

**TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG VẮC-XIN
PHÒNG BỆNH VI KHUẨN *AEROMONAS HYDROPHILA***

¹Nguyễn Thành Tâm*, ²Từ Thanh Dung và ¹Nguyễn Văn Bá
¹Đại học Tây Đô. ²Đại học Cần Thơ.

Mở đầu

Bệnh cá (đặc biệt là bệnh do *A. hydrophila* gây ra) là sự khó khăn đầu tiên trong việc phát triển nuôi nhiều đối tượng thủy sản có giá trị kinh tế. Đồng thời, việc sử dụng các phương tiện vận chuyển hiện đại, hiệu quả trong kinh doanh thủy sản tươi sống cũng dễ làm lây lan bệnh vào nhiều hệ thống nuôi và gây thiệt hại hơn 3 tỷ USD hàng năm cho ngành nuôi trồng thủy sản (Arthur, 1995 và He *et al.*, 1997). Do đó, tình hình nghiên cứu và ứng dụng vắc-xin phòng bệnh vi khuẩn *A. hydrophila* được thực hiện nhằm làm rõ hơn những hiểu biết về vắc-xin *A. hydrophila* và những giải pháp cho việc ứng dụng vắc-xin *A. hydrophila* một cách có hiệu quả hơn.

A. hydrophila là nhóm vi khuẩn hình que, có khả năng lên men, kích thước khoảng 0,8 - 1 x 1 - 3,5 μm , di động đơn thông qua một cực roi. Vi khuẩn này có thể sản sinh ra 2 loại roi: roi ở cực để bơi trong các dung dịch và roi ở bên để di chuyển trên các bề mặt (Altarriba *et al.*, 2003). Sự phát triển của *A. hydrophila* ở các khoảng nhiệt độ khác nhau: từ 4 - 42°C (Palumbo *et al.*, 1985). Figueiredo và Plumb (1977) cho rằng độc lực của *A. hydrophila* được phân lập từ nước không giống như độc lực của *A. hydrophila* được phân lập từ cá, nhưng cả 2 đều có những đặc điểm sinh hóa tương tự nhau. Vi khuẩn *A. hydrophila* tồn tại trong những hệ thống nuôi thủy sản trên toàn cầu, điều này thể hiện cho sự thích ứng của vi khuẩn trong môi trường nước (Hazen *et al.*, 1978b; Williams và LaRock, 1985). Sự lây nhiễm *A. hydrophila* là hậu quả của việc nuôi cá nước ngọt trên những khu vực có khí hậu ẩm áp (Torres *et al.*, 1990; Rahman *et al.*, 2001a; Hu *et al.*, 2005) đặc biệt là ở Trung Quốc và Ấn Độ (Karunasagar *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1992). Đây cũng là tác nhân gây bệnh quan trọng cho những người tiêu thụ các sản phẩm cá và giáp xác bị nhiễm *A. hydrophila* (Vivekanandhan *et al.*, 2005). Khả năng gây bệnh của *A. hydrophila* ở những loài cá khác nhau thì khác nhau, điều này chủ yếu là do tính không đồng dạng giữa các chủng, sự khác nhau về cơ chế tấn công và gây độc đối với những cơ thể cá bị nhiễm bệnh (Fang *et al.*, 2004).

Các dấu hiệu lâm sàng do *A. hydrophila* gây ra đã được xác định có 4 loại: thứ nhất là dấu hiệu cấp tính (nhiễm trùng huyết gây tử vong nhanh với một vài triệu chứng tổng quát), thứ hai là cơ thể bị trương nước cấp tính (da phồng, xù vẩy và áp xe), thứ ba là lở loét sâu vào cơ thể (những khối u nhọt, áp xe) và thứ tư là dấu hiệu tiềm tàng (không có triệu chứng) (Karunasagar *et al.*, 1989). Những sản phẩm ngoại bào của vi khuẩn *A. hydrophila* đã được quan tâm như là nhân tố chủ yếu gây độc lực của vi khuẩn (Allan và Stevenson, 1981; Ruangapan, 1986). Dòng *A. hydrophila* cũng sản xuất ra gelatinase, caseinase, elastase, lipase, lecithinase và deoxyribonuclease (Favre *et al.*, 1993). Những enzyme này có vai trò cung cấp dinh dưỡng cho vi khuẩn bằng cách phá vỡ các tế bào vật chủ thành các phân tử nhỏ và sau đó đi vào quá trình hình thành tế bào vi khuẩn (Cicmanec và Holder, 1979; Sakai, 1985).

Allan và Stevenson (1981) đã đưa ra kết luận là protease không phải là nhân tố gây độc lực chính. Độc tố tiêu huyết của *A. hydrophila* đã được quan tâm là nhân tố gây độc lực chính trong sản phẩm màng ngoài tế bào (ECP) của vi khuẩn này. Sự biểu hiện của các nhân tố độc lực trong ECP phụ thuộc vào môi trường dinh dưỡng sẵn có (Gonzalez-Serrano *et al.*, 2002). Sự sản sinh ra các thành phần trong các sản phẩm ngoại bào phụ thuộc vào nhiệt độ môi trường nuôi cấy. Những nhân tố gây độc lực như aerolysin, haemolysin, cytosine, enterotoxin, hoạt động phân giải protein,

THÀNH TỰU HOẠT ĐỘNG KH&CN

hoạt động thủy phân chất béo, gelatinase, sản xuất dịch nhờn và những peptide kháng khuẩn đã được xác định trong *A. hydrophila* (Asmat và Gires, 2002; Castro - Escarpulli *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2002; Illanchezian *et al.*, 2010). Có một số phương pháp xác định loại bệnh này như phương pháp truyền thống (hình thái và đặc điểm sinh hóa), miễn dịch học và kỹ thuật sinh học phân tử.

Kháng sinh là một trong những nhân tố chủ yếu để kiểm soát *A. hydrophila* (Fang *et al.*, 2004). Tỷ lệ kháng lại kháng sinh ngày càng cao đối với nhóm *A. hydrophila* được phân lập từ những loài cá nuôi, do áp lực mạnh về việc sử dụng hóa trị liệu trong nuôi cá công nghiệp. Trong khi đó, những dòng *A. hydrophila* được phân lập từ cá tự nhiên thì không có sự kháng lại kháng sinh (Aoki *et al.*, 1971; Radu *et al.*, 2003). Ngoài việc kháng kháng sinh, một số tác giả đã báo cáo về tác dụng phụ của việc sử dụng kháng sinh như việc tích lũy dư lượng tại các mô và làm giảm khả năng miễn dịch tự nhiên ở cá (Van Muiswinkel *et al.*, 1985; Ellis, 1988; Thompson và Adams, 2004). Những chất kích thích miễn dịch được chiết xuất chủ yếu từ thảo dược như polysaccharide và vitamin C giúp tăng cường hệ thống miễn dịch của cá để chống lại *A. hydrophila*. Một số dịch chiết từ những động vật biển có màng áo như Mực biển (*Ecteinascidia turbinata*) để làm tăng miễn dịch tế bào và miễn dịch dịch thể trên cá Chình Mỹ (*A. rostrata*) chống lại *A. hydrophila* (Davis và Hayasaka, 1984).

Hiện trạng nghiên cứu và ứng dụng vắc-xin *A. hydrophila* phòng bệnh cho cá nuôi (nước ngoài, trong nước)

Aeromonas hydrophila mà một trong những tác nhân gây tổn thất rất lớn cho ngành nuôi thủy sản thâm canh trong nhiều thập kỷ qua (Shotts *et al.*, 1972; Olivier *et al.*, 1981; Esteve *et al.*, 1995). Đã có nhiều nỗ lực được thực hiện nhằm phát triển một loại vắc-xin chống lại *A. hydrophila* một cách có hiệu quả (Lamers *et al.*, 1985; Baba *et al.*, 1988b; Leung *et al.*, 1997; Rahman và Kawai, 2000). Tuy nhiên, các tác giả đã quan sát thấy sự tăng tương đối cao lượng kháng thể trong nhóm cá được tiêm vắc-xin, tỷ lệ chết thấp hơn so với cá không được tiêm vắc-xin. Một trong những nguyên nhân có thể là ảnh hưởng của tình trạng stress của cá trong ao hay các kháng thể được sinh ra không có tính bảo vệ.

Màng sinh học đã được bất hoạt bởi nhiệt để tạo ra vắc-xin màng sinh học chống lại *A. hydrophila* được bổ sung vào thức ăn. Vijayaragavan Thangaviji *et al.* (2012), sử dụng vắc-xin *Aeromonas* dạng protein và vắc-xin kết hợp chất bổ thể để đánh giá sự miễn dịch của cá Vàng (*Carassius auratus*) bằng phương pháp tiêm định kỳ 10 ngày/lần/2 #g/g trọng lượng cơ thể cá. Các chỉ tiêu: sự thực bào, tỷ lệ Albumin: Globulin, hoạt động kháng khuẩn của huyết thanh của nghiệm thức vắc-xin và nghiệm thức vắc-xin + chất bổ thể đều cao và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) so với nghiệm thức đối chứng. Kamelia *et al.* (2009).

Nghiên cứu so sánh 2 hỗn hợp vắc-xin (hỗn hợp 1: *A. hydrophila* + *P. fluorescens*; hỗn hợp 2: *A. hydrophila* + *A. sobria* + *A. caviae* + *P. fluorescens*), khi ngâm cá rô phi giống (5-10g) trong dung dịch vắc-xin 30 phút và cho cá ăn vắc-xin trong 7 ngày rồi sau đó ương cá trong 4 tuần để đánh giá chất lượng vắc-xin. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống của cá ở hỗn hợp 1 là 80% và hỗn hợp 2 là 82% (phương pháp ngâm) và hỗn hợp 1 là 88% và 74% ở hỗn hợp 2 (phương pháp cho ăn).

Tại Việt Nam, những năm gần đây vắc-xin trên cá cũng được sử dụng nhiều như vắc-xin chống lại vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* (ALPHA JECT ® Panga 1). Cao Thành Trung và Chih Chu Chen (2012) sử dụng Glyxerin-andehyt-3-photphat-dehydrogenaza (GAPDH) "một sản phẩm màng ngoài của tế bào vi khuẩn *E. ictaluri*", vắc xin protein GAPDH tái tổ hợp, để kháng lại bệnh *Edwardsiellois* trên cá rô phi do *Edwardsiella tarda* gây ra. Vắc xin protein GAPDH tái tổ hợp được xem như một vắc xin có khả năng trong phòng ngừa vi khuẩn gây bệnh *Edwardsiellois* trên

THÀNH TỰU HOẠT ĐỘNG KH&CN

cá rô phi do *E. tarda* gây ra. Tuy nhiên, ở Việt Nam đến nay chưa nghiên cứu sử dụng vaccin *A. hydrophila*.

Những giải pháp cho việc sử dụng vắc-xin *A. hydrophila* hiệu quả

Nhiều nhân tố được quan tâm cho sự phát triển hiệu quả của vắc-xin. Một vắc-xin được sản xuất để bảo vệ và không gây ra bất kỳ tác dụng phụ nào cho vật chủ (Makela, 2000; Potter và Babiuk, 2001; Schuijffel *et al.*, 2005). Ngoài ra, vắc-xin còn phải mang tính hiệu quả kinh tế cho việc nuôi trồng thủy sản thâm canh trên toàn cầu (Leong và Munn, 1991; Munn, 1994; Naidu và Yadav, 1997). Các Vắc-xin cho *A. hydrophila* đã được phát triển bởi một số nhà nghiên cứu đường như không hoàn toàn hiệu quả khi áp dụng ngoài thực tế, có thể là do tính không đồng nhất của những dòng được phân lập. Các tác giả đã đề xuất nên nghiên cứu một kháng nguyên chung giữa các dòng *A. hydrophila* để điều chế vắc-xin hiệu quả (Dooley *et al.*, 1988; Leung *et al.*, 2010).

Những hiểu biết về tương tác của tác nhân gây bệnh lên vật chủ đặc biệt là đáp ứng miễn dịch của vật chủ đối với tác nhân gây bệnh có thể cung cấp manh mối quan trọng về khả năng bảo vệ của kháng nguyên để phát triển vắc-xin (Ellis, 1999). Những phân tử như vậy có xu hướng là độc tố ECP và protein trên bề mặt của tác nhân gây bệnh. Loghothetis và Austin (1996b) đã đề nghị rằng lipoprotein ngoại bào (LPS) như là vắc-xin có tiềm năng khi họ tìm thấy sự gia tăng kháng thể chống lại những thành phần này ở cá Hồi Vân nhiễm *A. hydrophila*. Tương tự như vậy, các thành phần trên bề mặt của vi khuẩn gây bệnh này, như OMPs được đề nghị rộng rãi như là một mục tiêu hấp dẫn cho vắc-xin (do sự tham gia của chúng trong quá trình lây nhiễm bệnh) (Esteve *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2000). Gần đây, Maji *et al.* (2006) đã đề xuất sử dụng protein 23 và 57 kDa được tìm thấy trong thành phần protein màng ngoài (OMP) của *A. hydrophila*.

Nghiên cứu về protein: kết hợp phương pháp Western blot với kỹ thuật đo khối quang phổ đã được công nhận là công cụ hữu ích cho việc định danh protein và rất cần thiết cho sự phát triển của vắc-xin (Chen *et al.*, 2004).

Công nghệ tái tổ hợp AND cho phép sản xuất nhanh chóng số lượng lớn các protein so với phương pháp truyền thống (Munn, 1994; Chakravarti *et al.* 2000; Potter và Babiuk, 2001; Van den Bergh và Arckens, 2005). Vắc-xin protein tái tổ hợp đã cho thấy có sự chống lại hàng loạt các tác nhân gây bệnh trên người và động vật (bao gồm cả cá) như *Yersinia pestis* (Williamson *et al.*, 1995), *Ichthyophthirius multifiliis* (He *et al.*, 1997), Rabies virus (Rupprecht *et al.*, 2005), Plasmodium falciparum (Saul *et al.*, 2005) và *Piscirickettsia salmonis* (Wilhelm *et al.*, 2006).

Kết luận

Nhóm *Aeromonas* được chia làm 2 nhóm: nhóm di động và nhóm không di động. Nhóm di động nhờ có 2 roi và gây bệnh chủ yếu trên cá như: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*. *Aeromonas* di động có khả năng thích nghi ở khoảng nhiệt độ rộng: 4 – 42° C. Đặc điểm sinh hóa tương đồng cao giữa các nhóm *A. hydrophila* trong môi trường nước và trên mẫu cá bệnh và không tương quan đến khả năng sinh độc lực và dạng plasmid của vi khuẩn. *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá động vật và con người. Có 4 triệu chứng dấu hiệu lâm sàng: (1)-Dấu hiệu cấp tính, (2)-Dấu hiệu cơ thể bị trương nước cấp tính, (3)-Dấu hiệu lở loét sâu vào cơ thể, (4)-Dấu hiệu tiềm tàng. Có nhiều độc tố sinh ra từ sản phẩm ngoại bào nhưng quan trọng nhất và đang được nghiên cứu nhiều nhất là sản phẩm protease. Chẩn đoán *A. hydrophila* dựa trên dấu hiệu bệnh lý (khó khăn), định danh theo phương pháp truyền thống, phương pháp miễn dịch học (ELISA) và phương pháp sinh học phân tử (giải trình tự gen). Kiểm soát *A. hydrophila* bằng kháng sinh sẽ gây ra hiện tượng kháng kháng sinh của vi khuẩn và ảnh hưởng đến kinh tế, người tiêu dùng. Sử dụng chất kích thích miễn dịch để phòng bệnh thì chưa đạt hiệu quả cao. Có rất nhiều vắc-xin (đơn giá và đa giá) được nghiên cứu cho bệnh *A. hydrophila* gây ra: vắc-xin chết, vắc-xin nhược độc, vắc-xin màng sinh

THÀNH TỰU HOẠT ĐỘNG KH&CN

học, vắc-xin protein màng ngoài, DNA vắc-xin. Tuy nhiên, chưa có vắc-xin nào đáp ứng được yêu cầu thực tế cho ngành thủy sản.

Đề xuất

- Nghiên cứu chế vắc-xin vắc-xin không gây tác dụng phụ cho vật chủ.
- Nghiên cứu chế vắc-xin đáp ứng hiệu quả kinh tế.
- Nghiên cứu một kháng nguyên chung cho các dòng vi khuẩn.
- Nghiên cứu sâu về độc tố từ ECP để xác định độc tố chính của vi khuẩn.
- Nghiên cứu vắc-xin OMP để mang lại hiệu quả cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Altarriba M., Merino S., Gavin R., Canals R., Rabaan A., Shaw J.G. and Tomas J.M. (2003) A polar flagella operon (flg) of *Aeromonas hydrophila* contains genes required for lateral flagella expression. *Microbial Pathogenesis* 34, 249-259.
- Bacteriology 44, 687-701. Rustigan R. and Stuart C.A. (1943) Taxonomic relationships in the genus *Proteus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 53, 241-243.
- Caseltz F.H. (1966) *Pseudomonas-Aeromonas und ihre humanme-diznische bedeutung*, VEG Verlag Gustav Fischer. Jena.
- Farmer J.J. (1992) The family Vibrionaceae. In: *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, and applications* (Ed. by Balows A., Tr#per H.G., Dworkin M., Harder W. and Schleifer K.H.), Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 2938-2951.
- Frerichs G.N. (1989) Bacterial diseases of marine fish. *The Veterinary Record* 125, 315-318.
- Korbsrisate S., Dumnin S., Chawengkirttikul R., Gherunpong V., Eampokalap B., Gongviseisoog C., Janyapoon K., Lertpocasombat K. and Shimada T. (2002) Distribution of *Aeromonas hydrophila* serogroups in different clinical samples and the development of polyclonal antibodies for rapid identification of the genus *Aeromonas* by direct agglutination. *Microbiology and Immunology* 46, 875-879.