

**NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG VI HẠT EUDRAGIT E100 LÀM CHẤT BỌC  
VACCINE *Vibrio alginolyticus* BẤT HOẠT SỬ DỤNG QUA ĐƯỜNG  
THỨC ĂN ĐỂ PHÒNG BỆNH XUẤT HUYẾT CHO CÁ HỒNG MỸ  
(*Sciaenops ocellatus*)**

**Nguyễn Ngọc Phước\*, Nguyễn Nam Quang, Nguyễn Đức Quỳnh Anh,  
Nguyễn Thị Huệ Linh, Nguyễn Thị Xuân Hồng**  
Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

\*Tác giả liên hệ: nguyennngocphuoc@huaf.edu.vn; nguyennngocphuoc@hueuni.edu.vn

Nhận bài: 10/12/2024 Hoàn thành phản biện: 14/01/2025 Chấp nhận bài: 20/01/2025

**TÓM TẮT**

Bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* là một trong những thách thức lớn nhất cho nghề nuôi cá Hồng mỹ (*Sciaenops ocellatus*) ở Việt Nam. Việc phát triển loại vaccine có thể sử dụng qua đường thức ăn là cần thiết để giảm thiểu việc sử dụng kháng sinh và thiệt hại trong nghề nuôi cá. Nghiên cứu được thực hiện nhằm phát triển vaccine qua đường thức ăn, chỉ giải phóng vaccine tại vị trí hoạt động, tức là trong đường tiêu hóa của cá. Khảo sát pH trong hệ thống tiêu hoá ở cá Hồng mỹ trước và sau khi cho ăn 30 phút cho thấy pH thay đổi rõ rệt từ pH có giá trị trung tính ở miệng, giảm đến acid rất thấp ở dạ dày, sau đó tăng trở lại trung tính và hơi kiềm ở đường ruột. Nghiên cứu đã tiến hành bọc *V. alginolyticus* bất hoạt bằng formalin trong các vi hạt Eudragit E100. Việc tiếp xúc với môi trường acid mô phỏng điều kiện dạ dày cá cho thấy kích thước của các vi hạt chứa vaccine giảm nhanh chóng, phản ánh sự phân giải của vi hạt và giải phóng vaccine. Vi hạt không giải phóng vaccine ở điều kiện pH ≥ 6. Kết quả này cho thấy tiềm năng của việc ứng dụng Eudragit E100 vào việc phát triển vaccine qua đường thức ăn để phòng bệnh do vi khuẩn *V. alginolyticus* gây ra trên cá Hồng mỹ.

**Từ khóa:** Bao hạt, Bệnh *Vibrio*, Cá biển, Vaccine, Vi khuẩn

**STUDY ON THE USE OF MICROPARTICLES EUDRAGIT E100 AS A  
COATING MATERIAL FOR INACTIVATED *Vibrio alginolyticus* VACCINE  
ADMINISTERED VIA FEED TO PREVENT HEMORRHAGIC DISEASE IN  
RED DRUM (*Sciaenops ocellatus*)**

**Nguyen Ngoc Phuoc\*, Nguyen Nam Quang, Nguyen Duc Quynh Anh,  
Nguyen Thi Hue Linh, Nguyen Thi Xuan Hong**  
University of Agriculture and Forestry, Hue University

\*Corresponding author: nguyennngocphuoc@huaf.edu.vn; nguyennngocphuoc@hueuni.edu.vn

Received: December 10, 2024 Revised: January 14, 2025 Accepted: January 20, 2025

**ABSTRACT**

Hemorrhagic disease caused by *Vibrio alginolyticus* is one of the biggest challenges for farming Red drum (*Sciaenops ocellatus*) in Vietnam. Developing a feed-based vaccine is essential to reduce antibiotic use and minimize losses in fish farming. The study aimed to develop a feed-based vaccine that only releases its contents at the site of action, i.e., in the fish's gastrointestinal tract. pH measurements taken from the digestive system of Red drum before and one hour and thirty minutes after feeding showed a distinct change in pH from a neutral value in the mouth, decreasing to a very low acidic pH in the stomach, then increasing back to neutral and slightly alkaline in the intestine. The study encapsulated formalin-inactivated *V. alginolyticus* within Eudragit E100 microparticles. Exposure to an acidic environment simulating the conditions of the fish stomach showed that the size of the vaccine-loaded microparticles decreased rapidly, reflecting the degradation of the microparticles and the release of the vaccine. The microparticles did not release the vaccine at pH ≥ 6. These results highlight the potential application of Eudragit E100 in the development of a feed-based vaccine to prevent *Vibrio alginolyticus*-induced disease in Red drum.

**Keywords:** Bacteria, Encapsulation, Marine fish, Vaccine, Vibrios

## 1. MỞ ĐẦU

Cá là nhóm động vật có xương sống lớn nhất và đa dạng nhất, đồng thời là nguồn cung cấp protein động vật chủ yếu từ thủy sản trên toàn cầu. Bên cạnh ngành khai thác thủy sản, nuôi trồng thủy sản cũng đóng vai trò quan trọng trong việc đáp ứng nhu cầu thực phẩm trên toàn thế giới (Zhou và cs., 2024; Gillespie và van den Bold, 2017; Near và cs., 2012). Cá Hồng mỹ (*Sciaenops ocellatus*) thuộc họ *Sciaenidae* được nuôi chủ yếu ở Đại Tây Dương và Vịnh Mexico (Zhang và Sun, 2011). Với tốc độ sinh trưởng nhanh, khả năng thích nghi cao với môi trường và là loài cá có giá trị dinh dưỡng cao, cá Hồng mỹ đã được di nhập và trở thành đối tượng nuôi thủy sản chủ lực của nhiều nước châu Á, trong đó có Việt Nam. Vì vậy, từ năm 2018, cá Hồng mỹ được đưa vào danh sách là một trong những đối tượng nuôi biển chủ lực của Việt Nam (Quyết định số 50/2018/QĐ-TTg ngày 13 tháng 12 năm 2018; Phạm Thị Hải Yến và cs., 2021; Yen và cs., 2021; Zhang và Sun, 2011). Tuy nhiên, cùng với sự mở rộng của ngành nuôi trồng thủy sản, nhiều bệnh do vi khuẩn, ký sinh trùng và virus đã xuất hiện. Trong số đó, bệnh Vibriosis đã được xem là một trong những bệnh vi khuẩn thường gặp nhất ở cá biển (Zhou và cs., 2024; Mohamad và cs., 2019).

Vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* thuộc chi *Vibrio*, tồn tại rộng rãi trong các môi trường nước biển, và là tác nhân gây bệnh phổ biến đối với các loài động vật thủy sản nước mặn, lợi đặc biệt là cá Hồng mỹ (Mohamad và cs., 2019; Cao và cs., 2018; Damir và cs., 2013; Sadok và cs., 2013). Sự nhiễm trùng do *V. alginolyticus* có thể gây ra tỷ lệ chết cao ở nhiều loài cá, thường đi kèm với dấu hiệu xuất huyết và các vết loét trên bề mặt cơ thể cá (Zhou và cs., 2024; Yen và cs., 2021; Phạm Thị Hải Yến và cs., 2019; Phạm Thị Hải Yến và cs., 2021; Đặng

Thanh Long và cs., 2019). Cho đến nay, nhiều nghiên cứu đã phát hiện vi khuẩn *V. alginolyticus* gây bệnh trên hàng trăm loài cá biển khác nhau trên thế giới (Zhou và cs., 2024; Cao và cs., 2018). Để kiểm soát dịch bệnh do vi khuẩn trên động vật thủy sản, kháng sinh thường được sử dụng bằng cách trộn vào thức ăn cho động vật nuôi, đặc biệt là ở các quốc gia có thu nhập thấp và trung bình (Reverter và cs., 2020; Ayukekbong và cs., 2017). Tuy nhiên, phương pháp này thường không hiệu quả do cá thường bỏ ăn khi bị bệnh. Việc sử dụng kháng sinh hòa tan vào môi trường nước không chỉ gây ô nhiễm mà còn có thể tạo ra các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh, từ đó tiềm ẩn nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng (Reverter và cs., 2020). Vaccine phòng bệnh cho cá đang trở thành một giải pháp an toàn được các nhà khoa học quan tâm. Việc sử dụng vaccine trên cá giúp phòng ngừa hiệu quả các tác nhân gây bệnh hoặc kích thích tạo ra kháng thể bảo vệ, từ đó nâng cao khả năng đề kháng của cá đối với dịch bệnh. Tuy nhiên, hầu hết các loại vaccine hiện nay dành cho cá nuôi đều được sử dụng qua đường tiêm (Munang'andu, và cs., 2016; Miccoli và cs., 2021). Với phương pháp này, cá phải có kích thước đủ lớn để có thể gây mê và tiêm. Quá trình này đòi hỏi phải xử lý từng cá thể, điều này có thể gây căng thẳng và ức chế miễn dịch, từ đó có thể ảnh hưởng tiêu cực đến phản ứng của cơ thể đối với vaccine, thậm chí gây tử vong. Việc tiêm vaccine cũng đòi hỏi nhiều công lao động, tăng chi phí sản xuất, do đó phương pháp tiêm thường không phù hợp với những loài cá có giá trị thấp như cá rô phi (Miccoli và cs., 2021). Vì vậy, sử dụng vaccine qua đường thức ăn được xem là phương pháp hiệu quả hơn, vì có thể phòng bệnh cho toàn bộ đàn cá trong ao cùng một thời điểm, không gây căng thẳng cho cá và có thể nhắc lại nhiều lần một cách dễ dàng giúp người nuôi có thể chủ động phòng bệnh cho cá

trước mùa dịch bệnh. Ngoài ra vaccine theo đường thức ăn còn kích thích phản ứng miễn dịch niêm mạc (bao gồm da, dịch nhầy và ruột), là những điểm tiếp xúc đầu tiên với tác nhân gây bệnh (Lee và cs., 2021; Miccoli và cs., 2021; Munang'andu và cs., 2016). Để nâng cao hiệu quả của vaccine qua đường thức ăn, nhiều nghiên cứu đã sử dụng các chất chống acid và kháng protease giúp vaccine đi qua dạ dày mà không bị phân hủy kháng nguyên và chỉ được hấp thụ ở ruột cá. Tuy nhiên, phức hợp vaccine với các chất bọc này được hòa tan và hấp thụ ở ruột thì cũng có thể hòa tan trong môi trường nước do có pH tương đương (gần trung tính) dẫn đến mất kháng nguyên (Kitiyodom và cs., 2019; Halimi và cs., 2018; Dubey và cs., 2016). Gần đây, vi hạt Eudragit E100 đã được áp dụng làm chất bọc vaccine *Streptococcus agalactiae* bất hoạt nhằm phòng bệnh cho cá rô phi (*Oreochromis* sp.) với tỷ lệ bảo hộ lên đến 75%. Eudragit E100 là một polymer methacrylate tổng hợp thuộc dòng Eudragit, có cấu trúc chứa các nhóm amino (-NH<sub>2</sub>). Nhờ sự hiện diện của các nhóm amino, Eudragit E100 có tính ion hóa và khả năng hòa tan tốt trong môi trường acid (pH thấp). Polymer này chủ yếu được sử dụng trong ngành dược phẩm để bao phim sử dụng trong các viên nén, viên nang hoặc các dạng thuốc khác để bảo vệ dược chất và kiểm soát quá trình giải phóng thuốc. Eudragit E100 có tính cationic và dễ hòa tan trong môi trường có pH ≤ 5.0, giúp bảo vệ hoạt chất và điều chỉnh tốc độ giải phóng thuốc trong dạ dày, từ đó duy trì nồng độ thuốc ổn định trong cơ thể. Chính vì thế, nó được ứng dụng rộng rãi trong chế tạo màng bao thuốc (Linares và cs., 2019). Đặc biệt, vi hạt Eudragit E100 giúp các hoạt chất như vaccine không tan trong môi trường nước mà chỉ hòa tan khi tiếp xúc với môi trường pH acid, chẳng hạn như pH dạ dày của cá (Bashir và cs., 2023), mở ra hướng đi mới

trong phát triển vaccine qua đường thức ăn. Mặc dù vi hạt Eudragit E100 đã mang lại hiệu quả trong việc bọc vaccine cho cầu khuẩn Gram (+) nhằm phòng bệnh cho cá rô phi (Bashir và cs., 2023), nhưng cho đến nay vẫn chưa có nghiên cứu nào ứng dụng vi hạt này để bọc vaccine cho các trực khuẩn Gram (-). Mục tiêu của nghiên cứu này là sử dụng vi hạt Eudragit E100 để bọc vaccine bất hoạt *Vibrio alginolyticus*, tác nhân gây bệnh xuất huyết lở loét ở cá Hồng mỹ, góp phần phát triển vaccine sử dụng qua đường thức ăn để phòng bệnh vi khuẩn trên cá biển nói chung và cá Hồng mỹ nói riêng.

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện với 3 nội dung chính như sau:

- Khảo sát pH hệ thống tiêu hoá của cá Hồng mỹ
- Sử dụng vi hạt Eudragit E100 để bọc vaccine toàn bộ tế bào bất hoạt *V. alginolyticus*
- Xác định đặc tính của phức hợp vaccine với vi hạt Eudragit E100 ở các điều kiện môi trường pH khác nhau

### 2.2. Vật liệu nghiên cứu

#### 2.2.1. Vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* và vật liệu bọc vaccine

- Chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* VATTH009 dùng để sản xuất vaccine là chủng vi khuẩn được phân lập từ cá Hồng mỹ bị bệnh xuất huyết nuôi tại Thừa Thiên Huế năm 2023, đã được định danh bằng trình tự Nucleotide gene 16S rRNA và cung cấp từ Phòng thí nghiệm Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

- Vật liệu bọc vi khuẩn bất hoạt: vi hạt Eudragit E100 (Essen, Đức), các hoá chất khác bao gồm: Polyvinyl alcohol (PVA) (BDH Laboratory supplies, Poole,

Vương quốc Anh), Sorbitan monostearate (Thermo Fisher Scientific, Heysham, Vương quốc Anh), Ethanol tuyệt đối ( $\geq 99,8\%$ ) và Dichloromethane (Sigma-Aldrich, Vương quốc Anh).

### 2.2.2. Nguồn cá thí nghiệm

Cá Hồng mỹ thí nghiệm (15 cá) có chiều dài từ 28-30 cm/con; khối lượng từ 280-320 g/con, được mua từ hộ nuôi Nguyễn Hữu Nghiêm, xã Điện Hương, huyện Phong Điền, Thừa Thiên Huế, sau đó được vận chuyển ở nhiệt độ 15°C trong suốt hành trình 1 giờ đến Phòng thí nghiệm Bệnh thủy sản, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Không cho cá ăn trong 1 ngày trước khi vận chuyển.

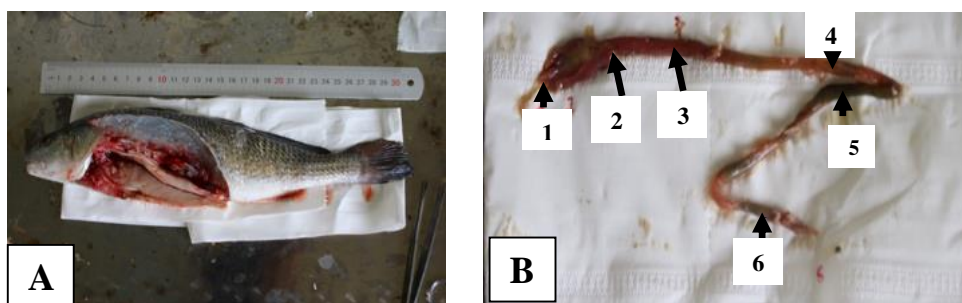
### 2.2.3. Nuôi thuần cá thí nghiệm:

Cá được nuôi trong các bể composite 1000 L và nhiệt độ  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , với lượng nước thay hàng ngày là 20% thể tích, đồng thời được cho ăn bằng thức ăn thương mại dành cho cá Hồng mỹ (Intro Plus MT, Biomar, Việt Nam) với tỷ lệ 2% trọng lượng cơ thể trong 14 ngày trước khi bắt đầu khảo sát pH hệ thống tiêu hóa.

## 2.3. Phương pháp nghiên cứu

### 2.3.1. Phương pháp khảo sát pH hệ thống tiêu hoá cá Hồng mỹ

pH của hệ thống tiêu hoá của cá Hồng mỹ được đo bằng máy đo pH HI 2210-02 (Hanna, Đài Loan) với đầu đo pH có đường kính 3 mm (H1095B microelectrode, Hanna Instruments, Scientific Laboratory Supplier, Anh). Cá Hồng mỹ được gây mê trước (trạng thái đói) hoặc sau khi ăn 30 phút (trạng thái no) bằng cách ngâm trong dung dịch Aqui-S (Bayer, Việt Nam) với nồng độ 150 mg/L trong 60 phút theo phương pháp của Bashir và cs., (2023). Đo pH của khoang miệng trên 5 con cá ở mỗi nhóm (Hình 1A). Sau đó, tiến hành giải phẫu hệ tiêu hóa và đo pH tại nhiều điểm dọc theo chiều dài của hệ thống tiêu hóa, bao gồm dạ dày (2 điểm trước và sau) và bốn điểm ở ruột (Hình 1B). Cụ thể, có 1 điểm ở phần ruột trước, 2 điểm ở ruột giữa (do ruột giữa là phần dài nhất), và 1 điểm ở ruột sau.



**Hình 1.** Đo pH đường tiêu hóa của cá Hồng mỹ: A: miệng; B: 1. Phần dạ dày trước, 2. Phần dạ dày sau; các điểm đo pH ở ruột (3: ruột trước, 4, 5: Ruột giữa, 6: ruột sau)

### 2.3.2. Phương pháp tạo vaccine bất hoạt bọ bằng vi hạt Eudragit E100

- Phương pháp tạo vi khuẩn *V. alginolyticus* bất hoạt:

Vi khuẩn *V. alginolyticus* bất hoạt bằng formalin được sản xuất theo phương

pháp của Bashir và cs. (2023) được điều chỉnh cụ thể như sau:

Chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* VATTH009 được nuôi cấy trong 500 mL môi trường Tryptic soya broth bổ sung 2% NaCl (TSB+, Himedia, Ấn Độ) ở 28°C

trong 24 giờ. Kiểm tra mật độ vi khuẩn ( $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>) bằng phương pháp đo mật độ quang học ở bước sóng 600 nm.

Bất hoạt vi khuẩn *V. alginolyticus* bằng cách thêm formalin 37% vào dung dịch nuôi cấy vi khuẩn với tỷ lệ 2% và ủ trong 1 giờ ở 28°C, sau đó trong 24 giờ ở 4°C với máy lắc đều liên tục. Kiểm tra sự bất hoạt của vi khuẩn bằng cách lấy 1 mL hỗn hợp vi khuẩn *V. alginolyticus* và formalin ở trên cấy trên đĩa thạch chứa môi trường Tryptic soya agar bổ sung 2% NaCl (TSA+, Himedia, Ấn Độ), quan sát sự phát triển vi khuẩn sau 3 ngày và 7 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C.

- Phương pháp bọc vaccine bất hoạt bằng vi hạt Eudragit E100

Vi khuẩn *V. alginolyticus* sau khi bất hoạt bằng formalin được bọc bằng vi hạt Eudragit E100 theo phương pháp Bashir và cs., (2023). Đầu tiên cho 0,76 mg Eudragit E100 vào 10 mL sorbitan monostearate (2,5%) và siêu âm trong 1 giờ để tạo nhũ tương hữu cơ. Sau đó cho thêm 10 mL hỗn hợp dichloromethane-ethanol (1:1) và khuấy liên tục với tốc độ 800 rpm trong 30 phút. Tiếp theo thêm từ từ 1 mL hỗn dịch *V. alginolyticus* ( $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>) từng giọt (chậm rãi trong khoảng thời gian 30 phút) vào 10 mL hỗn hợp dung dịch trên và khuấy liên tục ở 800 vòng/phút. Sau đó, từ từ cho 6 mL PVA (4%) vào và tiếp tục khuấy trong 12 giờ. Ly tâm để thu phức hợp vaccine và vi hạt. Rửa vi hạt bọc vaccine hai lần với 0,1M Phosphate Buffered Saline (PBS: 0,137 M NaCl, 0,05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) bằng cách ly tâm ở 10.000 rpm trong 10 phút (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Đức). Cuối cùng đồng hoá vaccine thu được với 10 mL PBS 0,1 M và khuấy đều ở tốc độ 800 rpm trong 30 phút sau đó vaccine ( $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>) được bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho các thí nghiệm tiếp theo. Vi hạt Eudragit E100 không chứa vaccine cũng được chuẩn bị theo phương pháp trên được

dùng làm đối chứng khi theo dõi hình thái và kích thước vi hạt.

### 2.3.3. Phương pháp xác định độ bền của phức hợp vaccine với vi hạt Eudragit E100 ở các điều kiện môi trường pH khác nhau

Kích thước và độ bền của vi hạt Eudragit E100 và phức hợp vaccine được bọc với vi hạt được kiểm tra bằng cách: cho 500 µL dung dịch vi hạt Eudragit E100 hoặc dung dịch vaccine được bọc vi hạt ( $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>) vào 10 mL dung dịch chứa nước ở độ pH khác nhau 1,5; 2; 3; 4; và 5 (môi trường pH giả định khi cá ở trạng thái no và đói) và khuấy liên tục với tốc độ 300 vòng/phút. Sau mỗi phút, 0,7 mL mẫu được rút ra từ hỗn hợp và kích thước vi hạt và vaccine được đo bằng thiết bị ZetaSizer Ultra (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Anh). Sử dụng công nghệ Dynamic Light Scattering (DLS) và Electrophoretic Light Scattering (ELS), Zetasizer Ultra có thể đo kích thước hạt và phân tử từ 0,3 nm đến 10 µm, đo thế zeta, từ đó giúp xác định tính ổn định của mẫu và khả năng kết tụ của các hạt. Hình thái vi hạt, vaccine bọc bởi vi hạt được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang (Megalab, Vương quốc Anh) ở độ phóng đại 40X. Thời gian kiểm tra kết thúc sau khi vaccine được giải phóng hoàn toàn ra khỏi vi hạt. Mẫu đã rút ra được thay thế bằng một lượng HCl 0,1 M tương đương để duy trì điều kiện hòa tan.

### 2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và SPSS version 26 với giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (SD) với các giá trị pH. Phân tích ANOVA với các phép đo lặp lại, sau đó là kiểm tra Tukey, được thực hiện để xác định sự khác biệt nếu có với giá trị pH trong đường tiêu hóa ở cá trước và sau khi cho ăn với  $p < 0,05$  được coi là có ý nghĩa thống kê. Thống kê mô tả được sử dụng ở các kết quả quan sát hình dạng phức hợp vi hạt và vaccine ở các độ pH dưới kính hiển vi huỳnh quang.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả xác định pH ở hệ thống tiêu hoá của cá Hồng mỹ

Giá trị pH của hệ thống tiêu hoá ở cá Hồng mỹ trước và sau khi cho ăn 30 phút hầu như không thay đổi ngoại trừ giá trị pH ở dạ dày (Bảng 1). Trước và sau khi cho ăn 30 phút, giá trị pH ở hệ thống thay đổi rõ rệt từ miệng đến đoạn ruột sau của ống tiêu hoá, cụ thể: pH có giá trị trung tính ở miệng, acid ở dạ dày, sau đó tăng trở lại trung tính và hơi kiềm ở ruột giữa, và giảm nhẹ dưới mức trung tính ở phần cuối cùng của đường ruột. Sự thay đổi pH dọc theo hệ thống tiêu hoá rõ rệt nhất ở dạ dày, đặc biệt là ở dạ dày trước khi cho ăn pH chỉ 1,5 – 2,4 do hydrochloric acid (HCl) và pepsin có trong

dịch dạ dày, thấp hơn đáng kể so với cá sau khi cho ăn ( $p < 0,05$ ). Ngược lại, trạng thái no (đã ăn) hay đói (chưa ăn) không làm thay đổi độ pH ở miệng và các đoạn ruột khác nhau của ống tiêu hoá. Phần ruột trước do ảnh hưởng của HCl từ dạ dày nên pH thấp hơn phần ruột giữa (Bảng 1). Ở ruột sau nơi diễn ra chủ yếu diễn ra quá trình hấp thu nước và lên men của hệ vi khuẩn đường ruột làm cho pH của phần này giảm so với phần ruột giữa. Giá trị pH acid ở dạ dày và pH trung tính đến hơi kiềm ở ruột của cá Hồng mỹ tương tự như một số loài cá khác như *Tilapia guineensis*, *Sarotherodon melanothron*, *Liza falcipinnis* (Payne, 1978) hay ở cá rô phi *Oreochromis sp.* (Bashir và cs., 2023).

**Bảng 1.** Giá trị pH ở hệ thống tiêu hoá cá ở hai trạng thái trước và sau khi ăn

Thời điểm kiểm tra pH	Miệng	pH ở các vị trí khác nhau ở hệ thống tiêu hoá					
		Dạ dày			Ruột		
		1	2	3	4	5	6
Trước khi ăn 30 phút	6,9 <sup>a</sup> ± 0,2	1,5 <sup>a</sup> ± 0,5	2,4 <sup>a</sup> ± 0,6	6,9 <sup>a</sup> ± 0,4	7,5 <sup>a</sup> ± 0,2	7,5 <sup>a</sup> ± 0,4	6,9 <sup>a</sup> ± 0,7
Sau khi ăn 30 phút	7,0 <sup>a</sup> ± 0,2	3,7 <sup>b</sup> ± 0,6	3,9 <sup>b</sup> ± 0,6	6,8 <sup>a</sup> ± 0,3	7,4 <sup>a</sup> ± 0,5	7,4 <sup>a</sup> ± 0,3	6,8 <sup>a</sup> ± 0,7

Giá trị thể hiện là số trung bình ± độ lệch chuẩn của 3 lần lặp lại thí nghiệm. Các kí tự a, b khác nhau trong cùng 1 cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). 1. Dạ dày trước, 2. Dạ dày sau, 3. Ruột trước, 4,5 Ruột giữa, 6. Ruột sau.

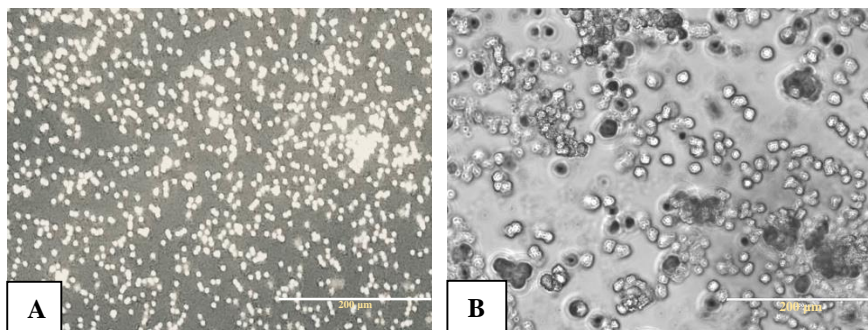
#### 3.2. Kích thước của vi hạt Eudragit E100, vaccine *Vibrio alginolyticus* bất hoạt, và vaccine *V. alginolyticus* bất hoạt được bọc voi Eudragit E100

Kích thước của vi hạt Eudragit E100 nhỏ hơn vi hạt chứa *V. alginolyticus* (2,82 µm so với 8,72 µm) và có bề mặt mang điện tích dương (zeta potential = 37,66 mV) (Bảng 2), phản ánh tính chất cation của Eudragit E100 được tạo ra bởi sự ion hóa các nhóm amin trong của chuỗi polymer. Ngược lại các vi hạt chứa *V. alginolyticus* có điện tích âm (zeta potential là -70 mV).

Điều này rất có thể là do sự di chuyển của các ion phosphate (*V. alginolyticus* trong dung dịch đệm phosphate) từ bên trong ra bề mặt hạt, trong quá trình loại dung môi và co lại do kết tủa polymer nên phức hợp vaccine và vi hạt có điện tích bề mặt âm (Rosca và cs., 2004). Điện thế zeta thấp làm giảm tương tác tĩnh điện giữa các hạt. Điều này cho phép các hạt tiếp cận chặt chẽ và tạo ra các chuỗi nhỏ gọn hơn vì vậy hình thái của hạt cũng bị ảnh hưởng, các hạt rỗng có hình cầu (Hình 2A) trong khi các hạt chứa *V. alginolyticus* tụ lại thành đám dạng tổ ong (Hình 2B).

**Bảng 2.** Kích thước vi khuẩn *V. alginolyticus* bất hoạt, vi hạt Eudragit E100 và phức hợp vaccine *V. alginolyticus* bất hoạt được bọc bởi vi hạt

Loại hạt	Kích cỡ trung bình ( $\mu$ ) ( $\pm$ SD)	Thế Zeta (mV)
Vi khuẩn <i>V. alginolyticus</i> bất hoạt (chưa bọc vi hạt Eudragit E 100)	2,26 ( $\pm$ 0,13)	-20,42 ( $\pm$ 1,12)
Vi hạt Eudragit E100	2,82 ( $\pm$ 0,49)	37,66 ( $\pm$ 3,15)
Vaccine <i>V. alginolyticus</i> bất hoạt (đã được bọc bởi vi hạt Eudragit E 100)	8,72 ( $\pm$ 2,76)	-69,29 ( $\pm$ 2,46)

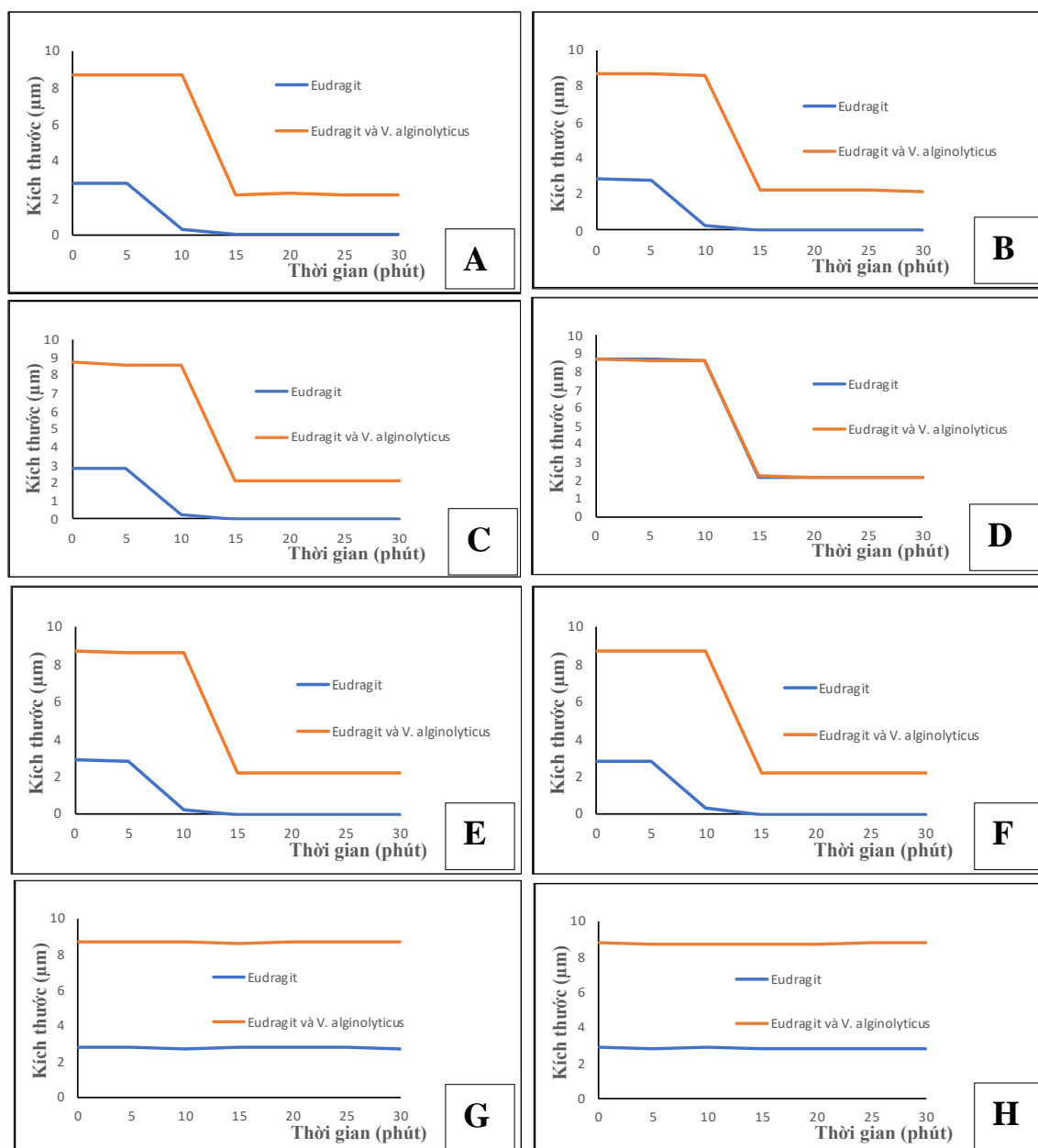


**Hình 2.** Vi hạt Eudragit E100 có dạng hình cầu (A) và *V. alginolyticus* bất hoạt được bọc bởi vi hạt có tụ lại thành từng đám có dạng hình tổ ong (B) (40X)

**3.3. Kích thước vi hạt Eudragit E100 và vaccine *V. alginolyticus* bất hoạt được bọc vi hạt Eudragit E100 trong môi trường pH giả định**

Khi đưa vi hạt Eudragit E100 và vaccine *V. alginolyticus* bất hoạt được bọc

vi hạt Eudragit E100 vào môi trường pH giả định, sau 10 phút kích thước của vi hạt Eudragit E100 và vaccine *V. alginolyticus* bất hoạt được bọc vi hạt có sự thay đổi rõ rệt (Hình 3).



**Hình 3.** Kích thước của Eudragit E100 và *V. alginolyticus* bắt hoạt được bọc bởi Eudragit ở môi trường pH 1,5 (A); 2,5 (B); 3,5 (C); 4,5 (D); 5 (E); 5,5 (F); 6 (G) và 7 (H) theo thời gian



Khi tiếp xúc với môi trường acid từ 1,5-5,5 (mô phỏng môi trường acid trong dạ dày cá Hồng mỹ trước và sau khi cho ăn), kích thước hạt của Eudragit E100 và kích thước hạt của phức hợp Eudragit E100 bọc vi khuẩn *V. alginolyticus* bất hoạt đều giảm trong vòng 10 phút, cho thấy sự hòa tan nhanh chóng của các vi hạt polymer. Vi hạt Eudragit E100 tan hoàn toàn trong điều kiện pH acid sau 15 phút. Các vi hạt Eudragit E100 bọc vi khuẩn *V. alginolyticus* giải phóng vaccine dẫn đến giảm kích thước cho đến khi đạt đến mức ổn định khoảng 2,5  $\mu\text{m}$  (hình 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F). Ngược lại, trong môi trường pH giả định như pH miệng và ruột cá (pH = 6 hoặc 7) vi hạt Eudragit E100 bọc vi khuẩn *V. alginolyticus* không thay đổi kích thước, chứng tỏ vaccine được bọc bằng vi hạt Eudragit E100 không tan ở điều kiện pH  $\geq 6$ . Nghiên cứu này cho thấy khả năng hoà tan của vi hạt Eudragit E100 phụ thuộc vào pH, đây là một polymer đầy triển vọng để bọc vaccine toàn bộ tế bào bất hoạt vi khuẩn *V. alginolyticus*, cho phép phân phối mục tiêu vaccine đến hệ tiêu hóa của cá Hồng mỹ. Vi hạt Eudragit E100 tan trong môi trường acid ở dạ dày và giải phóng vaccine, từ đó tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ cá chống lại bệnh cho vi khuẩn *V. alginolyticus* gây ra. Đặc biệt, Eudragit E100 là loại polymer an toàn và có thể tiêu hoá được, đồng thời còn ứng dụng vào công nghệ dược phẩm sử dụng cho người (Food and Drug Administration, 2021). Vì vậy, ứng dụng vi hạt này để bọc vaccine cho cá là an toàn, không gây ô nhiễm vi nhựa và không vi phạm các quy định hiện hành liên quan đến polymer.

Cá xương có hệ thống mô lympho liên kết với đường tiêu hóa khác biệt về hình thái học và chức năng so với động vật có vú. Cá không có các mô lympho tập trung như các hạch Peyer ở động vật có vú. Các mô lympho trong đường tiêu hóa của cá phân

tán dọc theo hệ tiêu hóa (Dubey và cs., 2016). Vì vậy, việc phát triển vaccine qua đường thức ăn gặp thách thức lớn do sự phân hủy kháng nguyên trong môi trường acid khắc nghiệt ở dạ dày và khả năng phát triển sự miễn dịch dung nạp kháng nguyên trong đường tiêu hóa (Dubey và cs., 2016). Vaccine qua đường thức ăn có lẽ là phương pháp phù hợp nhất để phòng bệnh hàng loạt cho các loài cá, thông qua quá trình kích thích hệ miễn dịch niêm mạc là nơi tiếp xúc mầm bệnh đầu tiên, tức là sự xuất hiện của kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên trong chất nhầy ở da, mật hoặc ruột ở nhiều loài cá (Rombout và cs., 1986; Rombout và cs., 1989). Hiệu quả của vaccine qua đường thức ăn đã được chứng minh có hiệu quả trong việc giảm tỷ lệ chết ở cá và cho thấy việc sử dụng vaccine qua thức ăn là con đường lý tưởng để cung cấp kháng nguyên vaccine cho cá (Assefa và Abunna, 2018).

Theo nghiên cứu của Bashir và cs. (2023), thức ăn sẽ được chuyển đến ruột cá sau 10 phút cho ăn, chính vì vậy việc giải phóng vaccine ở dạ dày trong thời gian trên sẽ đảm bảo vaccine được chuyển tới ruột trước và tạo miễn dịch cho cá. Vaccine bất hoạt được bọc vi hạt không tan ở pH=6 sẽ giúp vaccine không bị phân hủy ở môi trường nước, không làm mất vaccine trong thức ăn và không gây ô nhiễm môi trường xung quanh. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy việc sử dụng vi hạt Eudragit E100 để bọc vaccine là một trong những phương pháp đầy tiềm năng cho việc phát triển vaccine qua thức ăn để phòng bệnh do vi khuẩn gây ra trên cá biển.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định biến động pH trong hệ thống tiêu hoá của cá Hồng mỹ, và dựa trên điều kiện pH acid ở dạ dày (1,5-3,9) đã sử dụng vi hạt Eudragit E100 để bọc vaccine *V. alginolyticus* bất hoạt để sử dụng qua đường thức ăn.

Nghiên cứu cũng đã cho thấy vi hạt giải phóng vaccine *V. alginolyticus* bất hoạt khi pH dạ dày cá <6 và vaccine được bọc vi hạt bền ở pH ≥ 6. Tuy nhiên nghiên cứu này mới chỉ dừng ở việc tạo vaccine bất hoạt với chất bọc là Eudragit E100, cần tiến hành các nghiên cứu tiếp theo để xác định sự bảo hộ của phức hợp vaccine này qua đường thức ăn trên cá Hồng mỹ để có thể chứng minh tính khả thi của phương pháp bao bọc vaccine bằng vi hạt Eudragit E100.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi đề tài cấp Bộ B2024-DHH-07: “Nghiên cứu ứng dụng micropolymer Eudragit E100 làm chất bọc vắc xin sử dụng qua đường thức ăn để phòng bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* gây ra trên cá Hồng mỹ (*Sciaenops ocellatus*)” và nhóm nghiên cứu tiêu biểu Đại học Huế mã số NCTB.DHH.2025.08.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### 1. Tài liệu tiếng Việt

- Đặng Thanh Long, Nguyễn Thái Hoàng, Hoàng Thị Kim Hồng, Lê Lý Thùy Trâm, Phạm Thị Hải Yến, Huỳnh Văn Chương, Nguyễn Thị Quỳnh Trang và Võ Văn Hiệp. (2019). Phân lập và tạo dòng gen *Thermolabile hemolysin* của vi khuẩn *Vibrio* từ cá hồng Mỹ *Sciaenops ocellatus* ở Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa Học Tự Nhiên*, 128(1E), 5–14.
- Phạm Thị Hải Yến, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm, Nguyễn Anh Hiếu và Nguyễn Quang Linh. (2021). Khả năng kháng khuẩn của cao chiết Diệp hạ châu (*Phyllanthus amarus*) đối với vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ (*Sciaenops ocellatus*). *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Kỹ Thuật & Công Nghệ*, 130(2A), 67-79.
- Phạm Thị Hải Yến, Trần Quang Khánh Vân, Nguyễn Khoa Huy Sơn và Nguyễn Duy Quỳnh Trâm. (2019). Hiện trạng nuôi cá lồng và tình hình xuất hiện bệnh trên một số đối tượng cá nước lợ – mặn có giá trị kinh tế nuôi tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 23, 50–57.
- Thủ tướng Chính phủ. (2018). Quyết định số 50/2018/QĐ-TTg ngày 13 tháng 12 năm

2018 của Thủ tướng Chính phủ ban hành Quy định đối tượng Thủy sản nuôi chủ lực. Khai thác từ [https://vanban.chinhphu.vn/default.aspx?pa\\_geid=27160&docid=195564](https://vanban.chinhphu.vn/default.aspx?pa_geid=27160&docid=195564)

### 2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Assefa, A., & Abunna, F. (2018). Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. *Veterinary medicine international*, 2018(1), 5432497.
- Ayukekbong, J. A., Ntemgwa, M., & Atabe, A. N. (2017). The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 6, 1-8.
- Bashir, S., Phuoc, N. N., Herath, T., Basit, A., Zadoks, R. N., & Murdan, S. (2023). An oral pH-responsive *Streptococcus agalactiae* vaccine formulation provides protective immunity to pathogen challenge in tilapia: A proof-of-concept study. *Plos one*, 18(3), e0278277.
- Cao, J., Zhang, J., Ma, L., Li, L., Zhang, W., & Li, J. (2018). Identification of fish source *Vibrio alginolyticus* and evaluation of its bacterial ghosts vaccine immune effects. *Microbiologyopen*, 7(3), e00576.
- Damir, K., Irena, V. S., Damir, V., & Emin, T. (2013). Occurrence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Vibrio alginolyticus* in the Eastern Adriatic Sea. *Marine pollution bulletin*, 75(1-2), 46-52.
- Dubey, S., Avadhani, K., Mutalik, S., Sivadasan, S. M., Maiti, B., Paul, J., Girisha, S. K., Venugopal, M. N., Mutoloki, S., Evensen, O., Karunasaga, I., & Munang'andu, H. M. (2016). *Aeromonas hydrophila* OmpW PLGA nanoparticle oral vaccine shows a dose-dependent protective immunity in rohu (*Labeo rohita*). *Vaccines*, 4(2), 21.
- Food and Drug Administration, U.S. (2021). *Inactive ingredient search for approved drug products*.
- Gillespie, S., & van den Bold, M. (2017). Agriculture, food systems, and nutrition: meeting the challenge. *Global Challenges*, 1(3), 1600002.
- Halimi, M., Alishahi, M., Abbaspour, M. R., Ghorbanpoor, M., & Tabandeh, M. R. (2018). Efficacy of a Eudragit L30D-55

- encapsulated oral vaccine containing inactivated bacteria (*Lactococcus garvieae*/*Streptococcus iniae*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 81, 430-437.
- Kitiyodom, S., Kaewmalun, S., Nittayasut, N., Suktham, K., Surassmo, S., Namdee, K., Rodkhun, C., Pirarat, N., & Yata, T. (2019). The potential of mucoadhesive polymer in enhancing efficacy of direct immersion vaccination against *Flavobacterium columnare* infection in tilapia. *Fish & Shellfish Immunology*, 86, 635-640.
- Lee, P. T., Yamamoto, F. Y., Low, C. F., Loh, J. Y., & Chong, C. M. (2021). Gut immune system and the implications of oral-administered immunoprophylaxis in finfish aquaculture. *Frontiers in Immunology*, 12, 773193.
- Linares, V., Yarce, C. J., Echeverri, J. D., Galeano, E., & Salamanca, C. H. (2019). Relationship between degree of polymeric ionisation and hydrolytic degradation of Eudragit® E polymers under extreme acid conditions. *Polymers*, 11(6), 1010.
- Miccoli, A., Manni, M., Picchiatti, S., & Scapigliati, G. (2021). State-of-the-art vaccine research for aquaculture use: The case of three economically relevant fish species. *Vaccines*, 9(2), 140.
- Mohamad, N., Amal, M. N. A., Yasin, I. S. M., Saad, M. Z., Nasruddin, N. S., Al-saari, N., Mino, S., & Sawabe, T. (2019). Vibriosis in cultured marine fishes: a review. *Aquaculture*, 512, 734289.
- Munang'andu, H. M., Paul, J., & Evensen, Ø. (2016). An overview of vaccination strategies and antigen delivery systems for *Streptococcus agalactiae* vaccines in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vaccines*, 4(4), 48.
- Near, T. J., Eytan, R. I., Dornburg, A., Kuhn, K. L., Moore, J. A., Davis, M. P., ... & Smith, W. L. (2012). Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), 13698-13703.
- Payne, A. I. (1978). Gut pH and digestive strategies in estuarine grey mullet (Mugilidae) and tilapia (Cichlidae). *Journal of Fish Biology*, 13(5), 627-629.
- Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D., Avarre, J. C., Combe, M., Pepey, E., Pouyau, L., Vega-Heredia, S. de Vêda, H., & Gozlan, R. E. (2020). Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. *Nature communications*, 11(1), 1870.
- Rombout, J. H. W. M., Van den Berg, A. A., Van den Berg, C. T. G. A., Witte, P., & Egberts, E. (1989). Immunological importance of the second gut segment of carp. III. Systemic and/or mucosal immune responses after immunization with soluble or particulate antigen. *Journal of Fish Biology*, 35(2), 179-186.
- Rombout, J. W., Blok, L. J., Lamers, C. H., & Egberts, E. (1986). Immunization of carp (*Cyprinus carpio*) with a *Vibrio anguillarum* bacterin: indications for a common mucosal immune system. *Developmental & Comparative Immunology*, 10(3), 341-351.
- Rosca, I. D., Watari, F., & Uo, M. (2004). Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *Journal of controlled release*, 99(2), 271-280.
- Sadok, K., Mejd, S., Nourhen, S., & Amina, B. (2013). Phenotypic characterization and RAPD fingerprinting of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* isolated during Tunisian fish farm outbreaks. *Folia microbiologica*, 58, 17-26.
- Yen, P. T. H., Linh, N. Q., & Tram, N. D. Q. (2021). The identification and determination of toxin genes of *Vibrio* strains causing hemorrhagic disease on red drum (*Sciaenops ocellatus*) using PCR. *AMB Express*, 11(1), 4.
- Zhang, M., & Sun, L. (2011). The tissue factor pathway inhibitor 1 of *Sciaenops ocellatus* possesses antimicrobial activity and is involved in the immune response against bacterial infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(3), 247-252.
- Zhou, J., Yu, J., & Chu, Q. (2024). Comparative transcriptome analysis reveals potential regulatory mechanisms of genes and immune pathways following *Vibrio harveyi* infection in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 146, 109386.