



Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ

Số chuyên đề: Thủy sản

website: sj.ctu.edu.vn



DOI:10.22144/ctu.jsi.2020.007

ĐẶC ĐIỂM BỆNH HỌC CỦA VI KHUẨN *Edwardsiella ictaluri* GÂY BỆNH GAN THẬN MỦ TRÊN CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*) VÀ CÁ ĐIỀU HỒNG (*Oreochromis sp.*)

Nguyễn Thị Ngọc Huyền và Đặng Thị Hoàng Oanh *

Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đặng Thị Hoàng Oanh (email: dthoanh@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/10/2019

Ngày nhận bài sửa: 18/11/2019

Ngày duyệt đăng: 23/04/2020

Title:

Pathological characteristics of the *Edwardsiella ictaluri* bacteria causing bacillary necrosis disease in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) and red tilapia (*Oreochromis sp.*)

Từ khóa:

Bệnh gan thận mủ, cá điều hồng (*Oreochromis sp.*), cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*), *Edwardsiella ictaluri*

Keywords:

Bacillary necrosis of pangasius, *Edwardsiella ictaluri*, red tilapia (*Oreochromis sp.*), striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

ABSTRACT

The study was carried out to compare the pathological characteristics of the *Edwardsiella ictaluri* bacterium causing bacillary necrosis disease in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) and red tilapia (*Oreochromis sp.*). Isolated bacteria which were isolated from striped catfish and red tilapia diseases were identified as *Edwardsiella ictaluri* based on morphological, physiological, biochemical characteristics, API 20E kit and PCR with specific primers for *E. ictaluri*. Samples of bacillary necrosis disease have atypical external pathological signs but there are many white spots on the internal organs. Typical histological changes at the location of white spots in liver, spleen and kidney of diseased fish included the formation of granular necrosis and granulomas. The results of pathogenicity experiments showed *E. ictaluri* strains which were isolated from diseased striped catfish were able to cause bacillary necrosis disease in both striped catfish and red tilapia when injected with lethal dose 50 (LD_{50}). However, injection of *E. ictaluri* strains which were isolated from diseased red tilapia solely caused bacillary necrosis disease in red tilapia not striped catfish. The LD_{50} values of *E. ictaluri* in red tilapia and striped catfish (same size of 7.5 - 10g/fish) were approximately 4.7×10^3 CFU/mL and 3.6×10^5 CFU/mL, respectively.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm so sánh đặc điểm bệnh học của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mủ trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) và cá điều hồng (*Oreochromis sp.*). Các chủng vi khuẩn phân lập từ cá tra và cá điều hồng mắc bệnh gan thận mủ được định danh là *Edwardsiella ictaluri* dựa trên những đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa, kit API 20E và PCR với cặp mồi đặc hiệu của *E. ictaluri*. Những mẫu cá bệnh gan thận mủ không có dấu hiệu bệnh lý bên ngoài đặc trưng, bên trong có nhiều đốm trắng trên nội quan. Biến đổi mô học đặc trưng là hiện tượng hoại tử dạng hạt và sự tạo thành các u hạt trên mô gan, thận và tỳ tạng tại vị trí các đốm trắng. Thí nghiệm xác định khả năng gây bệnh ghi nhận vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá tra bệnh gan thận mủ có khả năng gây bệnh ở cá tra và cá điều hồng khi tiêm liều LD_{50} . Tuy nhiên, chủng *E. ictaluri* phân lập từ cá điều hồng bệnh gan thận mủ chỉ gây bệnh ở cá điều hồng mà không gây bệnh ở cá tra. Giá trị LD_{50} của chủng *E. ictaluri* ở cá điều hồng và ở cá tra (cùng kích cỡ 7,5 - 10 gram/con) lần lượt khoảng $4,7 \times 10^3$ CFU/mL và $3,6 \times 10^5$ CFU/mL.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Ngọc Huyền và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2020. Đặc điểm bệnh học của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mủ trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) và cá điều hồng (*Oreochromis sp.*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(Số chuyên đề: Thủy sản)(1): 52-63.

1 GIỚI THIỆU

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) và cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.) được nuôi tập trung ở các tỉnh Đồng Tháp, An Giang, Cần Thơ, Vĩnh Long... Cùng với việc nuôi với mật độ cao kèm theo các yếu tố như thức ăn, hóa chất, biến đổi khí hậu làm cho bệnh trên cá xảy ra thường xuyên hơn với sự xuất hiện của các nhóm tác nhân gây bệnh chính như ký sinh trùng (*Trichodina* sp., *Apinosoma* sp., *Ichthyophthirius multifiliis*...), vi nấm (*Saprolegnia*, *Achlya*, *Aphanomyces*, *Fusarium*...). Trong đó, bệnh do tác nhân vi khuẩn là bệnh thường gặp và gây ra thiệt hại nghiêm trọng đối với nghề nuôi cá nói chung và nghề nuôi cá tra, cá điêu hồng nói riêng. Một số loài vi khuẩn đã được xác định như *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, *Streptococcus agalactiae* (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012).

Vi khuẩn *E. ictaluri* là tác nhân chính gây ra bệnh gan thận mũ trên một số loài cá da trơn (Ferguson *et al.*, 2001; Crumlish *et al.*, 2002), được phân lập đầu tiên ở cá nheo Mỹ (*Ictalurus furcatus*) (Hawke, 1979), trên cá tra ở Việt Nam (Tù Thanh Dung và *ctv.*, 2004). Trên thế giới đã có nghiên cứu phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh trên cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) (Soto *et al.*, 2012). Thời gian gần đây, tại một số trại sản xuất giống và bè nuôi cá điêu hồng ghi nhận sự xuất hiện bệnh gan thận mũ với các dấu hiệu đốm trắng xuất hiện trên thân và tỷ tạng cá bệnh. Đây là bệnh thường gặp trên cá rô phi nuôi ở một số nước trên thế giới và được xác định do một số các tác nhân vi khuẩn như *Norcadia* sp., *Mycobacterium* sp., *Francisella* sp. và *E. ictaluri* (Soto *et al.*, 2011; Soto *et al.*, 2012). Tuy nhiên, tại Việt Nam các nghiên cứu về gan thận mũ trên cá rô phi nuôi vẫn còn hạn chế. Trong nghiên cứu này, kết quả về đặc điểm bệnh học của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mũ trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) và cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.) được trình bày nhằm bổ sung thông tin về đặc điểm bệnh học của tác nhân gây bệnh giữa hai loài cá, góp phần chẩn đoán chính xác và phòng trị bệnh hiệu quả hơn.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương pháp thu và phân lập vi khuẩn từ mẫu cá bệnh

Cá điêu hồng được thu từ 5 bè nuôi (mỗi bè thu từ 3 – 5 con) và cá tra bệnh được thu từ 5 ao nuôi (mỗi ao thu từ 3 – 5 con). Sau khi vớt ra khỏi bè hoặc ao, ghi nhận dấu hiệu bệnh lý bên trong cơ thể cá,

dùng cùn 70° khử trùng mặt ngoài cơ thể cá rồi mổ cá bằng dao mổ và kéo tiết trùng. Sau đó, dùng dao mổ tiết trùng rạch một đường trên thận và dùng để lấy mẫu bệnh phẩm và cấy trên đĩa môi trường tryptic soya agar (TSA, Merck). Đĩa cấy được ủ ở 28°C trong 36-48 giờ. Các khuẩn lạc phát triển trên môi trường TSA được ghi nhận về màu sắc, hình dạng và kích thước. Các chủng vi khuẩn phân lập được giữ ở -80°C trong môi trường tryptic soya broth (TSB, Merck) có bổ sung 25% glycerol.

2.2 Phương pháp định danh vi khuẩn

2.2.1 Phương pháp xác định các chỉ tiêu về hình thái, sinh lý và sinh hóa

Các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa được chọn để định danh vi khuẩn được trình bày ở Bảng 2. Hình dạng của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram. Tính di động được quan sát bằng cách trải đều lên lam một ít vi khuẩn, đặt bằng lamén và quan sát bằng kính hiển vi ở vật kính 40X. Các đặc điểm sinh lý và sinh hóa được xác định dựa theo cẩm nang của Cowan và Steels (Barrow and Feltham, 1993) và sử dụng kit API 20E (BioMerieux, Pháp).

2.2.2 Phương pháp PCR phát hiện

Chiết tách DNA: DNA được chiết tách theo phương pháp của Bartie và *ctv.* (2006). Vi khuẩn được nuôi tăng sinh từ 24-36 giờ trong 5 mL môi trường TSB ở 28 °C, sau đó cho 1,5 mL dung dịch vi khuẩn vào ống ly tâm cùng với 100 µl 10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0 (TE). Hỗn hợp được đun nóng ở 95 °C trong 15 phút, rồi được làm lạnh trong nước đá và ly tâm 2 phút ở vận tốc 14.000 vòng/phút để tách dung dịch DNA và giữ ở -20 °C cho đến khi sử dụng.

Thành phần PCR phát hiện *E. ictaluri*: được thực hiện dựa theo qui trình của Panagala *et al.* (2007). Tổng thể tích phản ứng 25 µL, gồm: 1X dung dịch đệm 10X; 1,5mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 5 U Taq DNA polymerase; 0,4 µM mỗi xuôi (EiFd-1); 0,4 µM mỗi ngược (EiRs) và 20ng mẫu DNA. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 4 phút; sau đó 95°C trong 30 giây, 53°C trong 45 giây, 72°C trong 30 giây; lặp lại chu kỳ trên 35 lần; 72°C trong 10 phút; giữ ở 20°C.

Thành phần rep-PCR: được thực hiện dựa theo qui trình của Bartie và *ctv.* (2006). Tổng thể tích phản ứng 50 µL, gồm: 1X dung dịch đệm 10X; 25 nM MgCl₂; 10 nM dNTPs; 5 U Taq DNA polymerase; 0,5 µM mỗi (GTG)₅ và 25 ng mẫu DNA. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 7 phút; sau đó 94°C trong 1 phút, 40°C trong 1

phút, 65°C trong 8 phút; lặp lại chu kỳ trên 30 lần; 65°C trong 16 phút; giữ ở 20°C.

Điện di và đọc kết quả: 10 µL sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel 1.0% agarose (Promega, USA) trong dung dịch đệm ×1 TAE 0,5X (10 mM Tris, 5 mM acetate, 0,1 mM EDTA). Sản phẩm điện di được ghi nhận bằng bàn đọc UV. Thang DNA 100 bp (Promega) được sử dụng để xác định kích thước của các vạch DNA. Sản phẩm khuếch đại của vi khuẩn *E. ictaluri* là 407 bp. Thang DNA 1 kp (Promega) được sử dụng để xác định kích thước của các vạch DNA từ rep-PCR.

2.3 Phương pháp mô học

Sau khi phân lập vi khuẩn, mô thận của cá bệnh đốm trắng nội quan (10 mẫu cá tra và 10 mẫu cá điêu hồng) và mẫu cá không bệnh (3 mẫu cá tra và 3 mẫu cá điêu hồng) được thu và cố định trong dung dịch formalin đậm trung tính 10% (NBF) trong 24 – 48 giờ sau đó chuyển sang trong cồn 70° để bảo quản. Mẫu được cắt tia định hướng và xử lý qua các giai đoạn khử nước, làm trong mẫu và tẩm paraffin. Sau đó mẫu được cắt, dán lên lam và nhuộm với thuốc nhuộm haematocylene và eosin (H&E) (Coolidge and Howard, 1979). Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi ở các vật kính khác nhau để ghi nhận những biến đổi về mô bệnh học.

2.4 Phương pháp xác định khả năng gây bệnh và liều gây chết 50% cá cảm nhiễm

Chuẩn bị thí nghiệm: Thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm Khoa Thủy sản, trường Đại học Cần Thơ. Bể nhựa (500 lít) và xô nhựa (60 lít) được khử trùng bằng chlorine 200 ppm và phơi khô. Sau đó cấp nước vào khoảng 2/3 thể tích và sục khí liên tục.

Cá thí nghiệm: Cá tra và cá điêu hồng có trọng lượng khoảng 7,5 - 10 g/con, đồng cỡ, khỏe mạnh và linh hoạt sau khi mua về từ trại ương cá giống ở Cần Thơ được thả vào bể nhựa nuôi dưỡng trong 1 tuần. Trước khi tiến hành thí nghiệm, 10 con cá được chọn ngẫu nhiên để kiểm tra vi khuẩn và kí sinh trùng. Cá được bố trí vào xô và để 2-3 ngày cho cá quen với môi trường thí nghiệm.

Chuẩn bị vi khuẩn: vi khuẩn phân lập từ cá tra và cá điêu hồng được phục hồi bằng cách cấy lên môi trường TSA, để 36 giờ ở 28°C, quan sát màu sắc và hình thái khuẩn lạc kết hợp với nhuộm Gram để xác định tính thuần. Vi khuẩn thuần được nuôi tăng sinh 24 giờ ở 28°C trong môi trường TSB, ly tâm ở 5.000 vòng/phút trong 3 phút, rút bỏ môi trường nuôi và rửa 2 lần bằng dung dịch 0,85%

NaCl. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy so màu quang phổ (bước sóng 610 nm) kết hợp với đếm số khuẩn lạc trên môi trường TSA.

Thí nghiệm xác định khả năng gây bệnh: hai chủng vi khuẩn phân lập từ cá tra bệnh gan thận mù nuôi trong ao và hai chủng vi khuẩn phân lập từ cá điêu hồng bệnh gan thận mù nuôi trong bể được chọn dựa trên kiểu rep-PCR (Bartie và *ctv.*, 2006) để xác định khả năng gây bệnh đốm trắng trên nội quan cá điêu hồng bằng phương pháp tiêm (0,1 mL) vào gốc vi ngực với mật độ 10⁷ CFU/mL (10⁶ CFU/con). Mỗi chủng tiêm 30 con cá (10 con/xô nhựa, lặp lại 3 lần). Cá được theo dõi biểu hiện bệnh lý trong 7 ngày sau cảm nhiễm. Những con cá lờ đờ được thu và ghi nhận dấu hiệu bệnh lý, tái phân lập và định danh vi khuẩn từ thận bằng phương pháp PCR.

Thí nghiệm xác định liều gây chết 50% (LD₅₀) cá cảm nhiễm: mỗi loài cá được bố trí 10 con/xô nhựa gồm 7 nghiệm thức với ba lần lặp lại: (1) nghiệm thức đối chứng tiêm nước muối sinh lý (0,85% NaCl) (0,1mL/con); (2-7) 6 nghiệm thức tiêm vi khuẩn (0,1 mL/con) lần lượt với mật độ từ 10³ - 10⁸ CFU/mL (10² - 10⁷ CFU/con). Cá được theo dõi biểu hiện bệnh lý trong 14 ngày sau cảm nhiễm. Những con cá lờ đờ được thu để quan sát và ghi nhận dấu hiệu bệnh lý, tái phân lập và tái định danh vi khuẩn từ thận bằng phương pháp PCR. Mẫu mô thận của cá bệnh ở các nghiệm thức gây cảm nhiễm và cá ở nghiệm thức đối chứng được lấy để phân tích mô bệnh học. Mật độ vi khuẩn gây chết 50% cá thí nghiệm (LD₅₀) được xác định theo công thức của Reed và Muench (1938): $LD_{50} = 10^{a-p.d}$ (Trong đó: p.d = (L%-50/L%-H%); a: số lũy thừa mà tại đó vi khuẩn gây chết cá thấp nhất nhưng trên 50%; H%: tỷ lệ cá chết cao nhất nhưng dưới 50%; L%: tỷ lệ cá chết thấp nhất nhưng trên 50%).

Thí nghiệm xác định khả năng gây bệnh gan thận mù đồng thời trên cá tra và cá điêu hồng: thí nghiệm bố trí gồm 10 nghiệm thức (Bảng 1), mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Tất cả 4 chủng vi khuẩn được gây cảm nhiễm trên cá tra và cá điêu hồng, với mật độ vi khuẩn dựa vào kết quả xác định giá trị LD₅₀. Cá được gây cảm nhiễm bằng cách tiêm 0,1mL vi khuẩn vào gốc vi ngực.

Cá được theo dõi biểu hiện bệnh lý trong 14 ngày sau cảm nhiễm. Những con cá lờ đờ được thu để quan sát và ghi nhận dấu hiệu bệnh lý, tái phân lập và tái định danh vi khuẩn từ thận bằng phương pháp PCR. Mẫu mô thận của cá bệnh ở các nghiệm thức gây cảm nhiễm và cá ở nghiệm thức đối chứng được lấy để phân tích mô bệnh học.

Bảng 1: Các nghiệm thức bố trí thí nghiệm xác định khả năng gây bệnh gan thận mũ đồng thời trên cá tra và cá điêu hồng

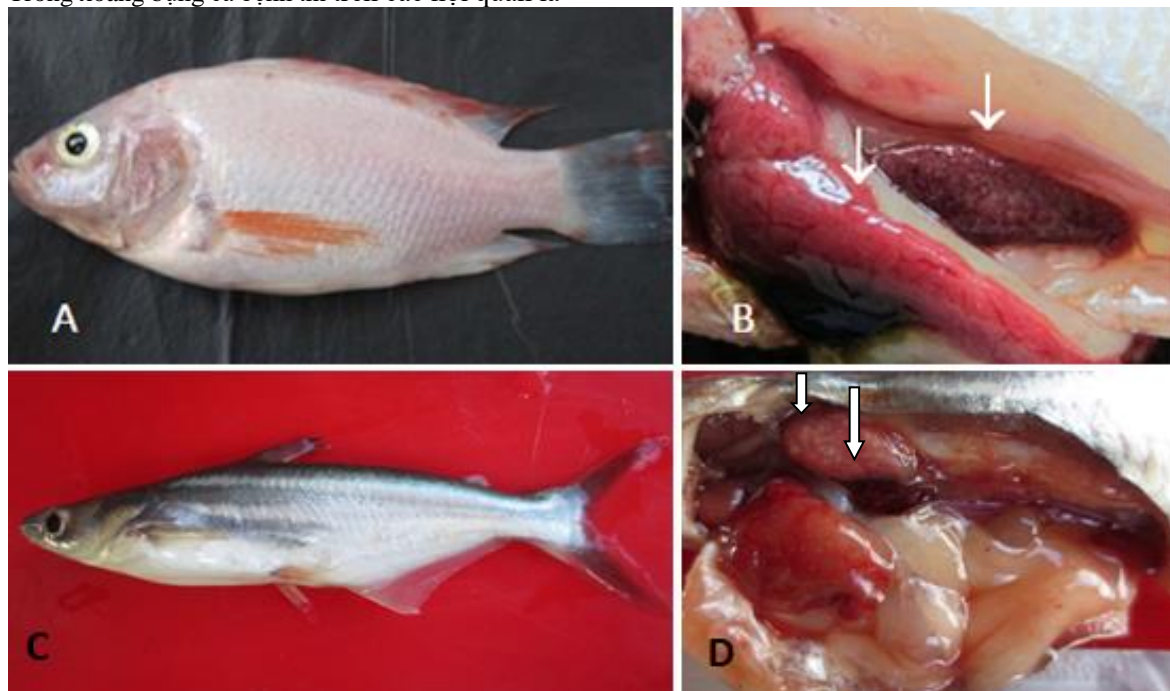
Nghiệm thức	Đối tượng	Nội dung
1	Cá tra	Tiêm 0,1 mL dung dịch 0,85% NaCl
2		Tiêm 0,1 mL dung dịch vi khuẩn TE1 (liều LD ₅₀)
3		Tiêm 0,1 mL dung dịch vi khuẩn TE2 (liều LD ₅₀)
4		Tiêm 0,1 mL dung dịch vi khuẩn DH1.T (liều LD ₅₀)
5		Tiêm 0,1 mL dung dịch vi khuẩn DH3.4T (liều LD ₅₀)
6	Cá điêu hồng	Tiêm 0,1 mL dung dịch 0,85% NaCl
7		Tiêm 0,1 mL dung dịch vi khuẩn TE1 (liều LD ₅₀)
8		Tiêm 0,1 mL dung dịch vi khuẩn TE2 (liều LD ₅₀)
9		Tiêm 0,1 mL dung dịch vi khuẩn DH1.T (liều LD ₅₀)
10		Tiêm 0,1 mL dung dịch vi khuẩn DH3.4T (liều LD ₅₀)

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa vi khuẩn phân lập từ cá bệnh gan thận mũ

Dấu hiệu bệnh lý: Tổng cộng thu được 30 mẫu cá tra (từ 6 ao) và 25 mẫu cá điêu hồng (từ 5 bè) bệnh đốm trắng trên nội quan. Cá tra nuôi trong ao và cá điêu hồng nuôi trong bè khi bị bệnh gan thận mũ không có dấu hiệu bệnh lý bên ngoài đặc trưng (Hình 1A và 1C), cá bơi lờ đờ trên mặt nước, phản ứng chậm với tiếng động và bỏ ăn. Trong xoang bụng cá bệnh thì trên các nội quan là

gan, thận, tỷ tạng có nhiều đốm trắng (Hình 1B và 1D). Mẫu cá tra và cá điêu hồng bệnh thu từ ao/bè nuôi thương phẩm ghi nhận có nhiều đốm trắng trên nội quan tương tự như dấu hiệu bệnh đốm trắng trên nội quan đã được công bố ở cá tra (Crumlish *et al.*, 2002; Yuasa *et al.*, 2003; Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2004) và cá lóc (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trọng Nghĩa, 2016). Theo Labrie *et al.* (2008) sự hình thành các đốm trắng trên nội quan là một dạng đáp ứng miễn dịch của cơ thể nhằm cách ly và đào thải các vật chất lạ xâm nhập vào cơ thể tạo nên hiện tượng viêm mãn tính



Hình 1: Dấu hiệu bệnh lý cá tra và cá điêu hồng bệnh gan thận mũ

(A) Dấu hiệu bệnh lý bên ngoài cá điêu hồng bệnh. (B) Dấu hiệu bệnh lý bên trong cá điêu hồng bệnh (mũi tên chỉ các đốm trắng trên nội quan). (C) Dấu hiệu bệnh lý bên ngoài cá tra bệnh. (D) Dấu hiệu bệnh lý bên trong cá tra bệnh.

3.2 Phân lập và định danh vi khuẩn

Tổng cộng phân lập được 49 chủng vi khuẩn (27 chủng từ cá tra và 22 chủng từ cá điêu hồng) trên môi trường TSA sau 36 - 48 giờ ở 28°C với khuẩn lạc hình tròn, hơi lồi, màu trắng kem, rìa đều, kích thước khoảng 1 mm (Hình 2A). Vi khuẩn Gram âm (Hình 2B), hình que, di động yếu, phản ứng catalase dương tính, phản ứng oxidase âm tính, có khả năng lên men và oxy hóa đường glucose (Hình 2C). Tất cả đều cho phản ứng decarboxylase dương tính với lysine nhưng âm tính với arginine và ornithine, không sinh urease, indole và H₂S. Tất cả cho phản ứng VP âm tính và không sử dụng citrate hay ONPG. Chúng không sinh acid từ rhamnose,

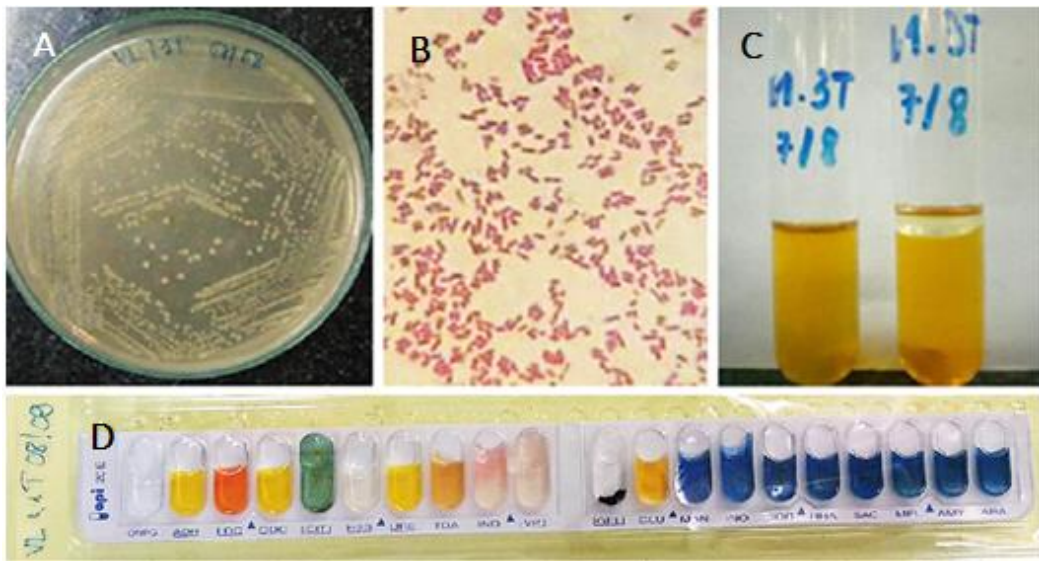
sorbitol, mannitol, arabinose, inositol và sucrose nhưng sinh acid từ glucose (Hình 2D).

Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hoá của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá tra trong nghiên cứu này giống với chủng chuẩn *E. ictaluri* (Hawke, 1981) và phù hợp với kết quả định danh vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh đốm trắng trên nội quan cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) của Crumlish *et al.* (2002), Yuasa *et al.* (2003), Từ Thanh Dung và *ctv.* (2004). Tuy nhiên các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá điêu hồng cho kết quả dương tính với citrate khác với kết quả của Soto *et al.* (2012) (Bảng 2).

Bảng 2: Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hoá của các chủng vi khuẩn phân lập từ cá điêu hồng bệnh đốm trắng trên nội quan và chủng chuẩn

Chỉ tiêu	Vi khuẩn phân lập từ cá tra (n=27)	Vi khuẩn phân lập từ cá điêu hồng (n=22)	Chủng chuẩn <i>E. ictaluri</i> (Hawke, 1981)	Chủng <i>E. ictaluri</i> (Soto <i>et al.</i> , 2012)
Nhuộm Gram	-	-	-	-
Hình dạng	que	que	que	que
Di động	+	+	+	+
Sinh catalase	+	+	+	+
Sinh oxidase	-	-	-	-
Phản ứng lên men yếu khí	+	+	+	+
Phản ứng lên men hiếu khí	+	+	+	+
Sinh beta – galactosidase	-	-	ND	-
Arginine	-	-	-	-
Lysine	+	+	+	+
Ornithine	+	-	+	-
Sử dụng Citrate	-	+	-	-
Sinh H ₂ S	-	-	-	-
Sinh urease	-	-	-	-
Sinh tryptophan	-	-	-	-
Sinh indole	-	-	-	-
Phản ứng Voges - Proskauer	-	-	-	-
Sinh gelatinase	-	-	-	-
Sử dụng đường				
Glucose	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-

Ghi chú: (+): tất cả các chủng dương tính; (-): tất cả các chủng âm tính; ND: không xác định

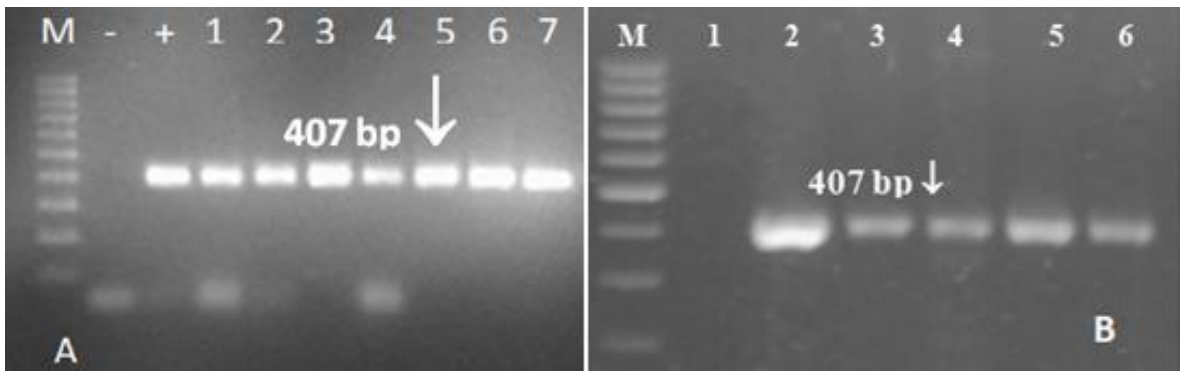


Hình 2: Kết quả phân lập và kiểm tra các chỉ tiêu sinh lí sinh hóa

(A) Khuẩn lạc vi khuẩn phân lập từ thận cá điều hồng bệnh gan thận mù. (B) Nhuộm Gram; (C) O/F; (D) Chỉ tiêu sinh hóa xác định bằng kit API 20E.

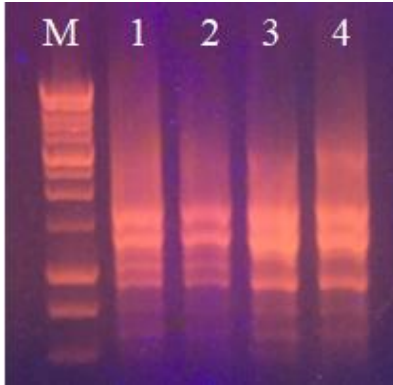
Kết quả PCR ghi nhận tất cả các chủng vi khuẩn phân lập từ cá tra (Hình 3A) và cá điều hồng (Hình 3B) đều hiện vạch ở vị trí 407 bp. Môi (EiFd-1 và EiRs) được Panagala *et al.* (2007) thiết kế để phát hiện vùng đặc hiệu trên gen 16S rRNA của *E. ictaluri* giúp phân biệt vi khuẩn *E. ictaluri* với các loài vi khuẩn *E. tarda*, *E. hoshinae*, *Aeromonas*

hydrophila, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *F. psychrophilum*, *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii*, *Trabulsiella guamensis*, *Streptococcus iniae*. Kết quả PCR giúp khẳng định các chủng vi khuẩn phân lập được từ cá tra và cá điều hồng bệnh gan thận mù là *E. ictaluri*.



Hình 3: Sản phẩm PCR phát hiện *E. ictaluri*

(A) Vi khuẩn phân lập từ cá tra: Giếng M: thang DNA 100 bp (Promega); Giếng (-) đối chứng âm; Giếng (+) đối chứng dương; Giếng 1-7: 7 chủng vi khuẩn từ cá tra; (B) Vi khuẩn phân lập từ cá điều hồng. Giếng M: thang DNA 100 bp (Promega); Giếng (1) đối chứng âm; Giếng (2) đối chứng dương. Giếng 3-6: 4 chủng vi khuẩn từ cá điều hồng.



Hình 4: Kết quả điện di sản phẩm Rep-PCR vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập được từ cá tra và cá điêu hồng

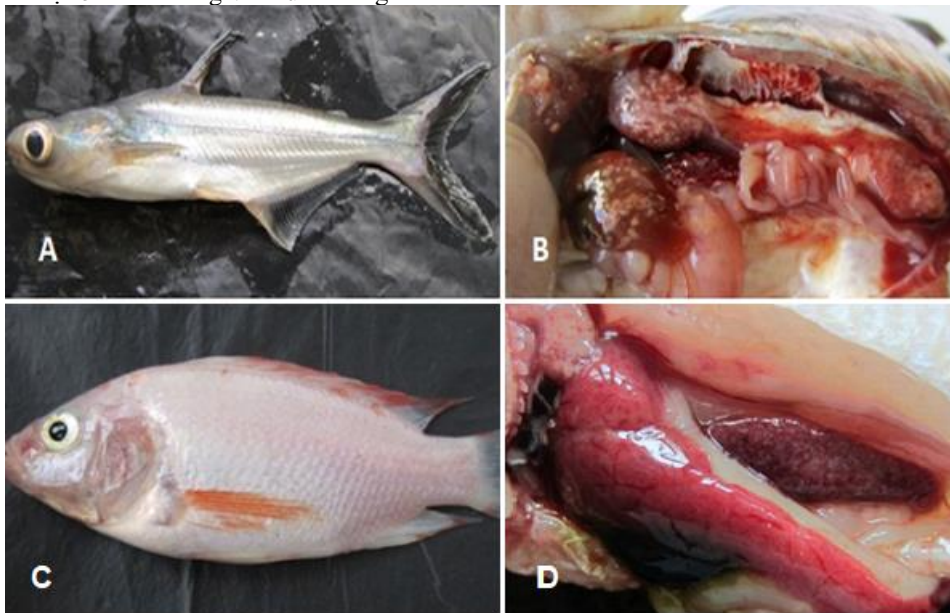
Giếng M: marker 1kp (Promega), giếng 1 và 2: chủng TE1 và TE2 (đại diện cho các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá tra bệnh gan thận mũ), giếng 3 và 4: chủng DH1.T và DH3.4T (đại diện cho các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá điêu hồng bệnh gan thận mũ)

Phương pháp rep-PCR với trình tự mồi là (GTG)₅ (hay còn gọi là phương pháp (GTG)₅-PCR) được sử dụng để xác định tính đa dạng di truyền của vi khuẩn và loại bỏ các chủng vi khuẩn trùng nhau

(Bartie và *ctv.*, 2006). Tất cả các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập được từ cá tra và cá điêu hồng từ các mẫu khác nhau được so sánh kiểu DNA bằng phương pháp rep-PCR. Kết quả ghi nhận 2 kiểu DNA khác nhau của vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập được từ cá tra và cá điêu hồng. Kiểu DNA của vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá tra có sáu vạch DNA còn kiểu DNA của vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá điêu hồng có bảy vạch (Hình 4). Soto *et al.* (2012) cũng tìm thấy có sự khác biệt về kiểu gen giữa hai nhóm vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập trên hai loài cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) và cá nheo Mỹ thu được từ những vùng nuôi khác nhau.

3.3 Khả năng gây bệnh gan thận mũ và LD₅₀ của vi khuẩn *E. ictaluri*

Hai chủng *E. ictaluri* TE1 và TE2 (đại diện cho các chủng vi khuẩn phân lập từ cá tra bệnh gan thận mũ) và hai chủng *E. ictaluri* DH1.T và DH3.4T (đại diện cho các chủng vi khuẩn phân lập từ cá điêu hồng bệnh gan thận mũ) được chọn để xác định khả năng gây bệnh trên cá khỏe tương ứng. Kết quả ghi nhận là các chủng có khả năng gây bệnh gan thận mũ với dấu hiệu bệnh lý của cá gây cảm nhiễm là bơi lội lờ đờ, trên thận và tỷ tạng có nhiều đốm trắng tròn nhỏ (Hình 5).



Hình 5: (A) Cá tra cảm nhiễm chủng *E. ictaluri* TE1 và TE2 không biểu hiện bệnh lý bên ngoài và (B) gan, thận và tỷ tạng có nhiều đốm trắng. (C) Cá điêu hồng cảm nhiễm chủng *E. ictaluri* DH1.T và DH3.4T không biểu hiện bệnh lý bên ngoài và (D) gan, thận và tỷ tạng và có nhiều đốm trắng.

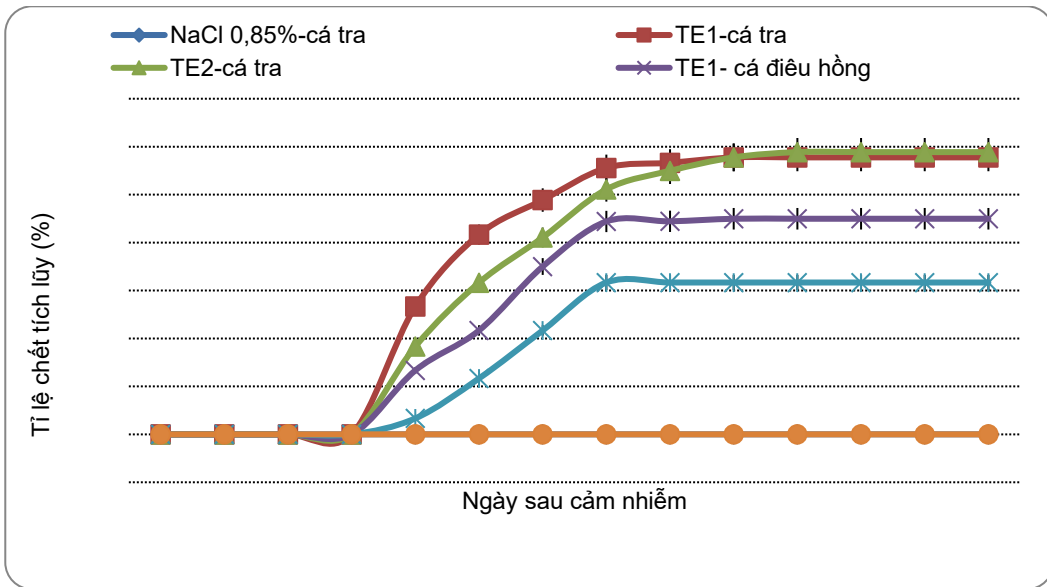
Kết quả xác định được giá trị LD₅₀ của các chủng TE1 và TE2 ở cá tra là 2,0 x 10⁵ và 1,8 x 10⁵ CFU/mL và giá trị LD₅₀ của các chủng DH1.T và

DH3.4T ở cá điêu hồng là 1,6 x 10³ và 2,0 x 10³ CFU/mL.

Khả năng gây bệnh gan thận mũ trên cùng hai loài cá của *E. ictaluri* phân lập từ cá tra

Hai chủng *E. ictaluri* TE1 và TE2 phân lập từ cá tra được tiêm vào cá tra và cá điêu hồng với liều LD₅₀ để xác định khả năng gây bệnh của hai chủng vi khuẩn này trên cả hai loài cá. Kết quả ghi nhận dấu hiệu bệnh lý trên cá tra và cá điêu hồng cảm nhiễm hai chủng *E. ictaluri* TE1 và TE2 tương tự nhau. Cá bơi lờ đờ, kém linh hoạt, giải phẫu nội quan thấy có những đốm trắng trên gan, thận và tỳ tạng giống như cá tra thu từ ao và cá điêu hồng thu từ bè nuôi bị bệnh gan thận mũ (Hình 1).

Sau 14 ngày cảm nhiễm, cá tra ở nghiệm thức cảm nhiễm với chủng vi khuẩn TE1 có tỉ lệ chết là 57,8%. Cá tra ở nghiệm thức cảm nhiễm với chủng vi khuẩn TE2 có tỉ lệ chết là 58,9% (Hình 6). Trong khi đó, nghiệm thức cảm nhiễm cá điêu hồng với chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá tra (TE1, TE2) có tỉ lệ cá điêu hồng chết tích lũy khi tiêm chủng TE1 là 44,9% và TE2 là 31,7% (Hình 6). Cá ở nghiệm thức tiêm nước muối sinh lý có tỉ lệ chết là 0%, cá khỏe và hoạt động bình thường.



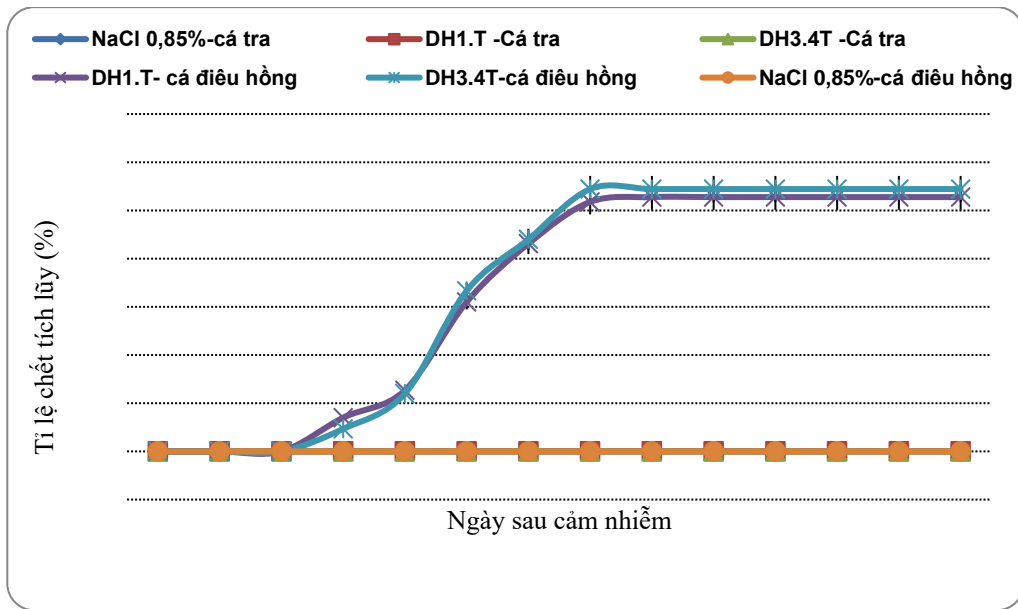
Hình 6: Tỉ lệ chết tích lũy của cá tra và cá điêu hồng (%) sau 14 ngày cảm nhiễm với hai chủng *E. ictaluri* TE1 và TE2 (phân lập từ cá tra bệnh gan thận mũ)

Hình 6 cho thấy vi khuẩn hai chủng *E. ictaluri* TE1 và TE2 phân lập từ cá tra bệnh gan thận mũ có khả năng gây bệnh gan thận mũ trên cá điêu hồng. Tuy nhiên, khi sử dụng liều LD₅₀ của cá tra tiêm cho cá điêu hồng (có cùng khối lượng) thì tỉ lệ chết tích lũy ở cá điêu hồng thấp hơn.

Khả năng gây bệnh gan thận mũ trên hai loài cá của *E. ictaluri* phân lập từ cá điêu hồng

Hai chủng *E. ictaluri* DH1.T và DH3.4T phân lập từ cá điêu hồng được tiêm vào cá tra và cá điêu hồng với liều LD₅₀ để xác định khả năng gây bệnh của hai chủng vi khuẩn này trên cả hai loài cá. Kết

quả ghi nhận có dấu hiệu bệnh gan thận mũ ở cá điêu hồng cảm nhiễm giống như cá điêu hồng bị bệnh gan thận mũ thu từ bè nuôi. Tuy nhiên, không ghi nhận dấu hiệu bệnh gan thận mũ ở cá tra. Sau 14 ngày gây cảm nhiễm, cá điêu hồng ở các nghiệm thức tiêm chủng *E. ictaluri* DH1.T và DH3.4T có tỉ lệ chết tích lũy lần lượt là 52,8% và 54,4%. Nhưng không có cá chết ở các nghiệm thức tiêm dung dịch 0,85% NaCl, cá khỏe và hoạt động bình thường, điều này cho thấy trong quá trình thí nghiệm cá không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác, cá chết là do cảm nhiễm bởi vi khuẩn *E. ictaluri*.



Hình 7: Tỉ lệ chết tích lũy của cá tra và cá điều hồng (%) sau 14 ngày cảm nhiễm với hai chủng *E. ictaluri* DH1.T và DH3.4T (phân lập từ cá điều hồng)

Từ kết quả có thể thấy chúng vi khuẩn *E. ictaluri* TE1 và TE2 được phân lập từ cá tra có khả năng gây bệnh gan thận mũ trên cá tra và điều hồng. Tuy nhiên, khi tiêm liều LD₅₀ hai chủng *E. ictaluri* DH1.T và DH3.4T phân lập từ cá điều hồng bệnh gan thận mũ chỉ gây bệnh ở cá điều hồng mà không gây bệnh ở cá tra. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Plumb và Sanchez (1983) khi cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá nheo Mỹ (10⁸ CFU/cá) cho cá rô phi xanh *O. aureus* cho kết quả gây chết 70% cá cảm nhiễm. Novita *et al.* (2005) cảm nhiễm cá điều hồng với vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá tra ghi nhận tỉ lệ chết 40% và 70% (liều tiêm tương ứng là 2,6x10⁵ và 2,6x10⁷ CFU/mL).

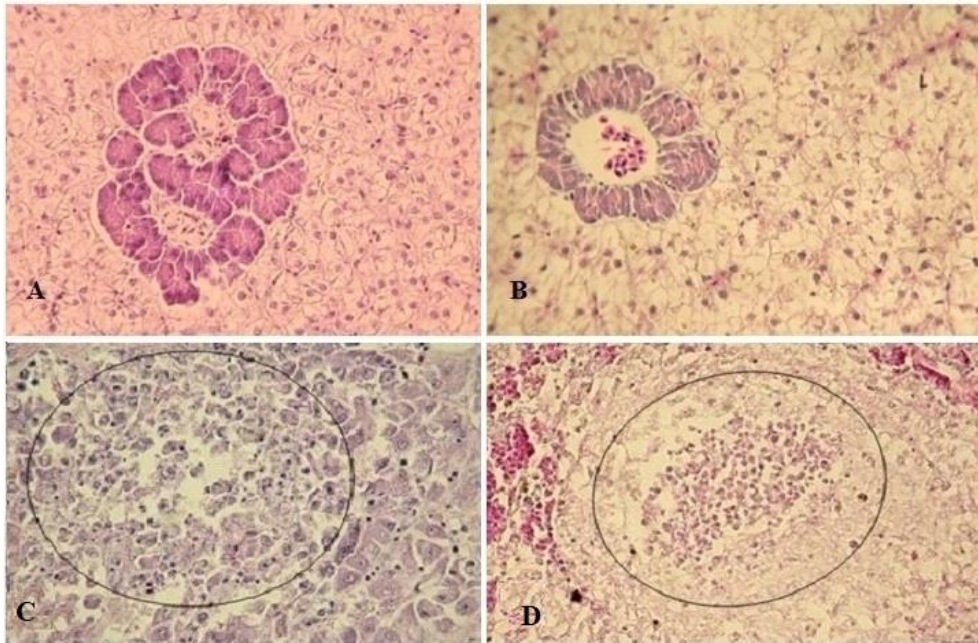
3.4 Tái phân lập và định danh vi khuẩn *E. ictaluri* cảm nhiễm

Những con cá lờ đờ sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* được thu để tái phân lập vi khuẩn ở thận. Vi khuẩn phát triển trên môi trường TSA sau

36 giờ ở 28°C, khuẩn lạc có màu kem, tròn, lồi, có đường kính từ 0,5 - 1 mm giống với khuẩn lạc của vi khuẩn phân lập từ cá bệnh gan thận mũ thu từ ao và bè nuôi. Vi khuẩn tái phân lập từ cá cảm nhiễm được chiết tách DNA và tái định danh để xác định là vi khuẩn *E. ictaluri* bằng phương pháp PCR. Kết quả PCR ghi nhận tất cả các chủng vi khuẩn tái phân lập từ cá tra và cá điều hồng cảm nhiễm đều hiện vạch ở vị trí 407 bp.

3.5 Mô bệnh học cá tra và cá điều hồng cảm nhiễm *E. ictaluri*

Gan cá tra bệnh có các vùng mô bị thoái hóa hoặc hoại tử dạng hạt ở vị trí đốm trắng (Hình 8C). Tại vị trí hoại tử, các tế bào bị biến dạng, cấu trúc rời rạc và tập trung nhiều tế bào máu đồng thời có hiện tượng xuất huyết ở các vùng mô xung quanh. Gan cá điều hồng bệnh cũng có dấu hiệu hoại tử dạng hạt tại vị trí các đốm trắng, các tế bào gan nằm rời rạc hoặc biến mất, vùng mô thoái hóa và biến đổi cấu trúc (Hình D), xung quanh vùng mô hoại tử còn có hiện tượng xung huyết và xuất huyết.

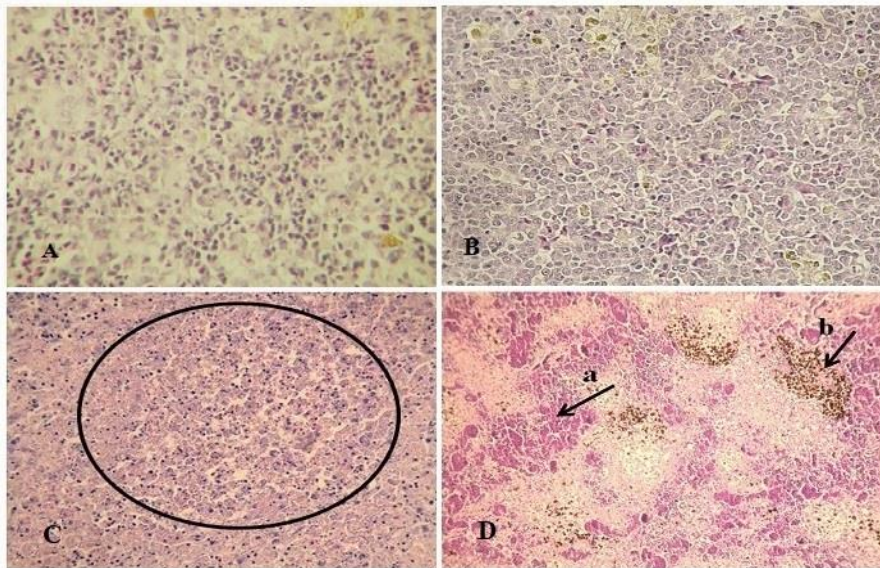


Hình 8: Mô gan cá tra và cá điêu hồng bệnh gan thận mũ (H&E, 40X)

(A) Gan cá tra khỏe. (B) Gan cá điêu hồng khỏe. (C) Gan cá tra bệnh với vùng thoái hóa và hoại tử dạng hạt. (D) Gan cá điêu hồng bệnh với vùng hoại tử dạng hạt và xuất huyết.

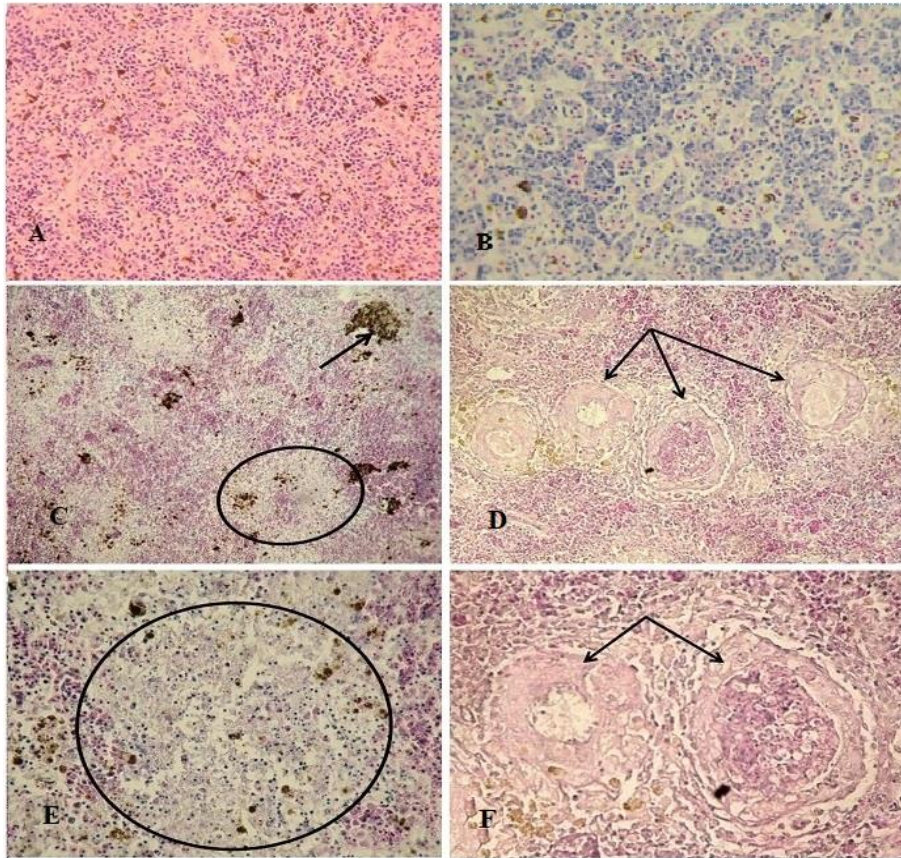
Thận cá tra bệnh gan thận mũ có các vùng hoại tử hạt (tại đó các tế bào nằm rời rạc) tương ứng với các vị trí các đốm trắng (Hình 9C). Thận cá điêu

hồng bệnh cũng có hiện tượng xung huyết, xuất huyết và xuất hiện nhiều vùng hoại tử tại vị trí các đốm trắng, đồng thời xuất hiện nhiều trung tâm đại thực bào sắc tố (Hình 9D).



Hình 9: Mô thận cá tra và cá điêu hồng bệnh gan thận mũ (H&E, 40X)

(A) Thận cá tra khỏe. (B) Thận cá điêu hồng khỏe. (C) Thận cá tra bệnh với vùng mô hoại tử hạt. (D) Thận cá điêu hồng bệnh xuất huyết, hoại tử (a) và trung tâm đại thực bào sắc tố (b).



Hình 10: Mô tỳ tạng cá điều hồng và cá tra bệnh gan thận mũ (H&E)

(A) Cá tra khỏe (40X). (B) Cá điều hồng khỏe (40X). (C và E) Cá tra bệnh có vùng hoại tử hạt và trung tâm đại thực bào sắc tố gia tăng về kích thước và số lượng (Hình 10C và 10E). Ngoài hiện tượng thoái hóa và hoại tử, ở mô tỳ tạng cá điều hồng bệnh còn ghi nhận có hiện tượng xuất huyết, sự viêm nhiễm dạng u hạt làm biến đổi cấu trúc vùng mô (Hình 10D và 10F) giống như ở mô thận cá bệnh gan thận mũ.

Tỳ tạng cá tra bệnh gan thận mũ có các vùng thoái hóa dạng hạt và các trung tâm đại thực bào sắc tố gia tăng về kích thước và số lượng (Hình 10C và 10E). Ngoài hiện tượng thoái hóa và hoại tử, ở mô tỳ tạng cá điều hồng bệnh còn ghi nhận có hiện tượng xuất huyết, sự viêm nhiễm dạng u hạt làm biến đổi cấu trúc vùng mô (Hình 10D và 10F) giống như ở mô thận cá bệnh gan thận mũ.

Cá tra và cá điều hồng bệnh gan thận mũ có những đặc điểm mô bệnh học tương tự nhau là: (1) nhiều vùng ở mô gan, thận và tỳ tạng xung huyết, xuất huyết, hoại tử dạng hạt và biến đổi cấu trúc; (2) mô thận và tỳ tạng có các trung tâm đại thực bào sắc tố gia tăng về số lượng và kích thước. Cá điều hồng bệnh gan thận mũ còn có nhiều không bào lipid ở gan và các u hạt ở thận và tỳ tạng.

4 KẾT LUẬN

Cá tra và cá điều hồng bệnh gan thận mũ có dấu hiệu bệnh lý bên trong đặc trưng là các đốm trắng ở

thận và tỳ tạng. Biến đổi mô học đặc trưng là hiện tượng hoại tử dạng hạt và sự tạo thành các u hạt ở gan, thận và tỳ tạng. Giá trị LD₅₀ của chủng *E. ictaluri* ở cá điều hồng (cỡ 7,5 - 10 gram/con) khoảng $1,6 \times 10^3$ đến $2,0 \times 10^3$ CFU/mL và ở cá tra (cỡ 7,5 - 10 gram/con) khoảng $1,8 \times 10^5$ đến $2,0 \times 10^5$ CFU/mL. Chủng *E. ictaluri* TE1 và TE2 phân lập từ cá tra bệnh gan thận mũ có khả năng gây bệnh ở cả hai loài cá tra và cá điều hồng khi tiêm liều LD₅₀. Tuy nhiên hai chủng *E. ictaluri* DH1.T và DH3.4T phân lập từ cá điều hồng bệnh gan thận mũ chỉ gây bệnh ở cá điều hồng mà không gây bệnh ở cá tra khi tiêm liều LD₅₀.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài được tài trợ bởi Dự án Hợp tác Kỹ thuật “Tăng cường năng lực trường Đại học Cần Thơ thành trường xuất sắc về đào tạo, nghiên cứu khoa học và chuyên gia công nghệ” của Cơ quan Hợp tác Quốc tế Nhật Bản (JICA).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barrow, G. I., and Feltham, R. K. A., 1993. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria, 3rd Edition. Cambridge University Press, Cambridge. 262 pages.
- Bartie, K., Oanh, D. T. H., Huys, G. và ctv., 2006. Ứng dụng REP-PCR và PFGE để định tuýp vi khuẩn kháng chloramphenicol phân lập tại các trại nuôi thủy sản ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 4 (1): 31-40.
- Coolidge and Howard, R.M., 1979. Animal Histology Procedures, 2nd edition). National Institutes of Health. Bethesda.
- Crumlish, M., Dung, T.T., Turnbull, J.F., Ngoc, N.T.N., and Ferguson, H.W., 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases*. 25(12): 733-736.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2009. Độc lực của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phân lập từ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bị bệnh mù gan. *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn*. 12: 64-70.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trọng Nghĩa, 2016. Xác định tác nhân gây bệnh gan thận mù trên cá lóc (*Channa striata*) nuôi ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. 1: 82-89.
- Ferguson, W., Turnbull, J.F., Shinn, A., Thompson, K., Dung, T.T., and Crumlish, M., 2001. Bacillary necrosis in farmed *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage) from the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases*. 24(9): 509-514.
- Hawke, J.P., McWhorter, A.C., Steigerwalt, A.G., and Brenner, D.J., 1981. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the Causative Agent of Enteric Septicemia of Catfish. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 31(4): 396-400.
- Labrie, L., Tan, N.J., Komar, Z., Ho, C. and Grisez, L., 2008. Nocardial infections in fish: an emerging problem in both freshwater and marine aquaculture systems in Asia, pp. 297-312. In Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, M. and Subasinghe, R.P., 2008 (Eds.). Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Panangala, V.S., Shoemaker, C.A., Van Santen, V.L., Dybvig, K., and Klesius, P.H., 2007. Multiplex- PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogens, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophila*. *Diseases of aquatic organisms*. 74(3): 199- 208.
- Reed, L.J., and Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*. 27(3): 493-497.
- Soto, E., Griffi, M., Arauz, M., Riofri, A., Martineoz, A. and Cabrejos, M.E., 2012. *Edwardsiella ictaluri* as the Causative Agent of Mortality in Cultured Nile Tilapia. *Journal of Aquatic Animal Health*. 24(2):81-90.
- Soto, E., Illanes, O., Revan, F., Griffin, M., and Riofrio, A., 2013. Bacterial distribution and tissue targets following experimental *Edwardsiella ictaluri* infection in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 104(2):105-112.
- Từ Thanh Dung, Mags Crumlish, Nguyễn Thị Như Ngọc, Nguyễn Quốc Thịnh và Đặng Thụy Mai Thy, 2004. Xác định vi khuẩn gây bệnh trắng gan trên cá tra (*Pangasius hypophthalmus*). *Tạp chí khoa học. Trường Đại học Cần Thơ. Số đặc biệt (chuyên ngành thủy sản)*: 137-142.
- Yuasa, K., Kholidin, E.B., Panigoro, N., and Hatai, K., 2003. First isolation of *Edwardsiella ictaluri* from cultured striped catfish *Pangasius hypophthalmus* in Indonesia. *Fish Pathology*. 38(4): 181-183.