

BIẾN ĐỔI MÔ HỌC SAU KHI TIÊM VACCIN NHŨ DẦU TRÊN CÁ GIÒ *Rachycentron cadadum*

Cung Thị Lý¹, Phan Thị Vân^{1*}, Trần Ngọc Hùng²

¹*Viện nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1*

²*Trường Cán bộ Quản lý Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn 1*

Email*: phanvan@rial.org

Ngày gửi bài: 14.08.2014

Ngày chấp nhận: 29.11.2014

TÓM TẮT

Hầu hết các loại vaccin dùng trong nuôi trồng thủy sản hiện nay là vaccin vô hoạt. Mục đích của vaccin là nhằm tạo ra đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên đưa vào mà có thể kéo dài thời gian bảo hộ phòng bệnh. Để đạt được điều này, vaccin vô hoạt cần bổ sung thêm chất bổ trợ - adjuvant. Nhũ dầu được xem là chất bổ trợ quan trọng đối với vaccin thủy sản. Một số nghiên cứu về vaccin thủy sản ở nước ta cũng đã sử dụng nhũ dầu làm chất bổ trợ, tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào mô tả cơ chế tác dụng của vaccin nhũ dầu đối với cá. Nghiên cứu này sẽ đánh giá tác dụng của nhũ dầu qua những biến đổi mô học giai đoạn sớm sau tiêm vaccin. Vaccin vô hoạt nhũ dầu được tạo từ 3 chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* (vô hoạt bằng formalin phối trộn với nhũ dầu Montanide™ ISA 760 (Seppic)) sau đó tiêm cho cá giò *Rachycentron canadum*. Mẫu cá được thu định kỳ vào 7, 14 và 21 ngày sau tiêm vaccin, cố định trong dung dịch buffer formaline (10%) để nghiên cứu mô học. Tiến hành cắt mô, nhuộm H&E để quan sát những biến đổi cấu trúc mô do vaccin nhũ dầu gây ra. Kết quả nghiên cứu cho thấy mô cơ có tích tụ nhiều giọt dầu làm tổn thương cơ học các sợi cơ nhưng chưa thấy dấu hiệu của đáp ứng miễn dịch sau 7 ngày tiêm vaccin. Dấu hiệu đáp ứng miễn dịch bắt đầu xuất hiện rõ ở ngày thứ 14 với nhiều tế bào viêm bao quanh các giọt dầu và các u hạt - granuloma bắt đầu hình thành. Mô cơ tại vị trí tiêm bị tổn thương nghiêm trọng với sự xuất hiện của nhiều loại tế bào viêm khác nhau hình thành các u hạt rõ ràng hơn ở ngày thứ 21. Nghiên cứu cho thấy vaccin có chứa nhũ dầu có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tự nhiên nhưng đồng thời cũng gây những tác dụng phụ tại vị trí tiêm vaccin ở cá giò.

Từ khóa: Cá giò, granuloma, miễn dịch, vaccin, vibriosis.

Histopathological Changes Following Vaccination of Oil-Based Vaccine in Cobia *Rachycentron cadadum*

ASBTRACT

Most vaccines used in aquaculture are killed or inactivated pathogens. The goal of vaccination is the generation of immune response to administer antigen able to provide long - term protection against infection. To achieve this objective, it requires the addition of an adjuvant. Among adjuvants, oil adjuvants are the most common used for vaccine in aquaculture. However, there were few studies describing mechanism reaction to oil adjuvant in fish. This study injected killed a polyvalent vaccines imulsified with Montanide™ ISA 760 adjuvant against *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, and *V. harveyi* causing Vibriosis in cobia *Rachycentron canadum*. The muscular tissues at the injection site was sampled at day 7, 14 và 21 post vaccination and fixed by buffer formaline 10% for histological observations. Histological sections were cut and stained by H&E to observe structure changes caused by oil adjuvant. The result showed the the oil droplets deposited in the muscle and the muscular fibers were broken at the injection site 7 days post vaccination. At 14 dyas post vaccination the sign of immune response with inflammatory cells surrounding the oil droplets forming granuloma. The inflammatory lesions and granuloma were observed more obvious at y 21 days post vaccination. This study indicated that oil-based vaccine not only induced cellular immune response but also caused serious side - effects at the injection site in cobia.

Keywords: Cobia, granuloma, immune response, oil-based vaccine, vibriosis.

1. GIỚI THIỆU

Cá giò (*Rachycentron canadum*) là một đối tượng nuôi biển tiềm năng, nhưng sản lượng nuôi còn rất thấp (32.000 tấn năm 2009 - FAO, 2010). Dịch bệnh là một trong những nguyên nhân kìm hãm sự tăng trưởng sản lượng nuôi cá giò toàn cầu. Trong số các bệnh chủ yếu, bệnh do vi khuẩn vibrio (Vibriosis) là bệnh phổ biến nhất, làm thiệt hại 50% sản lượng cá giò trong đó 45% ở cá giống và đến 90% cá nuôi thương phẩm (Liu et al., 2004). Vi khuẩn vibrio gây bệnh cho cá thường là *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* và *V. vulnificus* (Rajan et al., 2001; Lopez et al., 2002). Vibriosis trên cá giò thường xảy ra khi có sự biến động về nhiệt độ lúc giao mùa giữa mùa Thu và mùa Đông, tỷ lệ chết dao động từ 50-80% (Phan Thị Vân và cs., 2006). Cá bị bệnh kém linh hoạt, bơi lơ dờ trên mặt nước, kém ăn hoặc bỏ ăn và chết rải rác kéo dài. Hiện tượng tróc vẩy, xuất huyết dưới da và nặng hơn là các vết loét ăn sâu vào cơ cá là những dấu hiệu đặc trưng của Vibriosis gây ra trên cá biển nói chung, trong đó có cá giò (Đỗ Thị Hòa và cs., 2008).

Vaccin đã và đang được nghiên cứu, ứng dụng khá phổ biến trong nuôi trồng thủy sản (NTTS) ở nhiều quốc gia (Evensen et al., 2004). Mục đích của vaccin là tạo ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu và kéo dài thời gian bảo hộ với tác nhân gây bệnh. Để đạt được mục tiêu đó, vaccin thường được bổ sung thêm thành phần gọi là chất bổ trợ - Adjuvant (Bomford, 1998). Hiện có khoảng hơn 100 loại chất bổ trợ khác nhau (Harold, 2014) trong đó nhũ dầu là một loại chất bổ trợ vaccin phổ biến nhất trong lĩnh vực NTTS. Nhũ dầu hoạt động giống như “kho chứa” kháng nguyên - kháng nguyên sẽ được lưu lại ở vị trí tiêm sau đó phóng tỏa dần ra ngoài theo thời gian; nhũ dầu cũng làm tăng cường khả năng trình diện của kháng nguyên cũng như điều phối kháng nguyên hoặc định hướng kích thích đáp ứng miễn dịch (Cox and Coulter, 1997). Nhũ dầu có những tác dụng tích cực nhưng cũng gây ra tác dụng phụ không mong muốn là tạo thành ổ viêm mãn tính dạng u hạt - granuloma. Trên cá Hồi Atlantic *Salmon salar* (Evensen et al., 2005), nghiên cứu cho thấy

trong các u hạt có lưu lại kháng nguyên (Mutoloki et al., 2004). Việc lưu lại các kháng nguyên tại vị trí tiêm vaccin trong các u hạt giải thích cho khả năng kéo dài thời gian gây kích thích đáp ứng của vaccin chứa chất bổ trợ là nhũ dầu.

Gần đây, vaccin vô hoạt nhũ dầu đã được nghiên cứu và phát triển từ việc kết hợp 3 chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* phòng Vibriosis trên cá giò (Phan Thị Vân và cs., 2012). Nghiên cứu thử nghiệm bước đầu cho thấy vaccin này có khả năng bảo hộ miễn dịch khá tốt. Nhưng những tác dụng phụ không mong muốn của loại vaccin này có xảy ra trên cá giò hay không thì vẫn chưa được làm rõ. Vì vậy, bài báo mô tả những biến đổi mô học sau tiêm vaccin vô hoạt nhũ dầu trên cá giò nhằm đề xuất giải pháp nâng cao hiệu quả của vaccin này.

2. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cá giò *Rachycentron canadum*, kích cỡ trung bình 17 ± 3 cm được cung cấp bởi Trung tâm Quốc gia Giống Hải sản miền Bắc, tại Xuân Đám, Cát Hải, Hải Phòng thuộc Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1.

Ba chủng có tính kháng nguyên cao thuộc các loài *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* và *V. harveyi* phân lập được từ cá giò bị Vibriosis - sản phẩm của Đề tài cấp nhà nước “Nghiên cứu và phát triển vaccin vô hoạt phòng Vibriosis trên cá giò *Rachycentron canadum* nuôi thương phẩm” do Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản chủ trì.

Nhũ dầu- Montanide™ ISA 760 được Seppic (<http://www.seppic.com>) cung cấp để thử nghiệm trong Đề tài cấp Nhà nước “Nghiên cứu và phát triển vaccin vô hoạt phòng Vibriosis trên cá Giò *Rachycentron canadum* nuôi”.

Phòng thí nghiệm ươm với đầy đủ hệ thống sục khí, nước mặn và bể composites có thể tích 2 m³/bể. Thuốc gây mê MS-222 dùng xử lý trước khi tiêm vaccin. Xilanh tiêm bán tự động với các kích cỡ đầu kim khác nhau.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chuẩn bị vaccin

Cấy một khuẩn lạc thuần vào môi trường lỏng Nutrient Broth Agar có bổ sung 2% NaCl. Nuôi cấy tăng sinh trong điều kiện 200 vòng/phút ở nhiệt độ 29°C trong vòng 24 giờ. Thu vi khuẩn bằng cách ly tâm tốc độ 5.000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ môi trường nuôi cấy thừa. Bất hoạt vi khuẩn bằng formalin 0,5% qua đêm và rửa lại 3 lần bằng nước muối sinh lý 0,85%. Trộn 3 chủng vi khuẩn đã bất hoạt này với nhau theo tỷ lệ 1:1:1 để tạo thành kháng nguyên hỗn hợp (10^9 cfu/ml). Kháng nguyên hỗn hợp này tiếp tục được nhũ hóa với dầu Montanide™ISA 760 theo tỷ lệ kháng nguyên và dầu là 70:30 tạo thành vaccin đa giá có liều kháng nguyên tương ứng là $0,7 \times 10^8$ cfu/ml.

2.2.2. Kiểm tra vô trùng vaccin

Cấy rìa vaccin trên 3 môi trường khác nhau gồm Nutrient Agar (NA) và Nutrient Broth (NB) và Thiosulphat Citrate Sait Sucrose Agar (TCBS), sau đó ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 30°C trong 24h. Vaccin đạt độ vô trùng khi không có khuẩn lạc mọc trên các môi trường NA và TCBS hoặc không làm thay đổi màu sắc môi trường NB.

2.2.3. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí với 1 nghiệm thức tiêm vaccin và 1 nghiệm thức tiêm nước muối sinh lý 0,85%. Mỗi nghiệm thức được bố trí với 15 cá giò *Rachycentron canadum* có kích cỡ 17cm, khỏe mạnh được nuôi thuần hóa trong điều kiện phòng thí nghiệm ứot có độ mặn 25‰ và nhiệt độ 30°C 1 tuần trước khi tiêm vaccin. Ngừng cho cá ăn 1 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm tiêm vaccin. Theo dõi biểu hiện của cá, chăm sóc và tiến hành thu mẫu định kỳ 5 cá

mỗi nghiệm thức lần lượt vào các ngày 7, 14 và 21 sau tiêm.

2.2.4. Tiêm vaccin

Để tránh gây sốc cho cá, tiến hành gây mê nhẹ bằng cách ngâm cá với 50ppm dung dịch MS-222 (Ross et al., 1999) sau đó tiêm với liều lượng 0,1 ml/cá vào cơ lưng. Sau tiêm 1 ngày, cho ăn lại bằng cá tạp nghiền nhỏ lượng vừa đủ mỗi ngày 2 lần vào buổi sáng sớm và chiều, duy trì chế độ sục khí 24/24h trong điều kiện phòng thí nghiệm ứot nhiệt độ dao động 26-27°C, độ mặn ổn định ở 30‰ và pH dao động 7,5-7,9 trong suốt quá trình nuôi. Định kỳ thu mẫu 4-5 cá thể lô có tiêm và không tiêm vaccin sau 7, 14 và 21 ngày để nghiên cứu biến đổi mô bệnh học.

2.2.5. Mô bệnh học

Ngay sau khi thu cá, sử dụng dao giải phẫu sắc để tách lấy phần cơ, quanh vị trí tiêm vaccin; đường kính x độ sâu: 1x1 cm, cố định trong dung dịch buffer formalin 10% theo tỷ lệ mẫu và dung dịch cố định là 1:10 (1 phần mẫu và 10 phần dung dịch cố định). Cố định mẫu trong buffer formalin sau 48 giờ chuyển sang cố định trong dung dịch cồn 70% trước khi xử lý mô học. Mẫu mô được xử lý, cắt và nhuộm H&E theo phương pháp chuẩn. Gắn tiêu bản bằng Basal Canada và đọc mẫu trên kính hiển vi Olympus CX31 (Nhật Bản).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Độ vô trùng của vaccin

Kết quả kiểm tra độ vô trùng cho thấy vaccin đa giá có độ vô trùng tuyệt đối - không có sự mọc lại của vi khuẩn trên các môi trường chọn lọc TCBS và cũng không có hiện tượng tạp nhiễm vi khuẩn trên môi trường NA và NB (Bảng 1). Vaccin đạt tiêu chuẩn vô trùng phù hợp để thử nghiệm trong nghiên cứu này.

Bảng 1. Kết quả kiểm tra độ vô trùng của vaccin vô hoạt

Môi trường thử vô trùng	Nutrient Agar	Nutrient Broth	TCBS
Đối chứng - nước muối sinh lý (0,85%)	-	-	-
Vaccin	-	-	-

3.2. Tỷ lệ sống của cá sau tiêm vaccin

Cá được tiêm vaccin hoặc nước muối sinh lý không có biểu hiện khác nhau sau khi tiêm, cá bắt đầu ăn trở lại bình thường sau 1 ngày tiêm. Tỷ lệ sống của cá sau 7, 14, và 21 ngày là 100% không có sự khác biệt giữa hai loại (Bảng 2). Kết quả này cho thấy trong điều kiện thí nghiệm vaccin vô hoạt có nhũ dầu đảm bảo độ an toàn cao với cá giò.

3.3. Biến đổi mô học sau tiêm vaccin

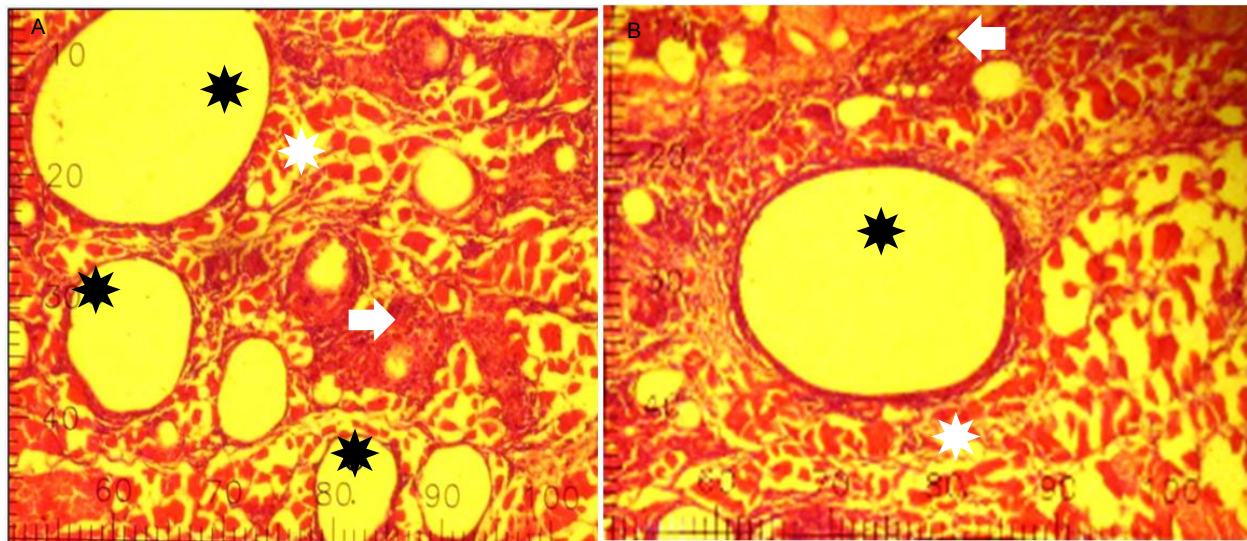
Kết quả nghiên cứu mô bệnh học cho thấy, có sự biến đổi mô bệnh học đặc trưng trên mô cơ cá quanh vị trí tiêm sau 7 ngày tiêm vaccin vô hoạt. Điển hình là hiện tượng tích tụ nhiều giọt dầu với kích thước khác nhau cùng với dấu hiệu đứt gãy các sợi cơ làm cho liên kết mô cơ tại đây rời rạc. Mặc dù vậy, ở giai đoạn này chưa thấy xuất hiện nhiều tế bào viêm ngoài

một số ít tế bào eosinophilic nằm lẫn trong dịch bào tương xen kẽ ở giữa các sợi cơ bị đứt gãy (Hình 1).

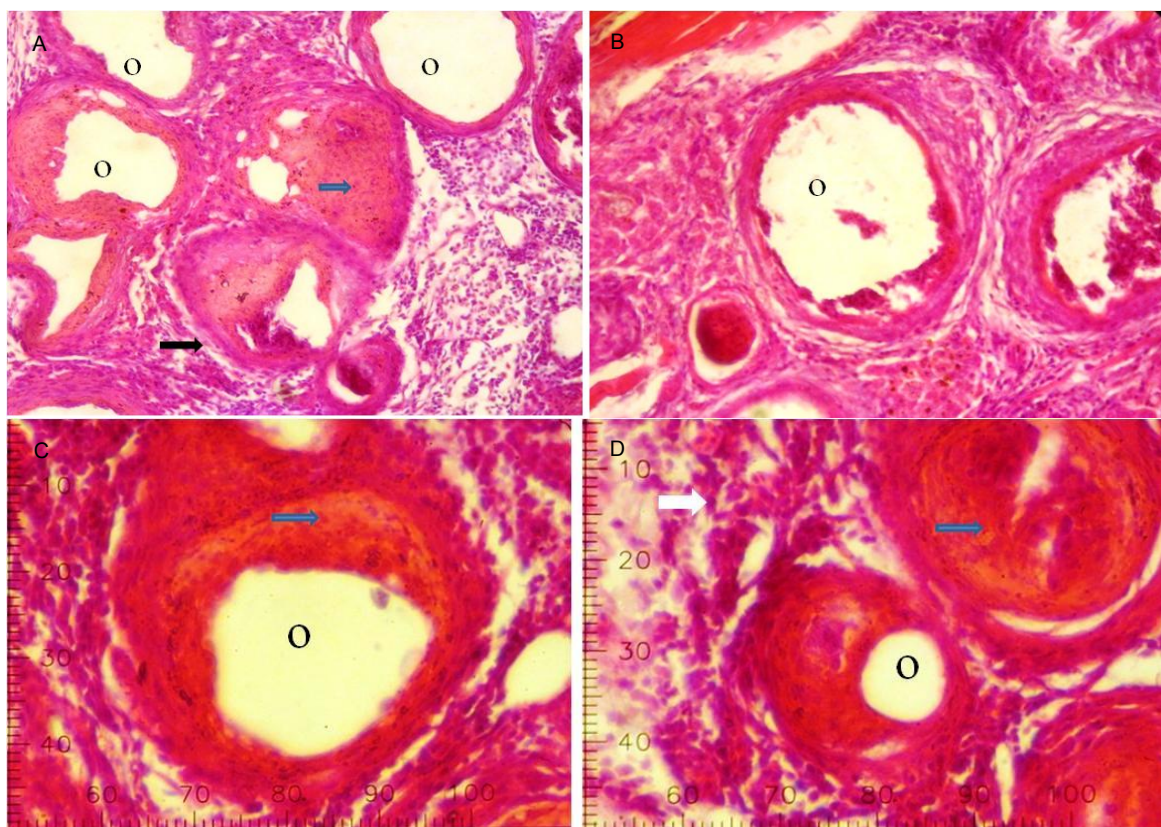
Ở ngày thứ 7, hầu như chỉ quan sát thấy những tổn thương cơ học vùng cơ tại vị trí tiêm, nhưng ngày thứ 14, đáp ứng miễn dịch tự nhiên đã thấy rõ hơn. Xung quanh các giọt dầu chứa nhiều dịch bào tương xâm lấn có xu hướng lấp đầy giọt dầu. Vùng ngoại vi bắt đầu xuất hiện nhiều tế bào viêm tạo ra các vùng tổn thương lan tỏa tại vị trí tiêm vaccin. Các tế bào viêm chủ yếu là các bạch cầu ưu kiềm - neutrophil, một số là đại thực bào - macrophages hướng đến các giọt dầu chứa kháng nguyên dần hình thành nên các granuloma (u hạt). Granuloma được quan sát khá rõ sau 14 ngày tiêm vaccin vô hoạt có nhũ dầu. Cấu trúc mô cơ đã biến đổi hoàn toàn - không còn thấy các sợi cơ như ngày thứ 7 sau tiêm vaccin (Hình 2).

Bảng 2. Tỷ lệ sống của cá sau tiêm vaccin và nước muối sinh lý

Thí nghiệm	Tỷ lệ sống sau tiêm vaccin (%)		
	7 ngày	14 ngày	21 ngày
Đối chứng - nước muối sinh lý (0,85%)	100 (15/15)	100 (10/10)	100 (5/5)
Vaccin	100 (15/15)	100 (10/10)	/5)



Hình 1. Cấu trúc mô cơ cá sau 7 ngày tiêm vaccin (phóng đại 40X), giọt dầu tích tụ tại vị trí tiêm vaccin (dấu hoa thị màu đen), vùng sợi cơ bị đứt gãy (hoa thị màu trắng) và tế bào viêm - eosinophilic (mũi tên màu trắng)

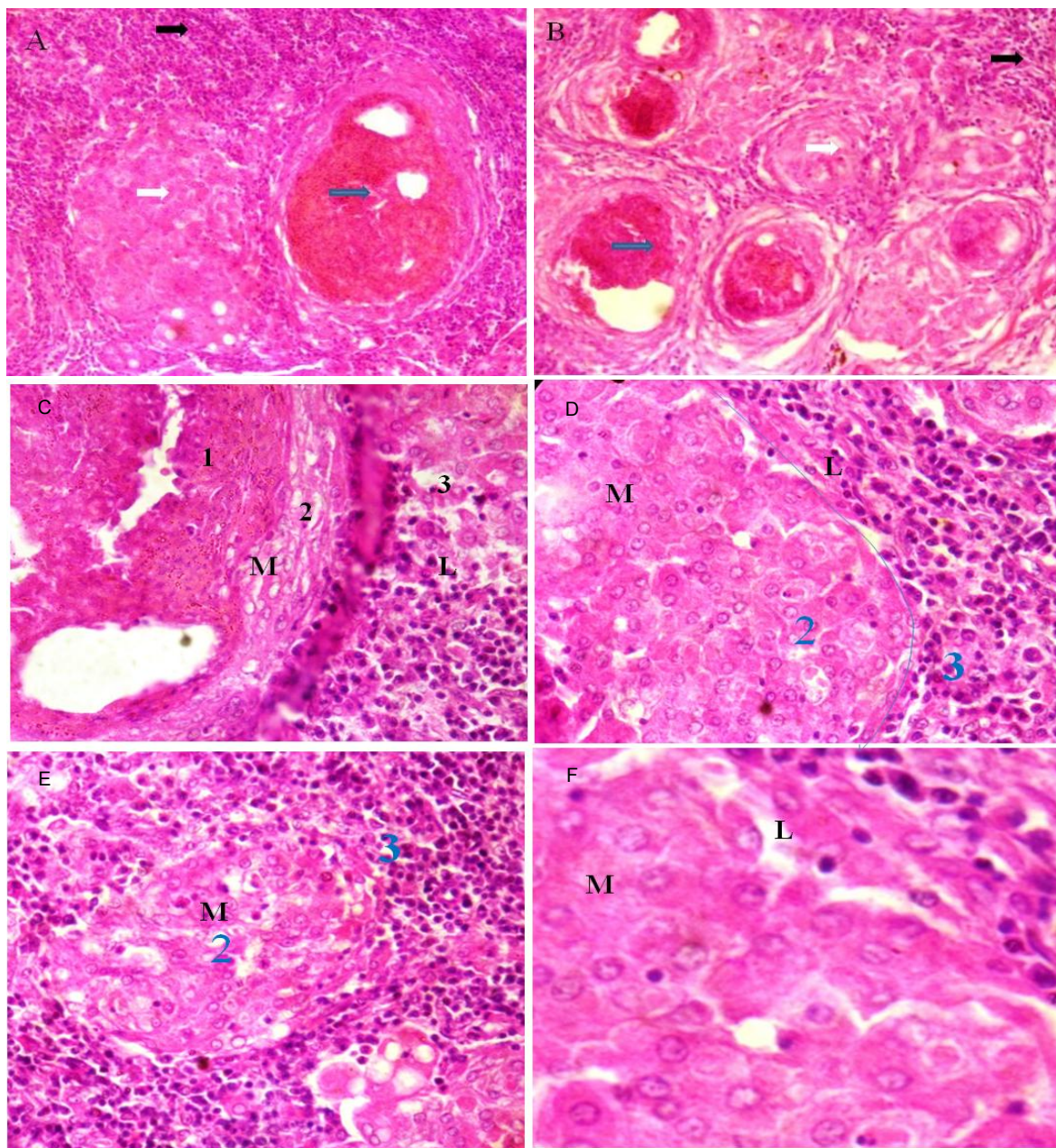


Hình 2. Cấu trúc mô cơ tại vị trí tiêm vaccin sau 14 ngày (phóng đại 40X); giọt dầu (hoa thị màu đen), granuloma (mũi tên màu đen), tế bào viêm (mũi tên màu trắng)

Đến ngày thứ 21, vẫn còn tồn tại một số ít giọt dầu nhưng kích thước giảm đi khá nhiều, các granuloma hình thành rõ hơn do các tế bào viêm xuất hiện với mật độ dày hơn. Các tế bào viêm lúc này ngoài neutrophil và macrophages còn quan sát thấy nhiều tế bào lymphocytes ở phía ngoại vi granuloma (Hình 3C, D, E, F). Hầu hết các giọt dầu quan sát được trước đó ở ngày thứ 7 và 14 đã bị xâm thực hoàn toàn bởi các tế bào viêm neutrophil, macrophages và lymphocytes cùng với dịch bào tương chứa protein bắt màu hồng nằm chính giữa các granuloma (Hình 3A, B).

Nhũ dầu hiện là chất bổ trợ dùng phổ biến trong vaccin thủy sản, có tác dụng gây kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh hơn và kéo dài thời gian bảo hộ của vaccin. Cơ chế duy trì thời gian đáp ứng miễn dịch của nhũ dầu là do kháng nguyên được chứa trong nhũ dầu tồn lưu tại vị trí tiêm. Vì thế kháng nguyên đã không giải phóng cùng một lúc mà giải phóng một cách

từ từ làm cho hệ miễn dịch luôn nhận được thông tin về kháng nguyên. Sau 7 ngày tiêm vaccin có nhũ dầu Montanide™ ISA 760 cho cá giò chúng tôi đã quan sát thấy nhiều giọt dầu, tuy nhiên chưa thấy rõ phản ứng viêm do đáp ứng miễn dịch tế bào tự nhiên. Điều này có thể giải thích rằng chỉ có một lượng nhỏ kháng nguyên được giải phóng ra ngoài mô cơ cá trong khi phần lớn vẫn bị bao gói trong giọt nhũ dầu. Như vậy, có thể phản ứng viêm của loại vaccin có chứa nhũ dầu này diễn ra chậm. Thông thường tế bào viêm như neutrophil sẽ có mặt rất nhanh, ngay sau 1 giờ tiêm tác nhân gây viêm và số lượng sẽ đạt cực đại sau 48 giờ (Afonso et al., 1998). Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, neutrophil và eosophil xuất hiện ít ở ngày thứ 7, đến ngày thứ 14 và 21 số lượng của các tế bào này mới tăng lên. Trên cá Hồi, Mutoloki và cộng sự (2006) cũng quan sát thấy được các tế bào viêm nhỏ, đường kính 7 - 10µm, nhân lệch về một phía, đôi khi có vệt lõm, rất ít



Hình 3. Biến đổi mô cơ cá tại vị trí tiêm vaccin sau 21 ngày

Ghi chú: A, B (40X): mũi tên 2 đầu màu trắng (granuloma); mũi tên đen (tế bào viêm); mũi tên trắng (vùng tổn thương do sự tương tác giữa thực bào và kháng nguyên); C, D, E, F (100X): dấu sao (các vùng viêm - tổn thương quanh vị trí tiêm với các lớp tế bào viêm, trong đó M: macrophages, L: lymphocytes)

tế bào chất. Các tế bào viêm khác nhau tạo thành hàng rào bao quanh ổ viêm nhằm bao vây, cô lập không cho ổ viêm lan rộng. Vaccin dầu gây đáp ứng miễn dịch tế bào khá sớm trên cá tuyết (*Gadus morhua*), ngay tuần đầu tiên đã xuất hiện nhiều tế bào neutrophil và granuloma đã hình thành rất rõ (Mutoloki et al., 2008).

Khả năng gây đáp ứng miễn dịch của các loại vaccin cũng tùy thuộc vào loài cá, kích cỡ và phương pháp dùng vaccin. Nghiên cứu hiệu giá kháng thể của vaccin vô hoạt có nhũ dầu trên cá giò, Phan Thị Vân (2012) báo cáo hiệu giá kháng thể của vaccin sau 7 ngày tiêm không thay đổi nhưng chỉ số này đã tăng lên sau ngày

thứ 14 và vẫn ổn định ở ngày thứ 21. Kết quả này có thể giải thích qua nghiên cứu của chúng tôi; ở ngày thứ 7 chưa xuất hiện nhiều tế bào viêm nên chưa xảy ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu, do đó lượng kháng thể không thay đổi. Số lượng tế bào viêm tăng lên nhiều ở ngày thứ 14 và 21 do lúc này cơ chế đáp ứng miễn dịch đặc hiệu đã xảy ra nên hiệu giá kháng thể của vaccin đã tăng lên.

Vaccin nhũ dầu cũng có những tác dụng phụ không mong muốn. Hiện tượng dính nội tạng với thành khoang bụng trên cá hồi ở nhiều mức độ khác nhau cũng gây ra bởi loại vaccin này. Nghiên cứu biến đổi cấu trúc mô tại vị trí tiêm vaccin thấy hiện tượng viêm mãn tính với các u hạt granuloma kéo dài nhiều tuần sau tiêm ảnh hưởng đến khả năng tăng trưởng của cá và giá trị thương phẩm của sản phẩm (Mutoloki et al., 2004; Evensen et al., 2005; Mutoloki et al., 2008). Nghiên cứu của chúng tôi cũng ghi nhận những biến đổi mô học tương tự tại vị trí tiêm ở giai đoạn sớm sau khi tiêm vaccin; ban đầu (7 ngày) là tổn thương cơ học làm đứt gãy các sợi cơ, (14, 21 ngày) sau là hậu quả dẫn đến viêm mãn tính với các granuloma quanh các giọt dầu.

4. KẾT LUẬN

Vaccin vô hoạt vi khuẩn (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi*) nhũ dầu (Montanide™ ISA 760) có độ vô trùng và an toàn cao, tuy nhiên, vaccin này gây tác dụng phụ tạo thành các ổ viêm mãn tính cục bộ dạng u hạt (granuloma) xung quanh vị trí tiêm vaccin trên cơ lưng của cá giò *Rachycentron canadum*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Afonso CL, Zsak L, Carrillo C, Borca MV, Rock DL (1998). African swine fever virus NL gene is not required for virus virulence. J Gen Virol., 79: 2543-257.
- Bomford, R. (1998). Will adjuvants be needed for vaccines of the future. Dev Biol Stand, 92: 13-17.
- Cox, J.C., Coulter, A.R. (1997). Adjuvants--a classification and review of their modes of action. Vaccine, 15: 248-256.
- Đỗ Thị Hòa, Trần Vũ Hích, Nguyễn Thị Thùy Giang, Phan Văn Út, Nguyễn Thị Nguyệt Huệ (2008). Các loại bệnh thường gặp trên cá biển tại Khánh Hòa. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Thủy sản, Trường Đại học Nha Trang, 2: 16-24.
- Evensen, O., Brudeseth, B., Mutoloki, S., (2005). The vaccine formulation and its role in inflammatory processes in fish--effects and effects. Dev Biol (Basel), 121: 117-125.
- FAO. (2010). The State of World Fisheries and Aquaculture (2010). Rome. p.197
- Harold F. Stills, Jr. (2014). Adjuvants and antibody production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other adjuvants. ILAR Journal, 46 (3): 280-293
- Liu P.C, Lin. J.Y, Hsiao. P.T and Lee. K.K. (2004). Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum*, J. Basic Microbiol, 44: 23-28.
- Lopez, C., Rajan, P.R., Lin, J.H.Y., Kuo, T.Y. & Yang, H.L. (2002). Disease outbreak in sea-farmed cobia (*Rachycentron canadum*) associated with *Vibrio* spp., *Photobacterium damsela* ssp. piscicida, monogenean and myxosporean parasites. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 22: 206-211
- Mutoloki, S., Alexandersen, S., Evensen, O. (2004). Sequential study of antigen persistence and concomitant inflammatory reactions relative to side-effects and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following intraperitoneal injection with oil-adjuvanted vaccines. Fish Shellfish Immunol, 16: 633-644.
- Phan Thị Vân, Nguyễn Thị Hà, Trần Thị Kim Chi và Trương Mỹ Hạnh (2006). Nghiên cứu tác nhân gây bệnh phổ biến đối với cá Mú, cá Giò nuôi và đề xuất các giải pháp phòng và trị bệnh. Báo cáo tổng kết đề tài (2003-2005). Viện Nghiên cứu nuôi trồng Thủy sản 1.
- Phan Thị Vân, Võ Anh Tú, Nguyễn Thị Hạnh, Nguyễn Thị Thu Hương và Đào Xuân Trường (2012). Báo cáo tổng kết Đề tài cấp nhà nước "Nghiên cứu và phát triển vaccin vô hoạt phòng bệnh Vibriosis trên cá Giò *Rachycentron canadum* nuôi". Cơ quan chủ quản là Viện nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1.
- Rajan J.P.R., Lopez, C., Lin, J.H.Y. and Yang, H.L. (2001). *Vibrio alginolyticus* infection in Cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in Taiwan. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 21: 228-234.
- Ross, Linda G., and Barbera Ross (1999). Anesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Science.