C. The selected conditions were determined as 0.5% CMC, 1% albumin, and a drying temperature of 60°C. The resulting orange powder had moisture content of 3.05%, solubility of 90.11%, total polyphenol content of 5.50 mg GAE/g dry matter, antioxidant activity of 2.65 mg ascorbic acid/g dry matter, and vitamin C content of 13.78 mg/g dry matter. The final product exhibited a fine, uniform structure with no clumping and a pleasant sweet-sour flavor and natural orange aroma.

Keywords: *Citrus nobilis* blanco, CMC, albumin, foam-mat drying, drying temperature

Ngày nhận bài: 13/01/2026 Người phản biện: PGS.TS. Hoàng Thị Lệ Hằng, PGS.TS. Nguyễn Thị Minh Tú

Ngày duyệt đăng: 07/8/2026 Ngày phản biện: 04/02/2026

XÂY DỰNG TIÊU CHÍ LỰA CHỌN CHỦNG *Aeromonas dhakensis* LÀM CHỦNG GIỐNG ĐỂ PHÁT TRIỂN VẮC XIN BẤT HOẠT TOÀN TẾ BÀO CÓ TIỀM NĂNG BẢO HỘ CHÉO PHÒNG BỆNH XUẤT HUYẾT TRÊN CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Võ Hồng Phượng[1,2,3*], Trương Hà Minh Nhật[1,2], Nguyễn Thanh Tùng[1,2], Nguyễn Lê Phương Ngân[3], Lê Hồng Phước[3], Nguyễn Đức Hoàng[1,2]

TÓM TẮT

Bệnh xuất huyết (Motile Aeromonas Septicemia - MAS) do *Aeromonas hydrophila* và *A. dhakensis* gây ra là một trong những bệnh nguy hiểm trên cá tra. Việc lựa chọn chủng giống vi khuẩn để sản xuất vắc xin bất hoạt mang ý nghĩa quan trọng trong phòng bệnh này. Tuy nhiên, tiêu chí lựa chọn chủng có khả năng tạo bảo hộ chéo giữa hai loài để phát triển vắc xin bất hoạt toàn tế bào vẫn chưa được xác lập. Nghiên cứu này nhằm đề xuất tiêu chí lựa chọn chủng giống dựa trên sự kết hợp giữa đánh giá độc lực, phân tích hệ gen và hồ sơ protein màng ngoài, đồng thời xác nhận hiệu quả bảo hộ bằng thử nghiệm trên cá tra. Kết quả cho thấy, chủng *A. dhakensis* CXD172 thuộc nhóm chưa xác định (STNF), được lựa chọn làm chủng giống sản xuất vắc xin nhờ có hồ sơ protein màng ngoài chia sẻ với *A. hydrophila* ST251 và *A. dhakensis* ST656. Đồng thời, vắc xin bất hoạt từ chủng này cho hiệu quả bảo hộ đối với cả gây nhiễm cùng loài *A. dhakensis* AD09 và gây nhiễm khác loài *A. hydrophila* AH12, với RPS lần lượt là 80,0% và 76,92%. Nghiên cứu này cung cấp cơ sở ban đầu cho việc sàng lọc và lựa chọn chủng giống có tiềm năng phát triển vắc xin bất hoạt phòng MAS.

Từ khóa: *Aeromonas dhakensis*, *Aeromonas hydrophila*, bảo hộ chéo, bệnh xuất huyết, vắc xin

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh xuất huyết (Motile Aeromonas Septicemia - MAS) là một trong những bệnh truyền nhiễm phổ biến trên cá tra nuôi thâm canh. Trước đây, *Aeromonas hydrophila* được xem là tác nhân gây bệnh cơ hội hoặc thứ cấp. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu gần đây đã chứng minh *A. hydrophila* có thể trở thành tác nhân gây bệnh tiên phát (Shahi *et al*., 2013). Cùng với sự phát triển của công nghệ giải trình tự gen, ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy bệnh MAS không chỉ do *A. hydrophila* gây ra mà còn có sự tham gia của *A. dhakensis*. Phân tích hệ gen của Bartie và cộng sự (2023) cho thấy *A. dhakensis* là một trong những mầm bệnh nguy hiểm nhất trong nghề nuôi cá tra tại Việt Nam. Điều này tương đồng với các báo cáo lâm sàng tại Nam Đài Loan khi *A. dhakensis* cũng được chứng minh là phổ biến và có độc lực hơn *A. hydrophila* (Chen *et al*., 2014). Như vậy, bệnh MAS được gây ra đồng thời bởi hai loài *A. hydrophila* và *A. dhakensis* đã tạo ra những thách thức đáng kể trong phát triển vắc xin phòng bệnh MAS có phổ bảo hộ đối với các chủng đại diện được sử dụng trong nghiên cứu.

Các nghiên cứu dịch tễ học phân tử cho thấy quần thể *Aeromonas* gây bệnh trên cá tra có mức độ đa dạng di truyền cao. Phân tích rep-PCR cho thấy *A. hydrophila* và *A. dhakensis* thuộc hai nhóm di truyền khác biệt, với mức độ tương đồng khoảng 66%. Điều này cho thấy có thể có sự khác biệt về thành phần protein bề mặt hoặc kháng nguyên giữa hai loài và ảnh hưởng đến hiệu quả bảo hộ chéo của vắc xin (Bartie *et al*., 2023). Tại đồng bằng sông Cửu Long, *A. dhakensis* ST656 (chiếm 43,7%) và *A. hydrophila* ST251 (chiếm 20,7%) là hai dòng chiếm ưu thế trong các ao nuôi cá tra (Truong *et al*., 2024). Tuy nhiên, tỷ lệ đáng kể các mẫu phân lập từ thủy sản (chiếm 33,3%) được phân loại là STNF (Sequence Type Not Found), phản ánh sự tồn tại của nhiều dòng mới chưa được mô tả trên cơ sở dữ liệu PubMLST (Truong *et al*., 2024). Sự đa dạng Sequence Type (ST) phản ánh sự khác biệt về di truyền của quần thể *Aeromonas*. Các chủng cùng thuộc một ST thường có mức độ tương đồng về hệ gen lõi (core genome) cao, nhưng vẫn có thể khác nhau về hệ gen phụ, bao gồm các gen liên quan đến độc lực, thành phần kháng nguyên bề mặt.

[1]Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh; [2]Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh
[3]Viện Khoa học Thủy sản Việt Nam; *Tác giả liên hệ, email: vohongphuong79@gmail.com

Đến nay, vắc xin bất hoạt toàn tế bào vẫn có vai trò quan trọng trong phòng bệnh thủy sản nhờ quy trình sản xuất đơn giản, chi phí thấp, tính an toàn cao và thuận lợi trong đăng ký lưu hành thương mại. Theo định hướng của nghiên cứu vắc xin ngược (reverse vaccinology), việc lựa chọn chủng giống không chỉ dựa trên độc lực mà còn phải xem xét khả năng biểu hiện các kháng nguyên bề mặt có tính sinh miễn dịch cao. Phân tích hệ protein của *A. hydrophila* đã xác định nhiều Outer Membrane Proteins (OMPs) bảo tồn như PilQ, TolC, BamA, OmpA và OmpK là các ứng viên đầy triển vọng cho phát triển vắc xin phổ rộng (Erickson *et al*., 2023; Zhang *et al*., 2023). Hơn nữa, ngoài các protein màng ngoài được biết đến, một số protein như OmpR, đặc biệt là protein tái tổ hợp rOmpR, có tính sinh miễn dịch mạnh và được chứng minh là có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch dịch thể, bảo vệ cá chống lại *A. hydrophila* (Maiti *et al*., 2020).

Do đó, chủng giống được lựa chọn cần mang các gen mã hóa protein màng (OMPs) có mức độ bảo tồn cao và đại diện cho phổ kháng nguyên của các dòng *Aeromonas* đang lưu hành. Việc kết hợp thông tin về độc lực, hệ gen và hồ sơ về các protein màng (OMPs) có thể cung cấp cơ sở khoa học cho việc lựa chọn chủng giống phục vụ phát triển vắc xin bất hoạt toàn tế bào có phổ bảo hộ rộng. Tuy nhiên, đến nay vẫn chưa có nghiên cứu nào đánh giá một cách có hệ thống khả năng ứng dụng các chủng *A. dhakensis* làm chủng giống phát triển vắc xin bất hoạt toàn tế bào dựa trên sự kết hợp các đặc điểm nêu trên.

Khoảng trống khoa học trong nghiên cứu này là việc chọn chủng giống để sản xuất vắc xin theo phương pháp truyền thống trước đây có thể cho tính sinh miễn dịch tốt nhưng khả năng bảo hộ chéo không cao. Việc kết hợp thông tin về độc lực, hệ gen và hồ sơ về các protein màng (OMPs) sẽ cung cấp cơ sở khoa học chặt chẽ hơn trong chọn giống vi khuẩn dùng để sản xuất vắc xin. Giả thuyết về OMP dựa trên cơ sở rằng chủng được chọn có hồ sơ tương đồng với các chủng khác thì khả năng gây bảo hộ chéo càng cao.

Xuất phát thực tiễn trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm: (1) đánh giá sự biến thiên độc lực của các chủng *A. hydrophila* và *A. dhakensis* dựa trên giá trị LD_{50} đồng thời với sự phân bố của các gen độc lực; (2) phân tích sự hiện diện và mức độ bảo tồn của 19 protein màng ngoài của *A. hydrophila* và *A. dhakensis* nhằm nhận diện các OMP bảo tồn; (3) Tuyển chọn các chủng và đánh giá thực nghiệm khả năng bảo hộ của vắc xin bất hoạt toàn tế bào khi gây nhiễm *A. dhakensis* và *A. hydrophila*.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn: các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu bao gồm 38 chủng được lưu trữ trong môi trường glycerol -80°C tại Trung tâm Nghiên cứu Môi trường và Bệnh Thủy sản miền Nam. Dữ liệu trình tự: toàn bộ 37 hệ gen dùng trong phân tích protein bề mặt bao gồm 19 chủng *A. dhakensis* ST656, 4 chủng *A. dhakensis* STNF và 14 chủng *A. hydrophila* ST251 được sử dụng trong nghiên cứu đã được công bố trước đó và được lưu trữ trên cơ sở dữ liệu European Nucleotide Archive (ENA) với mã số dự án PRJEB65955. Thông tin chi tiết về nguồn gốc, đặc điểm dịch tễ và hệ gen của các chủng được mô tả bởi Truong và cộng sự (2024). Kiểu trình tự MLST (Multilocus Sequence Typing) được xác định bằng phần mềm SRST2 phiên bản 0.2.0 theo sơ đồ MLST của chi *Aeromonas* trên cơ sở dữ liệu PubMLST. Các chủng không xác định được kiểu trình tự được ký hiệu là STNF (Sequence Type Not Found).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phân tích protein bề mặt liên quan đến tính sinh miễn dịch

Nhóm 19 protein ứng viên được lựa chọn dựa trên các nghiên cứu trước đây về reverse vaccinology và các protein liên quan đến màng ngoài, cấu trúc bề mặt và độc lực của vi khuẩn thuộc chi *Aeromonas*. Danh sách protein bao gồm OmpA, OmpA1, OmpA2, OmpC, OmpD, OmpK, OmpTS, TolC, OmpW family, Omp48, TonB receptor, BamA, BamC, BamE, PilQ, Aha1, FlaA, FlaB và protein điều hoà OmpR.

Trình tự axit amin tham chiếu của từng protein được đối chiếu với bộ protein dự đoán của các chủng khảo sát bằng BLASTP, chỉ những hit có độ bao phủ trình tự ít nhất 80% mới được giữ lại. Đối với mỗi protein tham chiếu, hit có bit score cao nhất và E-value thấp nhất được chọn là trình tự tương đồng phù hợp nhất. Thông tin về mức độ tương đồng (%) của các protein được tổng hợp thành ma trận protein để phân tích phân cụm bằng khoảng cách Euclidean kết hợp với thuật toán Ward. D2 nhằm giảm thiểu phương sai nội cụm và tối ưu hóa sự đồng nhất giữa các chủng trong một cụm (Murtagh & Legendre, 2014).

2.2.2. Phân tích các gen liên quan đến độc lực

Các gen liên quan đến độc lực được dự đoán bằng công cụ VFanalyzer của Virulence Factor Database (VFDB). Trình tự hệ gen của từng chủng được đối chiếu với cơ sở dữ liệu các yếu tố độc lực đã được chú giải trong VFDB. Các gen dự đoán là yếu tố độc lực được tổng hợp thành ma trận hiện diện/vắng mặt để phân tích sự phân

bố giữa các chủng. Phân nhóm độc lực của các gen được thực hiện theo hệ thống phân loại thống nhất của VFDB 2022 (Liu *et al*., 2022).

Các gen độc lực dự đoán được phân nhóm theo chức năng dựa trên tên gen và chức năng của protein được chú giải trong cơ sở dữ liệu VFDB, kết hợp với thông tin từ UniProt, KEGG và các công bố liên quan đến chi *Aeromonas*. Các gen thuộc cùng một cấu trúc hoặc hệ thống chức năng, bao gồm độc tố, hệ thống bài tiết type VI, tiên mao, pili Flp/Tad, pili Tap, pili Msh, hệ thống hóa hướng động và motor tiên mao, được tổng hợp thành các nhóm chức năng để so sánh phân bố giữa hai loài.

2.2.3. Xác định giá trị LD_{50} của các chủng A. hydrophila và A. dhakensis trên cá tra

Chuẩn bị cá tra thí nghiệm: cá tra (khối lượng trung bình 15 ± 2 g) được thuần trong bể composite 500 L (mật độ 50 con/200 L) trong thời gian 3 - 4 tuần trong điều kiện nhiệt độ nước 30 - 32°C, pH dao động 7,2 - 7,5, sục khí liên tục đến khi tiến hành thí nghiệm. Trong quá trình thuần hóa, cá được cho ăn 2 lần/ngày bằng thức ăn thương mại. Trước khi bố trí thí nghiệm, cá được kiểm tra sức khỏe và không phát hiện nhiễm các tác nhân gây bệnh xuất huyết hay gan thận mủ.

Chuẩn bị vi khuẩn để gây bệnh thực nghiệm: vi khuẩn *A. hydrophila* và *A. dhakensis* được cấy từ ống giống lên môi trường Tryptone Soya Agar (TSA, Himedia) ủ 30°C trong thời gian 20 - 24 giờ. Khuẩn lạc thuần được chọn nuôi tăng sinh trong môi trường lỏng Tryptone Soya Broth (TSB, Himedia), ủ lắc ở 30°C, 100 vòng/phút trong 18 - 20 giờ. Mật độ vi khuẩn được xác định dựa trên đường chuẩn giữa giá trị $OD_{600\ nm}$ và số lượng khuẩn lạc. Trong đó, 1 $OD_{600\ nm}$ tương đương $3,64 \times 10^8$ CFU/mL (dữ liệu không trình bày).

Xác định liều gây chết trung bình (LD_{50}): phương pháp xác định liều LD_{50} của vi khuẩn *A. hydrophila* và *A. dhakensis* trên cá tra được thực hiện theo phương pháp Reed và Muench (1938). Tổng cộng 38 chủng *Aeromonas* được đánh giá độc lực thông qua giá trị LD_{50} bao gồm 19 chủng *A. dhakensis*, 04 chủng *A. dhakensis* STNF, 14 chủng *A. hydrophila* và 01 chủng *A. hydrophila* STNF. Mỗi thí nghiệm gồm một nghiệm thức đối chứng được tiêm PBS (0,1 mL/cá) và các nghiệm thức khảo sát với các nồng độ pha loãng bậc 10 liền kề. Cá được gây nhiễm bằng phương pháp tiêm các dãy nồng độ khác nhau với liều lượng là 0,1 mL/cá. Mỗi nồng độ khảo sát gồm 20 cá tra/lần lặp và lặp lại 2 lần. Sau khi gây nhiễm, cá được theo dõi trong 10 ngày để ghi nhận biểu hiện lâm sàng và tỷ lệ chết. Những cá chết được tái phân lập vi khuẩn từ thận nhằm xác định nguyên nhân gây chết.

2.2.4. Lựa chọn chủng ứng viên và đánh giá hiệu quả bảo hộ vắc xin đối với A. hydrophila và A. dhakensis

Sáu chủng *A. dhakensis* được lựa chọn làm ứng viên dựa trên các kết quả về hồ sơ protein liên quan đến màng ngoài, cấu trúc bề mặt, mức độ đại diện của các nhóm phân cụm và đặc điểm độc lực. Các vắc xin bất hoạt được đánh giá về bảo hộ thông qua gây nhiễm thực nghiệm bằng *A. hydrophila* AH12 và *A. dhakensis* AD09.

Chuẩn bị vắc xin bất hoạt bằng formalin: các chủng tuyển chọn được bất hoạt bằng formalin theo Dash (2011) có điều chỉnh. Vi khuẩn được tăng sinh trong môi trường TSB theo quy trình chuẩn bị vi khuẩn gây nhiễm. Sau thời gian 18 - 20 giờ nuôi cấy, formalin được bổ sung vào dịch vi khuẩn để đạt nồng độ cuối 0,2% (v/v) và ủ ở 4°C qua đêm. Dịch huyền phù vi khuẩn sau khi bất hoạt được ly tâm (4.000 × g, 20 phút, 4°C), sau đó được rửa 03 lần với dung dịch PBS (pH 7,2). Huyền phù vi khuẩn trong PBS đạt nồng độ cuối cùng tương đương 2,0 × 1010 tế bào/mL và lưu trữ 4°C đến khi sử dụng. Hiệu quả bất hoạt được kiểm tra bằng cách cấy trải dịch huyền phù vi khuẩn trên môi trường TSA và ủ ở 30°C trong 24 - 48 giờ.

Vắc xin được chuẩn bị bằng cách phối trộn dịch vi khuẩn với tá dược MontanideTM ISA 763 VG (Seppic, Pháp) theo tỷ lệ 1:1. Nhóm đối chứng âm được tiêm PBS và ISA 763 theo cùng tỷ lệ.

Thiết kế thí nghiệm đánh giá hiệu quả bảo hộ của vắc xin đối với A. hydrophila và *A.* dhakensis: cá tra giống có khối lượng trung bình 15 ± 2 g được phân ngẫu nhiên thành tám nghiệm thức, gồm 6 nghiệm thức vắc xin, 1 nghiệm thức đối chứng dương và 1 nghiệm thức đối chứng âm (Bảng 1).

Bảng 1. Thiết kế thử nghiệm hiệu quả các vắc xin từ vi khuẩn *A. dhakensis*

Nghiệm thức vắc xin	Số cá (n)	Gây nhiễm
VAD01	60	A. hydrophila AH12 $1,3 \times 10^2$ CFU/cá (10 cá/bể × 3 lần); A. dhakensis AD09 $1,3 \times 10^3$ CFU/cá (10 cá/bể × 3 lần)
VAD09	60	
VAD10	60	
VAD19	60	
VAD21	60	
VCXD172	60	
Đối chứng dương	60	
Đối chứng âm	30	Không gây nhiễm

Cá tra ở các nghiệm thức vắc xin được tiêm xoang bụng 0,1 mL vắc xin tương ứng 1×10^9 CFU/cá. Nhóm đối chứng âm được tiêm 0,1 mL hỗn hợp PBS và MontanideTM ISA 763 VG, nhóm đối chứng dương không được tiêm vắc xin. Mũi tiêm nhắc được thực hiện sau 30 ngày với cùng loại vắc xin và liều lượng như lần tiêm thứ nhất. Trong suốt thời gian gây miễn dịch, cá được cho ăn hai lần mỗi ngày và được theo dõi sức khỏe hằng ngày.

Sau 30 ngày khi tiêm liều nhắc, cá của mỗi nghiệm thức được chia ngẫu nhiên thành hai nhóm gây nhiễm với *A. hydrophila* AH12 và *A. dhakensis* AD09 (Bảng 1). Cá được theo dõi trong 10 ngày để ghi nhận dấu hiệu lâm sàng và tỷ lệ chết.

2.2.5. Phương pháp xử lý thống kê

Sự khác biệt về giá trị $\log_{10}(LD_{50})$ giữa hai nhóm Sequence Type ST251 và ST656 được đánh giá bằng phép kiểm Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney U test) cho hai nhóm độc lập với mức ý nghĩa là $p < 0,05$. Các chủng STNF không được xử lý thống kê do cỡ mẫu hạn chế (n = 5) và được trình bày dạng mô tả.

Đối với mô hình gây nhiễm (*A. hydrophila* AH12 và *A. dhakensis* AD09), tỷ lệ sống của cá được ước lượng theo phương pháp Kaplan-Meier. Sự khác biệt giữa các đường cong sống sót của các nhóm thí nghiệm trong cùng mô hình gây nhiễm được đánh giá bằng phép kiểm log-rank (Mantel-Cox). Giá trị $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

Các so sánh từng cặp giữa mỗi nhóm vắc xin và nhóm đối chứng dương trong cùng mô hình gây nhiễm được thực hiện bằng phép kiểm log-rank có hiệu chỉnh Bonferroni. Giá trị p hiệu chỉnh < 0,05 được xem là có ý nghĩa thống kê.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu Môi trường và Bệnh Thủy sản miền Nam trong giai đoạn từ năm 2022 đến 2025.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân bố và tần suất xuất hiện của các gen độc lực dự đoán giữa *A. hydrophila* và *A. dhakensis*

Phân tích dự đoán ban đầu trên 52 gen liên quan đến độc lực ở 37 chủng *Aeromonas* cho thấy các gen tạo thành 17 hồ sơ dựa trên kiểu hiện diện/vắng mặt giống nhau. Tuy nhiên, để phân tích các hồ sơ có giá trị mô tả khác biệt giữa các nhóm chủng, 11 gen được loại khỏi phân tích so sánh do xuất hiện với tần suất thấp hoặc hiện diện/vắng mặt ở tất cả các chủng khảo sát. Do đó, 41 gen được sử dụng cho các phân tích tiếp theo (Bảng 2). Việc phân nhóm các gen này giúp phản ánh đặc điểm phân bố của các gen liên quan đến độc lực trong tập hợp chủng nghiên cứu.

Bảng 2. Phân bố các nhóm gen liên quan đến độc lực *A. hydrophila* và *A. dhakensis*

Ký hiệu	Thành phần gen	A. hydrophila ST251 (n = 14)	A. dhakensis ST656 (n = 19)	A. dhakensis STNF (n = 4)	Đặc điểm phân bố
G1	*aerA/act, vgrG1*	14 (100%)	19 (100%)	2 (50,0%)	Bảo tồn hai dòng ST251 và ST656
G2	29 gen có cùng kiểu hiện diện/vắng mặt	14 (100%)	0 (0%)	0(0%)	Chỉ phát hiện *A. hydrophila*
G3	maf-2	0 (0%)	19 (100%)	4 (100%)	Chỉ phát hiện ở *A. dhakensis*
G4	*flaA, flaB, mshB, pomA2, tapM*	14 (100%)	0 (0%)	0(0%)	Đặc trưng cho *A. hydrophila* ST251
G5	flaG	14 (100%)	2 (10,5%)	3 (75,0%)	Biến thiên giữa các loài
G6	flrC	14 (100%)	12 (63,2%)	3 (75,0%)	Biến thiên trong *A.dhakensis*
G7	cheW	14 (100%)	7 (36,8%)	4 (100%)	Biến thiên trong *A.dhakensis*
G8	motX	14 (100%)	6 (31,8%)	4 (100%)	Biến thiên trong *A.dhakensis*

Ghi chú: Giá trị được trình bày dưới dạng số chủng mang gen n (%) trong từng nhóm.

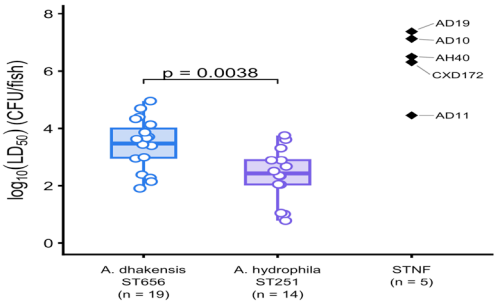
G2 gồm 29 gen có kiểu hiện diện/vắng mặt hoàn toàn giống nhau trong toàn bộ 37 chủng khảo sát. Các gen thuộc nhóm G2 bao gồm: *ast, cheA-2, cheB-2, flaH, flaJ, fliK, flp1, flpA, flpB, flpC, flpD, flpE, flpF, flpG, flpH, flpI, flpJ, flpK, flpL, motA, mshD, mshF, mshO, mshQ, pomB, tapB, tapN, tapO* và *tapP*.

Trong tám hồ sơ này, G1 (*aerA/act* và *vgrG1*) được phát hiện ở toàn bộ các chủng *A. hydrophila* ST251 và *A. dhakensis* ST656, đồng thời hiện diện ở 50,0% các chủng *A. dhakensis* STNF. Điều này cho thấy đây là nhóm gen được bảo tồn giữa hai dòng dịch tễ chủ yếu. Tuy nhiên, nhóm G2 (29 gen có cùng kiểu hiện diện/vắng mặt), G3 (*maf-2*) và G4 (*flaA, flaB, mshB, pomA2* và *tapM*) thể hiện sự phân bố đặc hiệu. Trong đó, G2 và G4 chỉ ghi nhận ở *A. hydrophila* ST251, trong khi G3 chỉ xuất hiện ở *A. dhakensis* (ST656 và STNF), phản ánh sự khác biệt rõ rệt về thành phần gen liên quan đến độc lực giữa hai dòng vi khuẩn.

Bốn hồ sơ còn lại (G5-G8) thể hiện mức độ biến thiên trong *A. dhakensis*. Các gen *flaG, flrC, cheW* và *motX* đều hiện diện 100% chủng *A. hydrophila* ST251, nhưng chỉ xuất hiện lần lượt ở 10,5%, 63,2%, 36,8% và 31,8% số chủng *A. dhakensis* ST656. Trong khi đó, các chủng STNF của *A. dhakensis* mang các tổ hợp gen trung gian với tần suất hiện diện từ 75,0% đến 100%.

3.2. Độc lực các chủng nhóm *Aeromonas* trên cá tra thông qua giá trị LD_{50}

Giá trị $\log_{10}(LD_{50})$ của các chủng *A. hydrophila* ST251 thấp hơn đáng kể so với các chủng *A. dhakensis* ST656 (Wilcoxon rank-sum, $p = 0,0038$) (Hình 1). Trung vị $\log_{10}(LD_{50})$ của ST251 là 2,43 (Q1-Q3 tương ứng 2,04 - 2,89), thấp hơn so với ST656 là 3,47 (Q1-Q3 tương ứng 2,97 - 4,00). Khoảng tứ phân vị của hai dòng ST251 và ST656 tương đồng với giá trị IQR là 0,84 và 1,02 theo thứ tự trên. Bên cạnh đó, khoảng biến thiên giá trị $\log_{10}(LD_{50})$ của ST656 (1,91 - 4,95) rộng hơn so với ST251 (0,78 - 3,76).



Hình 1. Phân bố giá trị $\log_{10}(LD_{50})$ của các chủng *A. hydrophila* ST251, *A. dhakensis* ST656 và các chủng thuộc nhóm STNF.

Ghi chú: p = 0,0038 là giá trị được đánh giá bằng phép kiểm Wilcoxon rank-sum giữa ST251 và ST656; các chủng STNF không được đưa vào phân tích thống kê.

Các chủng chưa xác định kiểu trình tự (STNF) không được đưa vào phân tích thống kê do số lượng mẫu hạn chế (n = 5). Tuy nhiên, giá trị $\log_{10}(LD_{50})$ của nhóm này biểu hiện phổ giá trị $\log_{10}(LD_{50})$, trong đó 4 chủng AD19, AD10, AH40, CXD172 có giá trị $\log_{10}(LD_{50})$ cao hơn phần lớn các chủng thuộc hai dòng ST251 và ST256. Trong khi đó, chủng AD11 có giá trị nằm trong khoảng phân bố của hai dòng chính.

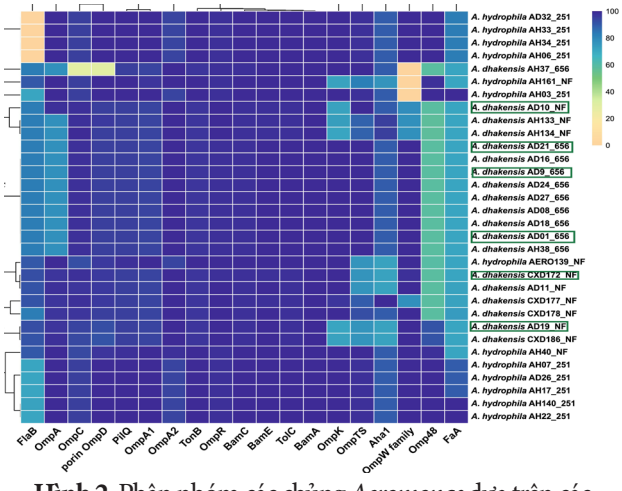
3.3. Phân nhóm các chủng *A. dhakensis* dựa trên các protein màng ngoài và protein bề mặt có tính sinh miễn dịch

Trong nghiên cứu này, các chủng *A. dhakensis* được nhóm dựa trên mức độ tương đồng trình tự của các protein màng ngoài và protein bề mặt nhằm hỗ trợ lựa chọn chủng đại diện cho phát triển vắc xin bất hoạt toàn tế bào. Các chủng *A. hydrophila* ST251 được đưa vào phân tích heatmap với vai trò là nhóm so sánh, qua đó đánh giá mức độ bảo tồn và khác biệt của các protein khảo sát giữa hai loài.

Giá trị phần trăm tương đồng của 19 protein khảo sát được tổng hợp thành ma trận và phân cụm bằng khoảng cách Euclidean kết hợp với thuật toán Ward. D2. Kết quả hình thành 4 cụm, ký hiệu từ A đến D. Trong đó, cụm C là cụm chính của nhóm *A. dhakensis* ST 656 và tách biệt với các vi khuẩn *A. hydrophila* ST251. Sự phân tách giữa hai dòng chủ yếu liên quan đến mức độ tương đồng thấp hơn của OmpA và Omp48, trong khi 17 protein còn lại có mức độ bảo tồn và chia sẻ giữa ST251 và ST656 (Hình 2).

Các chủng *A. dhakensis* chưa xác định kiểu trình tự (STNF) phân bố ở các cụm A, B, D, cho thấy nhóm này không đồng nhất về hồ sơ protein. So với cụm ST656, các chủng STNF khác biệt ở một hoặc một số protein màng ngoài và protein bề mặt. Đáng chú ý, một số chủng STNF này có mức độ tương đồng cao với *A. hydrophila* ST251 về protein OmpA, bao gồm AD10, CXD172, AD11, CXD177, CXD178, AD19, CXD186. Ngoài ra, AD19 và CXD186 còn có mức tương đồng cao với Omp48.

Trên cơ sở tính đại diện của từng cụm và sự khác biệt về hồ sơ tương đồng protein, AD19 được chọn đại diện cho cụm A, CXD172 cho cụm B, AD01, AD09, AD21 cho cụm C và AD10 cho cụm D. Các chủng này được lựa chọn để đánh giá về khả năng bảo hộ trong loài *A. dhakensis* và tiềm năng bảo hộ chéo đối với *A. hydrophila*.



Hình 2. Phân nhóm các chủng *Aeromonas* dựa trên các protein màng ngoài và protein bề mặt có tính sinh miễn dịch

3.4. Hiệu quả bảo hộ trong loài và bảo hộ chéo của các vắc xin bất hoạt thử nghiệm

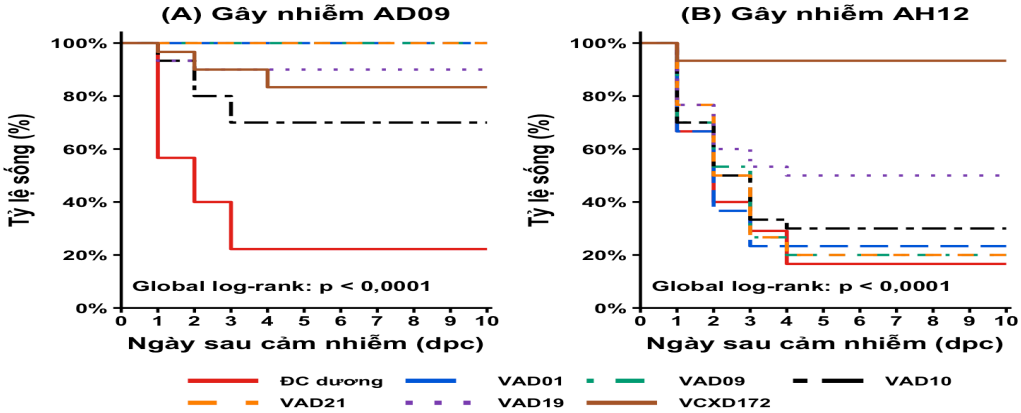
Sau khi gây nhiễm với *A. dhakensis* AD09 (Hình 3A), cá ở nghiệm thức đối chứng bắt đầu chết từ ngày thứ 1 sau cảm nhiễm và hiện tượng chết liên tục được ghi nhận trong 4 ngày đầu. Từ ngày thứ 5 trở đi, không ghi nhận cá chết ở tất cả các nhóm. Trong khi đó, nhóm đối chứng âm không thấy hiện tượng cá chết trong 10 ngày thí nghiệm. So với đối chứng, các nhóm được tiêm vắc xin bất hoạt toàn tế bào có diễn biến chết chậm hơn và duy trì tỷ lệ sống cao hơn trong suốt thời gian theo dõi. Hiệu quả bảo hộ khác nhau giữa các vắc xin đại diện cho bốn cụm phân nhóm. Trong đó, các vắc xin thuộc cụm C (VAD01, VAD09 và VAD21) đạt tỷ lệ sống 100% sau gây nhiễm đồng loài *A. dhakensis* AD09. Vắc xin đại diện cho cụm A (VAD19), cụm B (VCXD172) và cụm D (VAD10) đạt tỷ lệ sống lần lượt là 90,0%, 83,3% và 70,0%, tương ứng với giá trị RPS là 88%, 80% và 64%.

Phân tích Kaplan-Meier cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các đường cong sống của các nhóm (global log-rank, $p < 0,0001$). So sánh từng cặp bằng phép kiểm log-rank có hiệu chỉnh Bonferroni cho thấy tất cả các vắc xin đều có đường cong sống khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng (p hiệu chỉnh < 0,05). Kết quả cho thấy tất cả các vắc xin bất hoạt đều tạo đáp ứng bảo hộ hiệu quả khi gây nhiễm đồng loại *A. dhakensis* AD09, mặc dù mức độ bảo hộ khác nhau giữa các cụm vắc xin.

Sau khi gây nhiễm với *A. hydrophila* AH12 (Hình 3B), hiệu quả bảo hộ của các vắc xin giảm rõ rệt so với khi gây nhiễm đồng loại *A. dhakensis* AD09.

Chỉ vắc xin VCXD172 duy trì tỷ lệ sống cao trong suốt thời gian theo dõi, trong khi các vắc xin còn lại có tỷ lệ sống giảm đáng kể. Giá trị RPS dao động từ 7,69% đến 76,92%, trong đó vắc xin VCXD172 đạt 76,92%. Phân tích Kaplan-Meier cho thấy có sự khác biệt giữa các đường cong sống (global log-rank, *p < 0,0001*). Tuy nhiên, sau hiệu chỉnh Bonferroni thì vắc xin VCXD172 có đường cong sống khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng *(p hiệu chỉnh < 0,05)*. Ngoài ra, vắc xin VAD19 đạt tỷ lệ sống 50,0% với giá trị RPS là 42,31%. Tuy nhiên, sau hiệu chỉnh Bonferroni, sự khác biệt giữa đường cong sống VAD19 và nhóm đối chứng không đạt ý nghĩa thống kê (p hiệu chỉnh 0,0503).

ĐC dương là nhóm cá không được tiêm vắc xin và được gây nhiễm với chủng tương ứng (A) *A. dhakensis* AD09 và (B) *A. hydrophila* AH12. Sự khác biệt giữa các đường cong sống được đánh giá bằng phép kiểm log-rank (Mantel-Cox) (global log-rank *p < 0,0001*).



Hình 3. Đường cong Kaplan-Meier biểu diễn tỷ lệ sống của cá tra được tiêm vắc xin bất hoạt toàn tế bào từ các chủng *A. dhakensis* đại diện và sau gây nhiễm (A) *A. dhakensis* AD09 và (B) *A. hydrophila* AH12

3.5. Thảo luận

Li và cộng sự (2011) đã chỉ ra trên mô hình cá ngựa vằn, giá trị LD_{50} khoảng 106 CFU/cá được sử dụng làm ngưỡng tham khảo để phân biệt các chủng *A. hydrophila* có độc lực cao với các chủng độc lực yếu hoặc không độc lực. Trong nghiên cứu này, các chủng được khảo sát chủ yếu được thu nhận từ cá tra bệnh thực địa nên giá trị trung bình $\log_{10}(LD_{50})$ thấp, lần lượt là 2,38 (với ST251) và 3,46 (với ST656). Kết quả này cũng cho thấy, phân lập được các chủng có độc lực rất cao trong điều kiện gây nhiễm phòng thí nghiệm bằng phương pháp tiêm với giá trị LD_{50} dưới 101 CFU/cá. Tương tự, các chủng *A. hydrophila* phân lập trong đợt dịch bệnh trên cá nheo của Mỹ, giá trị LD_{50} trong khoảng 102 CFU/cá (Pridgeon & Klesius, 2011).

Mặc dù ST251 có giá trị $\log_{10}(LD_{50})$ thấp hơn ST656, khoảng phân bố giá trị $\log_{10}(LD_{50})$ của hai nhóm vẫn chồng lấp, cho thấy không phải tất cả các chủng ST251 đều có độc lực cao hơn ST656. Đồng thời, dữ liệu về hiện diện/vắng mặt gen độc lực chưa xác định được một gen đơn lẻ có thể giải thích đầy đủ sự khác biệt về độc lực (LD_{50}) giữa các chủng. Độc lực của các *Aeromonas* có khả năng là kết quả tổng hợp của tổ hợp gen độc lực, hệ thống bài tiết, yếu tố bám dính, khả năng thu nhận dinh dưỡng và sự điều hoà biểu hiện gen trong quá trình tương tác với vật chủ (Rasmussen-Ivey *et al.*, 2016). Vì vậy, dữ liệu về hiện diện/vắng mặt gen chủ yếu phản ánh tiềm năng di truyền của chủng nhưng chưa phản ánh đầy đủ mức biểu hiện, hoạt tính protein và sự phối hợp của các yếu tố độc lực trong điều kiện gây nhiễm.

Trong khi đó, sự phân tán LD_{50} trong nhóm STNF đã phản ánh sự đa dạng di truyền, thành phần hệ gen phụ trợ và hồ sơ kháng nguyên giữa các chủng không thuộc một dòng vi khuẩn đồng nhất (Payne *et al.*, 2026; Truong *et al.*, 2024).

Bên cạnh độc lực, hồ sơ protein màng ngoài cung cấp thông tin liên quan trực tiếp đến tiềm năng kháng nguyên của các chủng vắc xin. Tuy nhiên, sự tương đồng hay giao thoa về OMP chỉ phản ánh khả năng chia sẻ kháng nguyên và chưa đủ để khẳng định bảo hộ chéo. Phân tích hệ gen so sánh các chủng *A. hydrophila* và *A. dhakensis* phân lập từ cá tra Việt Nam cũng cho thấy hai loài chia sẻ protein màng ngoài và thành phần liên quan đến lipopolysaccharide có tiềm năng sinh miễn dịch, nhưng hiệu quả vắc xin vẫn cần được xác nhận bằng thử nghiệm in vivo (Erickson *et al.*, 2023). Trong nghiên cứu này, chủng *A. dhakensis* CXD172 được chọn là chủng tiềm năng để sản xuất vắc xin bất hoạt toàn tế bào, chủng này có hồ sơ protein màng ngoài chia sẻ với *A. hydrophila* ST251, *A. dhakensis* ST656

Đối với vắc xin bất hoạt toàn tế bào, chủng giống tiềm năng nên duy trì đồng thời một phổ kháng nguyên bề mặt bảo tồn. Trong đó, OmpA và OmpW đã có bằng chứng thực nghiệm về hiệu quả đáp ứng bảo hộ. Các protein khác như Omp48, OmpTS, PilQ và Aha1 có thể xem là protein tiềm năng cần tiếp tục đánh giá. Vì vắc xin bất hoạt toàn tế bào bảo tồn toàn bộ cấu trúc kháng nguyên của vi khuẩn, việc lựa chọn các chủng có mức bảo tồn cao đối với các protein này có thể góp phần mở

rộng phổ đáp ứng miễn dịch và tăng khả năng bảo hộ chéo (Zhang *et al*., 2023).

Kết quả phân tích về phân bố protein màng ngoài cho thấy một số chủng *A. dhakensis* STNF mang hồ sơ protein bề mặt có tính giao thoa với *A. hydrophila* ST251. Tuy nhiên, hiệu quả bảo hộ của các vắc xin có nguồn gốc từ *A. dhakensis* vẫn khác nhau rõ rệt giữa các chủng. Sau khi gây nhiễm *A. dhakensis* AD09, vắc xin có nguồn gốc từ chủng thuộc ST656 đạt mức bảo hộ cao, trong khi các vắc xin từ nhóm STNF có RPS dao động 64 - 88%. Kết quả này cho thấy tính kháng nguyên của từng chủng vẫn đóng vai trò quyết định.

Hiệu lực của vắc xin bất hoạt đơn giá thường cao hơn khi chủng vắc xin và chủng gây nhiễm có mức độ tương đồng kháng nguyên cao. Do tính không đồng nhất về mặt hoá sinh và huyết thanh học, vắc xin đơn giá rất khó tạo ra hiệu quả bảo hộ chéo đáng kể đối với các chủng thuộc các dòng khác nhau (Wang *et al*., 2013). Khoi và cộng sự (2026) cũng cho thấy việc lựa chọn chủng đại diện từ các cụm rep-PCR khác nhau chưa đảm bảo tạo được bảo hộ chéo. Trong nghiên cứu đó, *A. hydrophila* VH31 và *A. dhakensis* VH74 được lựa chọn từ hai cụm khác nhau làm kháng nguyên vắc xin. Tuy nhiên, khi gây nhiễm phối hợp vi khuẩn A. *hydrophila* VH31 và *E. ictaluri* VH116, công thức chỉ chứa kháng nguyên *A. dhakensis* VH74 đạt RPS 12,5% thấp hơn rõ rệt so với các công thức chứa kháng nguyên *A. hydrophila* VH31. Mặc dù thiết kế gây nhiễm phối hợp không cho phép tách hoàn toàn hiệu quả bảo hộ đối với từng tác nhân, kết quả vẫn cho thấy phân nhóm bằng rep-PCR đơn thuần chưa đủ để dự đoán khả năng bảo hộ chéo.

Trái lại, trong nghiên cứu này, chủng *A. dhakensis* (CXD172) được lựa chọn thông qua quy trình dự đoán các kháng nguyên tiềm năng, độc lực và xác nhận thực nghiệm. Chủng CXD172 được lựa chọn có độc lực thấp nhưng chia sẻ nhiều protein màng ngoài với nhóm *A. dhakensis* ST656 và *A. hydrophila* ST251. Vắc xin (VCXD172) tạo bảo hộ đồng thời khi gây nhiễm vi khuẩn *A. dhakensis* (AD09) và *A. hydrophila* (AH12) với tỷ lệ bảo hộ RPS lần lượt là 80,0% và 76,92%.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Các giá trị về LD50, Sequence type (ST), hồ sơ gen độc và OMP cung cấp các thông tin bổ sung nhưng không thể thay thế kết quả thử nghiệm bảo hộ trong nhóm hoặc khác nhóm. Việc lựa chọn chủng giống cho vắc xin bất hoạt toàn tế bào nên dựa trên quy trình tích hợp giữa độc lực thực nghiệm, mức độ bảo tồn kháng nguyên bề mặt và khả năng bảo hộ in vivo đối với chủng cùng và khác loài.

Dựa vào chiến lược lựa chọn chủng trên, nghiên cứu đã chọn chủng vi khuẩn để phát triển vắc xin bất hoạt toàn tế bào. Chủng CXD172 được chọn là chủng tiềm năng dùng để sản xuất vắc xin bất hoạt toàn tế bào, chủng này có hồ sơ protein màng ngoài chia sẻ với *A. hydrophila* ST251, *A. dhakensis* ST656. Đồng thời, vắc xin bất hoạt từ chủng này cho hiệu quả bảo hộ đối với cả gây nhiễm cùng loài *A. dhakensis* AD09 và gây nhiễm khác loài *A. hydrophila* AH12 với tỷ lệ bảo hộ tương ứng là 80% và 76,92%.

4.2. Đề nghị

Ứng dụng thực tiễn vắc xin cần thêm các nghiên cứu mở rộng đánh giá sự bảo hộ trên một số các chủng *A. dhakensis* và *A. hydrophila* khác ngoài hai chủng thử nghiệm trên, đồng thời khảo sát liều sử dụng và độ dài miễn dịch của vắc xin để có quy trình sử dụng vắc xin phòng bệnh xuất huyết trên cá tra hiệu quả.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (nay là Bộ Nông nghiệp và Môi trường) với mã số 630/HĐ-KHCN-CNSH, Trung tâm Nghiên cứu Phát triển Quốc tế (IDRC)- Canada với mã số No. 109057-002.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bartie K.L., Ngô T.P.H., Bekaert M., Hoang Oanh D.T., Hoare R., Adams A., Desbois A.P., 2023. *Aeromonas hydrophila* ST251 and *Aeromonas dhakensis* are major emerging pathogens of striped catfish in Vietnam. *Frontiers in Microbiology*, 13: 1067235. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1067235.

Chen P.-L., Wu C.-J., Chen C.-S., Tsai P.-J., Tang H.-J., Ko W.-C., 2014. A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* isolates in southern Taiwan: *A. dhakensis* is more predominant and virulent. *Clinical Microbiology and Infection*, 20 (7): O428-O434. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12456.

Erickson V.I., Khoi L.M., Hounmanou Y.M.G., Dung T.T., Phu T.M., Dalsgaard A., 2023. Comparative genomic analysis of *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* from diseased striped catfish fingerlings cultured in Vietnam. *Frontiers in Microbiology*, 14: 1254781. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1254781.

Jain C., Rodriguez-R L.M., Phillippy A.M., Konstantinidis K.T., Aluru S., 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, 9 (1): 5114. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9.

Khoi L.M., Aldiano T., Trung N.B., Tuyet Hoa T.T., Dung T.T., 2026. Development and efficacy of autogenous multivalent vaccine to prevent Motile Aeromonas Septicemia (MAS) and Bacillary Necrosis of Pangasius (BNP) in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 171: 111177. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2026.111177.

Liu B., Zheng D., Zhou S., Chen L., Yang J., 2022. VFDB 2022: A general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*, 50 (D1): D912-D917. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107.

Liu Y., Wu Y., Srinivasan R., Liu Z., Wang Y., Zhang L., Lin X., 2022. The protective efficacy of forty outer membrane proteins based DNA vaccines against *Aeromonas hydrophila* in zebrafish. *Aquaculture Reports*, 27: 101381. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101381.

Maiti B., Dubey S., Munang'andu H.M., Karunasagar I., Karunasagar I., Evensen Ø., 2020. Application of outer membrane protein-based vaccines against major bacterial fish pathogens in India. *Frontiers in Immunology*, 11: 1362. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01362.

Murtagh F. & Legendre P., 2014. Ward's hierarchical agglomerative clustering method: Which algorithms implement Ward's criterion? *Journal of Classification*, 31 (3): 274-295. https://doi.org/10.1007/s00357-014-9161-z.

Payne C.J., Phuong V.H., Kurniawan H., Legario F.S., Phuoc L.H., Crumlish M., 2026. Are the genomes of motile Aeromonas species from the aquatic environment shaped by local geography and host species? *Microbial Genomics*, 12 (4): 001618. https://doi.org/10.1099/mgen. 0.001618

Pridgeon J. & Klesius P., 2011. Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in west Alabama (USA) in 2009. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94 (3): 249-253. https://doi.org/10.3354/dao02332.

Rasmussen-Ivey C.R., Figueras M.J., McGarey D., Liles M.R., 2016. Virulence factors of Aeromonas hydrophila: In the wake of reclassification. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1337. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01337.

Reed L.J. & Muench H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27 (3): 493-497. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.

Shahi N., Mallik S.K., Sahoo M., Das P., 2013. Biological characteristics and pathogenicity of a virulent *Aeromonas hydrophila* associated with ulcerative syndrome in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in India. *The Israeli Journal of Aquculture*, 65: 926-936

Tekedar H.C., Abdelhamed H., Kumru S., Blom J., Karsi A., Lawrence M.L., 2019. Comparative genomics of *Aeromonas hydrophila* secretion systems and mutational analysis of *hcp1* and *vgrG1* genes from T6SS. *Frontiers in Microbiology*, 9: 3216. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03216

Truong N.H.M., Nguyen Q., Voong P.V., Chau V., Nguyen N.H.T., Nguyen T.H.M., Vo P.H., Nguyen L. T., Ha T.T.P., Nguyen L.P.H., Le P.H., Thanh D.P., Nguyen H.D., 2024. Genomic characterization of *Aeromonas* spp. Isolates from striped catfish with motile Aeromonas septicemia and human bloodstream infections in Vietnam. *Microbial Genomics*, 10 (5): 001248 https://doi.org/10.1099/mgen.0.001248

Wang N., Yang Z., Zang M., Liu Y., Lu C., 2013. Identification of Omp38 by immunoproteomic analysis and evaluation as a potential vaccine antigen against *Aeromonas hydrophila* in Chinese breams. *Fish & Shellfish Immunology*, 34 (1): 74-81. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.003.

Zhang M., Zhang T., He Y., Cui H., Li H., Xu Z., Wang X., Liu Y., Li H., Zhao X., Cheng H., Xu J., Chen X., Ding Z., 2023. Immunogenicity and protective efficacy of OmpA subunit vaccine against *Aeromonas hydrophila* infection in *Megalobrama amblycephala*: An effective alternative to the inactivated vaccine. *Frontiers in Immunology*, 14: 1133742. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1133742

Zhang T., Zhang M., Xu Z., He Y., Zhao X., Cheng H., Chen X., Xu J., Ding Z., 2023. The screening of the protective antigens of *Aeromonas hydrophila* using the reverse vaccinology approach: Potential candidates for subunit vaccine development. *Vaccines*, 11 (7): 1266. https://doi.org/10.3390/vaccines11071266.

Establishing criteria for selecting *Aeromonas dhakensis* strains as candidate strain for developing a whole-cell inactivated vaccine with cross-protective potential against hemorrhagic disease in striped catfish *(Pangasianodon hypophthalmus)*

Vo Hong Phuong, Truong Ha Minh Nhat, Nguyen Thanh Tung, Nguyen Le Phuong Ngan, Le Hong Phuoc, Nguyen Duc Hoang

Abstract

Motile Aeromonas septicemia (MAS), caused by *Aeromonas hydrophila* and *A. dhakensis*, is one of the most important bacterial diseases affecting striped catfish. Selecting an appropriate bacterial strain is important for producing an inactivated vaccine against MAS. However, a criteria for selecting bacterial strain capable of providing cross-protection between two species for the development of inactivated vaccine development have not been established. This study aimed to propose a bacterial strain selection based on a combination of virulence assessment, genomic analysis and outer membrane protein profile, followed by validation of their protective efficacy through challenge trials. The results showed the CXD172 *A. dhakensis* belonging to STNF group as a promising strain for vaccine production due to its conserved OMP profiles with both *A. hydrophila* ST251 and *A. dhakensis* ST656. In addition, the inactivated vaccine derived from this strain demonstrated protective efficacy against the homologous *A. dhakensis* AD09 and with the heterologous *A. hydrophila* AH12, with relative percent survival (RPS) values of 80.0% and 76.92%, respectively. This study provides an initial basis for screening and selecting strains with the potential to develop an inactivated vaccine against MAS.

Keywords: *Aeromonas dhakensis*, *Aeromonas hydrophila*, cross protection, motile Aeromonas septicemia, vaccine

Ngày nhận bài: 28/7/2026 Người phản biện: TS. Trần Thị Mỹ Duyên, TS. Võ Văn Tuấn

Ngày duyệt đăng: 18/8/2026 Ngày phản biện: 06/8/2026