháng thể hình thành sớm, cao hơn và duy trì lâu hơn so kháng thể nguyên phát. Do đó, việc tiêm vi khuẩn có độc lực để gây cảm nhiễm cũng có vai trò như tiêm nhắc, nếu những cá thể trước đó đã sinh kháng thể đủ mạnh để chống lại mầm bệnh thì sẽ vượt qua sự tấn công của mầm bệnh cảm nhiễm và đáp ứng miễn dịch lần nữa sẽ nhanh, mạnh và duy trì khả năng miễn dịch trong thời gian dài hơn. Nghiên cứu của Vinitnantharat and Plumb (1993) cho thấy những cá sổng sót sau khi tiếp xúc với mầm bệnh sinh ra hàm lượng kháng thể cao và bảo vệ được cơ thể khi tiếp xúc lại với mầm bệnh.

4 KẾT LUẬN

Trong điều kiện phòng thí nghiệm, vắc xin *Streptococcus agalactiae* bất hoạt ở mật độ 10^8

Kết quả cho thấy cá rô phi có đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với vắc xin *S. agalactiae* bất hoạt. Trong nghiên cứu vắc xin Aquavac Strep, sa phòng bệnh vi khuẩn *S. agalactiae* ở cá điều hồng của Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thị Kiều (2013), HGKTTB sau khi tiêm vắc xin tăng so với nghiệm thức không tiêm vắc xin. Ngoài ra, lượng kháng nguyên cao có khả năng kích thích miễn dịch mạnh hơn, hàm lượng kháng thể trong đáp ứng miễn dịch nguyên phát có tương quan thuận với lượng kháng nguyên đưa vào cơ thể (Đỗ Thị Hòa và ctv., 2004).

CFU/ml có khả năng kích thích hệ miễn dịch ở cá rô phi (cỡ 20 – 25 gram/con), bắt đầu từ 1 tuần và kéo dài ít nhất đến 4 tuần sau khi tiêm. Sau 3 tuần tiêm vắc xin, các chỉ tiêu huyết học và hiệu giá kháng thể trung bình ở cá tiêm vắc xin đều tăng có ý nghĩa thống kê so với cá không tiêm vắc xin. Chỉ số bảo hộ của vắc xin là 88,1% cho cả hai liều tiêm là 0,1 ml/con và 0,2 ml/con.

LỜI CẢM ƠN

Các nội dung nghiên cứu trong bài báo này được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài “Nghiên cứu, đề xuất quy trình chẩn đoán, phòng và trị bệnh cá Điều hồng (*Oreochromis sp.*) nuôi trong bè ở tỉnh Vĩnh Long” (Hợp đồng số: 02/HĐ-2017) do Sở Khoa học và Công nghệ, tỉnh Vĩnh Long cấp kinh phí.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đỗ Thị Hòa, Bùi Quang Tề, Nguyễn Hữu Dũng và Nguyễn Thị Muội, 2004. Bệnh học thủy sản, nhà xuất bản Nông Nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh. 240 trang.
 Chen, M., Wang, R., Li, L. P., et al., 2012. Screening vaccine candidate strains against *Streptococcus agalactiae* of tilapia based on PFGE genotype. Vaccine. 30(42): 6088-6092.

- Chinabut, S., Limsuwan, C. and Kitsawat, P., 1991. Histology of The Walking Catfish *Clarias Batrachus*. 96pp.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thị Kiều, 2013. Đáp ứng miễn dịch của cá điêu hồng (*Oreochromis sp.*) chủng vaccine aquavac strep sa. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 25: 11-18.
- Ellis, A. E., 1988. General principles of fish vaccination. In Ellis, A.E. (editor). Fish vaccination. Academic Press. San Diego.1-19.
- Evans, J. J., Klesius, P. H. and Shoemaker, C. A., 2004. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. Vaccine. 22(27): 3769-3773.
- 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.
- Hrubec, T. C., Cardinale, J. L. and Smith, S. A., 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis* hybrid). Veterinary Clinical Pathology. 29:7-12.
- Lê Thị Hoàng Mỹ, 2007. Tạo máu và sinh lý hồng cầu. Giáo trình huyết học và miễn dịch Trường Đại Học Y Dược Cần Thơ. 255 trang.
- McNulty, S. T., Klesius, P. H., Shoemaker, C. A. and Evans, J. J., 2003. Hematological changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Streptococcus iniae* by nare inoculation. Journal of World Aquaculture Society. 34 (3):418-422.
- Natt, M. P. and Herrick, C. A., 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. Poultry Science. 31:735-738.
- Nguyễn Thị Mộng Hoàng, Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Diễm Thu và Nguyễn Mạnh Thắng, 2009. Định danh và thăm dò đặc tính gây đáp ứng miễn dịch của tác nhân gây bệnh đốm trắng mù trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi ở Đồng Bằng Sông Cửu Long. Tuyển tập nghề cá Sông Cửu Long.
- Phạm Hồng Quân, Hồ Thu Thủy, Nguyễn Hữu Vũ, Huỳnh Thị Mỹ Lệ và Lê Văn Khoa, 2013. Một số đặc tính sinh học của vi khuẩn *Streptococcus sp.* gây bệnh xuất huyết ở cá rô phi nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. Tạp chí khoa học và phát triển. 4:506-513.
- Preto-Giordano, L. G., Muller, E. E., Klesius, P. and da Silva, V. G., 2010. Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. Aquaculture Research. 41: 1539-1544.
- Ranzani-Paiva, M. J. T., Ishikawa C. M., Eiras, A. C. and da Silveira, V. R., 2004. Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). Brazilian archives of biology and echnology. 47:945-953.
- Roberson, B. S., Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S. and Muiswinkel, W. B., 1990. Bacterial agglutination. In: Techniques in Fish Immunology. 81-86.
- Vinitnantharat, S. and Plumb, J. A., 1993. Protection of channel catfish *Ictalurus punctatus* following natural exposure to *Edwardsiella ictaluri* and effects of feeding antigen on antibody titer. Diseases of Aquatic Organisms. 15: 31-34.
- Vũ Triệu An và Homberg, J. C., 2001. Miễn Dịch Học. Nhà xuất bản y học Hà Nội. 488 trang.