

TRƯỜNG ĐH CÔNG NGHIỆP TP HỒ CHÍ MINH  
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC PHẨM  
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC ĐỘNG VẬT

— ✪ —

## TIỂU LUẬN

### Đề tài:

**TẠO VACCINE TÁI TỔ HỢP ỨNG DỤNG TRONG PHÒNG  
BỆNH MỦ GAN DO VI KHUẨN *EDWARDSIELLA ICTALURI* GÂY  
RA Ở CÁ TRÁ KHU VỰC ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG**

**GVHD** : Th.S Lê Trâm Nghĩa Thư

**Lớp** : CDSH12

**Nhóm** : 4

Tên thành viên	MSSV
<b>Bùi Thị Kim Anh</b>	<b>10298741</b>
<b>Nguyễn Thị Duyên</b>	<b>10200721</b>
<b>Đoàn Vũ Hương</b>	<b>10246581</b>
<b>Trương Thị Mỹ Liên</b>	<b>10282341</b>
<b>Nguyễn Thị Khánh Ly</b>	<b>10261151</b>
<b>Tạ Thị Thu Trang</b>	<b>10252351</b>
<b>Nguyễn Thị Thoa</b>	<b>10263841</b>

*Tp.HCM, tháng 6 năm 2012*

## **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Đồng bằng sông Cửu Long có hệ thống sông ngòi chằng chịt với 2 dòng sông Tiền và sông Hậu chảy qua với chiều dài mỗi sông khoảng 220km nên điều kiện tự nhiên khá thuận lợi cho hoạt động nuôi cá tra trên các ao ven sông, trên cồn (dễ dàng trong hoạt động lấy nước), cộng với kỹ thuật nuôi không quá khó nên nghề nuôi cá tra khu vực này phát triển mạnh nhất là trong vài năm trở lại đây. Hầu hết các tỉnh có lợi thế cho hoạt động nuôi cá tra ao thâm canh đều có quy hoạch vùng nuôi cá tra.

Theo quy hoạch phát triển chung cho vùng đồng bằng sông Cửu Long vừa được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn phê duyệt thì tốc độ tăng trưởng diện tích trong vùng trong các năm tới trung bình khoảng 4,2%/năm. Cụ thể đến năm 2010 diện tích nuôi cá tra của vùng đạt 8.600 ha tập trung chủ yếu ở Đồng Tháp là 2.300 ha, An Giang với 2.100 ha. Đến năm 2015, diện tích nuôi cá tra của vùng đạt 11.000 ha và đến năm 2020 là 13.000 ha. Theo báo cáo của Bộ, đến nay diện tích thả nuôi cá tra đạt 5.154 ha, tăng gần 600 ha so với cùng kỳ năm trước, thấp hơn so với dự kiến do ảnh hưởng khủng hoảng kinh tế thế giới, hoạt động xuất khẩu sụt giảm. Nhưng theo thông tin thị trường thì người tiêu dùng thế giới vẫn thích ăn cá tra kể cả dân Việt Nam cũng vậy. Do đó, khủng hoảng kinh tế rồi sẽ đi qua, xuất khẩu thủy sản sẽ tăng trưởng trở lại và hoạt động nuôi cá tra cũng sẽ phục hồi, phát triển theo định hướng quy hoạch.

Tuy nhiên việc nuôi cá tra cũng gặp phải những vấn đề rất đáng lo ngại, đó là dịch bệnh do các loại vi sinh vật gây ra, trong đó nguy hiểm nhất là bệnh mù gan.

Bệnh mù gan được phát hiện lần đầu tiên tại Việt Nam năm 1998. Đây là một bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng cho các hộ nuôi cá tra, basa ở Đồng Bằng Sông Cửu Long. Tỷ lệ xuất hiện bệnh mù gan trên cá tra khoảng (61%) không cao

hơn nhiều so với các bệnh khác như bệnh đở mỗ đở kỳ (68,3%), bệnh phù đầu (51,2%) (Trần Anh Dũng, 2005)... Nhưng tỷ lệ chết là cao nhất (60 - 80%) (Crumlish và ctv,2002) làm giảm năng suất đáng kể trong các hệ thống nuôi.

    Tìm hiểu về bệnh mủ gan trên cá tra, basa nhằm tìm ra biện pháp phòng trị bệnh hiệu quả là mối quan tâm hàng đầu của các nhà nuôi cá.

# NỘI DUNG

## I. BỆNH MỦ GAN

### 1. Nguyên nhân gây bệnh

Bệnh mủ gan (bệnh đốm trắng trên gan, thận) trên cá tra, cá basa do nhóm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây ra (Crumlish và ctv, 2002). Vi khuẩn *E. ictaluri* thuộc họ Enterbacteriaceae là vi khuẩn gram âm, hình que, kích thước 1 x 2- 3µm, không sinh bào tử, là vi khuẩn yếm khí tùy tiện, phản ứng catalase



Cá bị xuất huyết toàn thân

dương tính, oxidase âm tính, không oxy hoá, lên men trong môi trường glucose. Có 1 - 3 Plasmid liên kết với *E. Ictaluri* (Speyerer và Boyle, 1987; Newton và ctv, 1988). Những plasmid có thể đóng vai trò quan trọng trong việc đề kháng với kháng sinh. *E. ictaluri* là một trong những loài khó tính nhất của chủng *Edwardsiella*. Tăng trưởng chậm trên môi trường nuôi cấy, cần từ 36-48 giờ ở 28 - 30°C để phát triển mọc thành khuẩn lạc nhỏ trên thạch BHI (Brain heart infusion Agar) và vi khuẩn tăng trưởng chậm hoặc không tăng trưởng khi ủ ở 37°C (Valerie và ctv, 1994). Vi khuẩn có thể phân lập từ mẫu cá bệnh (gan, thận, tỳ tạng) trên môi trường TSA (Tryptone Soya Agar) hoặc EMB (Eosine Methylene blue lactase Agar) sau 48 giờ ở 28°C tạo thành khuẩn lạc này trắng đục.

### 2. Đường lây truyền.

Bệnh thường xảy ra nhiều vào mùa mưa lũ kéo dài đến mùa khô. Thời điểm phát triển bệnh và mức độ thiệt hại khác nhau theo từng năm.

*E. ictaluri* có thể nhiễm cho cá bằng hai đường khác nhau. Vi khuẩn trong nước có thể, qua đường mũi của cá xâm nhập vào cơ quan khứu giác và di chuyển vào dây thần kinh khứu giác, sau đó vào não (Miyazaki và Plumb 1985; Shotts và

ctv,1986). Bệnh lan rộng từ màng não đến sọ và da. *E. ictaluri* cũng có thể xâm nhiễm qua đường tiêu hoá qua niêm mạc ruột vào máu gây nhiễm trùng máu (Shotts và ctv, 1986). Bằng đường này thì vi khuẩn vào mao mạch trong biểu bì gây hoại tử và mất sắc tố của da. Cá da trơn còn nhiễm *E. ictaluri* qua đường miệng gây nhiễm khuẩn ruột. Bệnh tiến triển gây viêm ruột, viêm gan và viêm cầu thận trong vòng 2 tuần sau khi nhiễm bệnh (Shotts và ctv, 1986).

Tóm lại, vi khuẩn *E. ictaluri* có thể xâm nhập vào cơ thể cá từ môi trường nước qua da, qua mang cá và qua miệng bằng đường thức ăn gây bệnh mù gan cho cá.

### 3. Triệu chứng

❖ Mức độ nhẹ: Bên ngoài thân cá bình thường không biểu hiện xuất huyết, mắt hơi lồi nhưng khi mổ ra thì gan, thận, tỳ tạng có nhiều đốm trắng (như đốm mù). Đó là biểu hiện bệnh lý đặc trưng nhất của bệnh mù gan.

❖ Mức độ nặng: Cá bệnh bỏ ăn, bơi lơ dờ trên mặt nước, cá thường nhào lộn và xoay tròn. Khi bệnh nặng cá không phản ứng với tiếng động. Một số cá xuất huyết tất cả các vi hoặc xuất huyết toàn thân. Có khi cá xuất huyết trầm trọng, khi nhấc lên khỏi mặt nước máu sẽ chảy ra từ da và mang cá.

Một số cá bệnh còn biểu hiện màu sắc nhợt nhạt, có nhiều bệch lớn, nhỏ trên da. Số lượng cá chết hằng ngày khá cao và tỷ lệ tăng dần.

### 4. Bệnh tích

#### 4.1. Bệnh tích đại thể (*Gross lesion*)

Gan, thận cá bệnh sưng rất to, thận có hiện tượng nhũn, tỳ tạng sưng ít hơn. Trên gan, thận, tỳ tạng xuất hiện nhiều đốm trắng tròn, đường kính khoảng 1- 3 mm khắp bề mặt và cả bên trong cơ



gan, thận, tỳ tạng xuất hiện nhiều đốm trắng

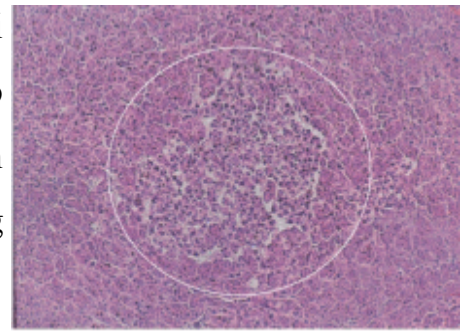
quan. Những đốm trắng này có chứa dịch hơi đặc. Khi cấy những đốm trắng này lên môi trường thạch sau 24 giờ thấy xuất hiện các khuẩn lạc thuần nhất.

Các đốm trắng này dễ nhầm lẫn với các đốm trắng do nhóm thích bào tử trùng gây ra. Tuy nhiên, đốm trắng do ký sinh trùng gây ra thường xuất hiện không nhiều, đa số chỉ xuất hiện trên tỳ tạng và không nổi rõ. Khi quan sát dưới kính hiển vi, nếu bên trong các đốm trắng có chứa dịch màu trắng như sữa thì đó hoàn toàn là bào tử trùng. Còn khi cá bị bệnh đốm trắng do vi khuẩn thì các đốm trắng nổi rất nhiều, lộ rõ trên bề mặt và xuất hiện trên cả ba cơ quan là gan, thận và tỳ tạng.

#### **4.2. Bệnh tích vi thể**

##### ***Gan***

Quan sát tiêu bản ở gan có đốm trắng dưới kính hiển vi cho thấy đây là vùng hoại tử. Các tế bào gan không còn sát nhau như ở mô thường mà tách rời ra từng tế bào hoặc thoái hoá thành một vùng không còn nhận ra được cấu trúc với nhiều mức độ.



*Vùng mô bị hoại tử*

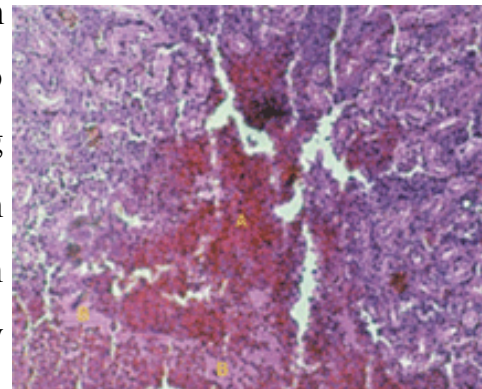
Giai đoạn đầu hiện tượng sung huyết động mạch và tĩnh mạch gan, đặc biệt là hệ thống xoang mao mạch giữa các dây tế bào gan làm cho toàn bộ tổ chức gan bị sưng to. Sau đó, do quá trình sung huyết kéo dài dẫn đến vỡ mạch máu và giải thoát nhiều enzyme (protease, lipase,...) làm các tế bào ở vùng viêm bị hủy hoại dẫn đến hoại tử. Lúc này quan sát thấy những tế bào đã tách rời nhau, nhân tế bào co lại và vỡ vụn, cuối cùng những tế bào này bị tiêu hủy.

Khi cá bệnh nặng, những tổn thương lan rộng làm gan không còn chức năng khử độc và lọc máu, làm chất độc tích tụ trong cơ thể kết hợp với những yếu tố khác làm cá chết. Ngoài ra, do tổ chức gan bị hư hại làm mất khả năng tiết mật của gan. Một số cá mới chết khi mổ ra thấy túi mật bị vỡ, dịch mật lan tràn khắp nội

quan. Điều này có thể do khi gan bị hoại tử đồng thời cũng hoại tử ống dẫn mật và túi mật làm túi mật vỡ, dịch mật thoát ra ngoài.

### ***Thận***

Cấu trúc vi thể của thận bị hủy hoại trầm trọng, các phản ứng sung viêm xảy ra ở toàn bộ tổ chức. Thận sưng to đồng thời bị nhũn do sung huyết, một phần có thể do tích tụ nước trong thận mà không đào thải được do hệ thống tiểu cầu thận và ống thận bị hư hại. Phản ứng viêm kéo dài gây hoại tử và mất chức năng các đơn vị cấu tạo nên thận. Mô tạo máu nằm xen kẽ với các tế bào kẽ và



*Thận sung huyết (A) và có dịch viêm (B)*

các tế bào nội tiết của thận cũng bị hoại tử làm cho máu trong cơ thể bị giảm sút. Khi thận bị hoại tử, chức năng bài tiết chất thải trong quá trình trao đổi chất bị ngưng trệ. Trong khi đó quá trình trao đổi chất lại đặc biệt tăng mạnh do cơ thể cá huy động các tổ chức nhằm đào thải các tác nhân gây bệnh. Ngoài ra, hai loại hormone tuyến thượng thận là adrenalin và noradrenalin không được sản xuất khi thận bị hoại tử cũng góp phần làm rối loạn chức năng sinh lý của cá.

### ***Tỳ tạng***

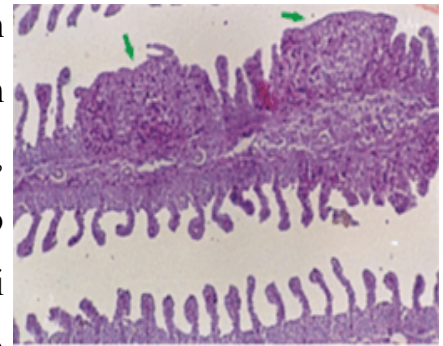
Cùng với gan và thận, tỳ tạng cũng là cơ quan bị hủy hoại nặng khi cá bị bệnh mù gan. Những đốm trắng trên tỳ tạng là những vùng mô hoại tử, với nhiều mức độ khác nhau.

Đối với cá bệnh nặng, nhiều vùng hoại tử dạng hạt lan rộng, phá hủy các các tiểu thể hình elip tròn xoay (là vùng chức năng của tỳ tạng, nơi tiêu huỷ các vật lạ và vi khuẩn xâm nhập vào cơ thể). Khi tác nhân gây bệnh xâm nhập quá nhiều sẽ gây ra tình trạng quá tải đến một lúc nào đó tế bào sẽ mất chức năng và thoái hoá. Quá trình hoại tử ở tỳ tạng bắt đầu từ quá trình thoái hoá và hoại tử các tiểu thể tỳ

tạng làm mất chức năng tạo hồng cầu mới và phá hủy hồng cầu già cũng như không thể sản xuất các tế bào lympho và bạch cầu bảo vệ cơ thể, chống các tác nhân gây bệnh. Cũng như thận, mô tạo máu bị phá hủy nên tỳ tạng mất chức năng cung cấp máu cho cơ thể.

### ***Mang***

Quan sát lát cắt ngang của mang cá dưới kính hiển vi cho thấy có những vùng các sợi mang bị dính lại với nhau. Điều này có thể do khi vi khuẩn tấn công, phản ứng miễn nhiễm tự bảo vệ của cơ thể cá làm cho các sợi mang bị sưng lên và khi hai hoặc nhiều sợi mang ở gần nhau sưng lên cùng lúc sẽ dẫn đến sự tiếp xúc của các sợi mang và do ở đây chỉ được bao bọc bởi một lớp tế bào rất mỏng với nhiều mạch máu nhỏ nên rất dễ bị phình lên dưới tác động của phản ứng viêm hay do vi khuẩn tấn công.



*các sợi mang bị dính lại với nhau*

Sự dính lại của các sợi mang làm giảm khả năng hô hấp của mang do giảm diện tích tiếp xúc với nước và do mất chức năng ở các vùng sợi mang bị dính lại hay hoại tử. Do đó cá bệnh sẽ có biểu hiện thiếu oxy và thường tập trung ở mặt nước. Điều này càng trầm trọng hơn khi cá bị mất máu do hiện tượng xuất huyết và vùng mô tạo máu ở thận và tỳ tạng bị hủy hoại.

### ***Tim và cơ***

Quan sát tiêu bản tim và cơ cá bệnh dưới kính hiển vi không thấy biến đổi lớn về mô học. Điều này chứng tỏ hai cơ quan này ít bị ảnh hưởng trực tiếp bởi vi khuẩn.

Tóm lại, khi cá bị bệnh mủ gan các cơ quan bị hủy hoại nặng nhất là gan, thận, tỳ tạng kể đến là mang cuối cùng bị ảnh hưởng nhẹ nhất là tim và cơ và



nguyên nhân làm chết cá có thể do gan, thận, tỳ tạng, mang bị hư hại dẫn đến mất chức năng của các cơ quan này.

## **5. Khả năng bùng phát bệnh**

Tốc độ lây lan của bệnh gan thận mủ rất nhanh. Trong điều kiện thí nghiệm, khi có mầm bệnh xâm nhập, khoảng 3- 4 ngày toàn bộ cá nuôi trong bể đều bị nhiễm bệnh, nếu không có biện pháp chăm sóc và quản lý hệ thống nuôi. Do đó cần áp dụng biện pháp phòng bệnh tích cực một cách đồng bộ.

Cho đến nay các biện pháp phòng và chữa bệnh chủ yếu vẫn là sử dụng thuốc sát trùng và kháng sinh. Tuy nhiên, sử dụng thuốc sát trùng thường để lại hậu quả nghiêm trọng về môi trường. Mặt khác, thuốc kháng sinh cũng có nguy cơ dẫn đến phá vỡ hệ vi khuẩn trong môi trường, hủy diệt các loại vi sinh vật không gây bệnh có lợi, tạo ra các chủng vi sinh vật gây bệnh kháng kháng sinh. Hơn thế nữa, thuốc kháng sinh có thể gây ra hiện tượng chuyển gen kháng thuốc cho những loại vi khuẩn khác chưa hề tiếp xúc với kháng sinh. Vì thế tồn dư thuốc sát trùng và kháng sinh trong thực phẩm luôn là vấn đề được quan tâm hàng đầu của các cơ quan quản lý an toàn vệ sinh thực phẩm của mỗi quốc gia cũng như những đơn vị xuất nhập khẩu thực phẩm.

Trước tình hình trên, yêu cầu đặt ra là phải có một loại chế phẩm sinh học chứa độc tố gây hại cho môi trường và ảnh hưởng tới sức khỏe con người khi sử dụng thực phẩm này đồng thời có khả năng giúp vật nuôi phòng trừ được bệnh dịch càng sớm càng tốt.

Ưu điểm của vaccine tái tổ hợp:

- Rất an toàn do nó không chứa mầm bệnh.
- Có tốc độ sinh sản cực nhanh nên cho năng suất sản xuất cao.
- Ngoài ra không cần phải bảo quản lạnh nên thuận lợi cho người nông dân.

## II. TẠO VACCINE TÁI TỔ HỢP

**Bước 1:** Xác định đoạn gen mang kháng nguyên trên vi khuẩn... Chọn một số protein có tính kháng nguyên của *E.ictaluri* như OmpA, OmpN, GAPDH. Các protein được biểu hiện trên hệ thống *E. coli*.

**Bước 2:** Sử dụng enzyme cắt đặc hiệu cắt lấy đoạn gen đó.

**Bước 3:** Cắt gen của thể truyền phage T4.

**Bước 4:** Nối gen kháng nguyên vào gen của thể truyền.

**Bước 5:** Chuyển gen tái tổ hợp vào thể truyền

**Bước 6:** Nuôi cấy thể truyền trên vi khuẩn *e.Coli*.

**Bước 7:** Thu dịch nuôi cấy tách chiết tinh chế để sản xuất vaccine.

## III. THỬ NGHIỆM TRÊN THỰC TẾ

### 1. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện trên 3 ao ở 3 địa điểm khác nhau, với tổng số khoảng 300.000 cá giống, liều tiêm 0,05 ml vaccine/cá và khoảng 300.000 cá đối chứng.

Cá có trọng lượng 28-58g, sau khi tiêm bố trí nuôi hai nhóm cá riêng rẽ trong cùng 1 ao nuôi và theo dõi liên tục 170 ngày. Ghi chép hằng ngày các chỉ tiêu môi trường, tỷ lệ cá chết và các biểu hiện bất thường của cá.

### 2. Đánh giá tính an toàn của vắc xin

#### 2.1. Tỷ lệ chết tích lũy trong 21 ngày sau khi tiêm vaccine.

Sau khi tiêm vắc xin, theo dõi vớt đếm cá chết mỗi ngày 2 lần. Số cá chết trong 21 ngày đầu trong mỗi nhóm cá là tiêu chí so sánh để đánh giá tính an toàn của vắc xin.

## ***2.2. Theo dõi tăng trưởng của cá***

Thu mẫu tối thiểu 30 con trong mỗi nhóm cá tiêm vaccine và đối chứng. Bắt cá ngẫu nhiên bằng vợt hoặc chài sau 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 110, 140 và 170 ngày từ khi tiêm vắc xin. Mẫu được gây mê và cân đo.

## ***2.3. Quan sát phản ứng của cơ thể cá bằng mắt thường.***

Thu mẫu ngẫu nhiên 30 cá thể sau 60, 110 và 170 ngày từ khi tiêm để mô, quan sát và đánh giá các phản ứng trong cơ thể cá tra với vắc xin bằng mắt thường. Ghi nhận các phản ứng kết dính các cơ quan nội tạng với nhau hoặc với thành bụng, sự hình thành sắc tố melanin trong xoang bụng và thành bụng, dư lượng vaccine (ở dạng tự do và ở dạng hạt).

## ***2.4. Quan sát sự thay đổi cấu trúc mô.***

Để đánh giá phản ứng của cơ thể cá với vaccine ở mức độ tế bào, sau khi tiêm vắc xin 5, 10, 20 và 60, 110, 170 ngày; thu khoảng 10 mẫu mô trong mỗi lô thí nghiệm, bao gồm tim, gan, thận, lách, màng treo ruột, một phần da và mô ngay vị trí tiêm, cố định mẫu trong formaline 10%. Các mẫu này sau đó được xử lý, cắt, nhuộm, phân tích. Phương pháp mô học bao gồm: nhuộm Hematoxyline – Eosin (Ferguson 2006) và nhuộm hóa mô miễn dịch (Evensen & Olesen 1997).

## **3. Đánh giá tính hiệu quả của vaccine**

### ***3.1. Xác định hiệu giá kháng thể trong máu cá.***

Ngoài việc thu mẫu máu xác định kháng thể cá trước khi tiêm vaccine, còn lấy mẫu máu định kỳ với khoảng 20 cá thể trong mỗi nhóm tại các thời điểm 10, 20, 30, 40, 50, 80, 110, 140 và 170 ngày sau khi tiêm vaccine. Phương pháp vi ngưng kết kháng nguyên - kháng thể trên đĩa 96 giếng của Roberson (1990).

### ***3.2. Tỷ lệ chết tích lũy do E. ictaluri***

*Thu mẫu cá và xác định nguyên nhân gây chết:*

Khi cá có các dấu hiệu bệnh hoặc cá chết tăng bất thường trong ao thí nghiệm, tiến hành lấy mẫu vi khuẩn từ ít nhất 20 con có triệu chứng lâm sàng và 20 con còn khỏe trong mỗi nhóm thí nghiệm để phân tích nguyên nhân. Cá bệnh do vi khuẩn *E. ictaluri* khi trên gan, thận, lách có những đốm mủ màu trắng đặc trưng và phân lập thấy có sự hiện diện của vi khuẩn *E. ictaluri*.

Cá được lấy mẫu vi khuẩn (ở gan, thận và tỳ tạng) cấy trên môi trường Tryptic Soy Agar (TSA) và ủ ở 28<sup>0</sup>C trong 24 - 48 giờ. Sau khi tách rông (thuần), vi khuẩn được định danh theo Ferichs and Millar (1993). Việc thu mẫu vi khuẩn và ký sinh trùng định kỳ cũng được thực hiện thông qua những đợt thu mẫu cá đánh giá tính an toàn của vắc xin vào các thời điểm 60, 110 và 170 ngày sau khi tiêm vaccine.

*Cách tính tỷ lệ chết của cá:*

Tỷ lệ chết được ghi nhận hằng ngày. Số liệu trong suốt giai đoạn xảy ra bệnh do *E. ictaluri* được xử lý thống kê và tính hệ số bảo hộ RPS (Relative Percentage Survival). Tỷ lệ cá chết tích lũy ở các nhóm cá trong thời gian bộc phát bệnh do *E. ictaluri* được ghi nhận bằng cách mổ tất cả cá chết để quan sát sự hiện diện của hạt vaccine và phân biệt cá thuộc nhóm vắc xin hay đối chứng.

Hệ số bảo hộ RPS trong giai đoạn xảy ra bệnh do vi khuẩn *E. ictaluri* được tính theo công thức: **RSP = (1-(A/B)) x 100**

A: Phần trăm cá chết ở nhóm vaccine do *E. Ictaluri*.

B: Phần trăm cá chết ở nhóm đối chứng do *E. Ictaluri*.

#### **4. Xử lý số liệu**

Tương quan chiều dài, trọng lượng, dư lượng vaccine dạng hạt trong thí nghiệm an toàn được xử lý thống kê bằng các chương trình InStat for windows (version 3.06), T-test, ANOVA một nhân tố với  $P = 0,05$ , Mann-Whiney test và Kruskall-Wallis test. Sự khác biệt về tỷ lệ chết và định lượng kháng thể trong huyết thanh giữa các nhóm cá tiêm vắc xin và nhóm không tiêm vắc xin được xử lý bằng Chi-square test.