



DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.084

KHẢ NĂNG GÂY BỆNH CỦA VI KHUẨN *Edwardsiella ictaluri* TRÊN CÁ ĐIỀU HỒNG (*Oreochromis* SP.)

Nguyễn Trọng Nghĩa và Đặng Thị Hoàng Oanh*

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: 24/10/2018

Ngày nhận bài sửa: 22/11/2018

Ngày duyệt đăng: 28/06/2019

Title:

Pathogenicity of *Edwardsiella ictaluri* in red tilapia (*Oreochromis* sp.)

Từ khóa:

Cá điều hồng (*Oreochromis* sp.), độc lực, đốm trắng trên nội quan, *Edwardsiella ictaluri*

Keywords:

Edwardsiella ictaluri, *Oreochromis* sp., virulence, white spots in the internal organs

ABSTRACT

This study was conducted to determine the pathogenicity of *Edwardsiella ictaluri* bacteria in red tilapia (*Oreochromis* sp.). A total of 22 bacterial isolates were isolated from 25 specimens of red tilapia (*Oreochromis* sp.) collected from nursery ponds and grow-out cages in Hau Giang and Vinh Long provinces. The typical clinical sign of diseased fish was white spots on the kidney and spleen. Bacterial isolates were identified as *Edwardsiella ictaluri* based on morphological, physiological and biochemical characteristics as well as API 20E and PCR with *E. ictaluri* specific primers. Results of histological analysis revealed typical characteristics of white spots in the internal organs of bacterial infected fish species including necrotic areas, structural changes in the tissue, formation of granulomas and haemorrhage on the kidney and spleen. Challenge experiments by using the injection method showed that *E. ictaluri* was capable of causing white spots in the internal organ of red tilapia with pathological signs similar to naturally infected fish with white spots in the internal organs. The LD₅₀ valued about 4,7x10³ CFU/ml.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định khả năng gây bệnh của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trên cá điều hồng (*Oreochromis* sp.). Tổng cộng có 22 chủng vi khuẩn phân lập được từ 25 mẫu cá điều hồng (*Oreochromis* sp.) bệnh được thu từ ao ương giống và trong bè nuôi thương phẩm ở hai tỉnh Hậu Giang và Vĩnh Long. Dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của cá bệnh là có nhiều đốm trắng trên thận và tỳ tạng. Các chủng vi khuẩn được định danh là *E. 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*. Kết quả phân tích mô học ghi nhận những đặc điểm mô bệnh học điển hình của các đốm trắng trong nội quan ở một số loài cá bị nhiễm vi khuẩn bao gồm các vùng hoại tử, biến đổi cấu trúc mô, hình thành u hạt và xuất huyết trên thận và tỳ tạng. Thí nghiệm cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm cho thấy các chủng *E. ictaluri* phân lập được có khả năng gây bệnh đốm trắng trên nội quan trên cá điều hồng với dấu hiệu bệnh lý giống như cá bệnh được thu trong bè là thận và tỳ tạng có nhiều đốm trắng. Giá trị LD₅₀ được xác định khoảng 4,7 x 10³ CFU/ml.

Trích dẫn: Nguyễn Trọng Nghĩa và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2019. Khả năng gây bệnh của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trên cá điều hồng (*Oreochromis* sp.). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(3B): 123-131.

1 GIỚI THIỆU

Bệnh đốm trắng trên nội quan hiện đang là bệnh gây nhiều thiệt hại cho nghề nuôi cá nước ngọt ở Đồng Bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL). Bệnh còn được gọi là bệnh gan thận mù hay bệnh mù ở gan thận được phát hiện đầu tiên ở cá tra nuôi ở ĐBSCL vào cuối năm 1998 (Ferguson *et al.*, 2001). Cá tra bệnh không có biểu hiện bên ngoài đặc trưng, một số cá có hiện tượng xuất huyết ở các vi hoặc xuất huyết toàn thân, xoang bụng có chứa dịch hơi đặc và các nội quan như gan, thận và tử tạng có nhiều đốm trắng (Nguyễn Quốc Thịnh, 2004). Tác nhân gây bệnh đốm trắng trên nội quan cá tra được xác định là vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* (Crumlish *et al.*, 2002). Những năm gần đây, cá lóc nuôi cũng bị bệnh đốm trắng trên nội quan giống như ở cá tra. Tuy nhiên tác nhân gây bệnh ở cá lóc được xác định là *Aeromonas schubertii* (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trọng Nghĩa, 2016).

Khoảng từ cuối năm 2015, cá điêu hồng (*Oreochromis sp.*) giai đoạn ương giống và giai đoạn nuôi thương phẩm trong bè ở một số nơi thuộc ĐBSCL xuất hiện dấu hiệu bệnh lý của bệnh đốm trắng trên nội quan giống như ở cá tra và cá lóc nên người nuôi cá điêu hồng cũng gọi là bệnh mù gan. Tuy nhiên, do tác nhân gây bệnh khác nhau tùy loài vật chủ nên việc xác định tác nhân gây bệnh ở cá không thể chỉ dựa vào dấu hiệu bệnh lý mà phải kết hợp với những xét nghiệm đặc hiệu thì mới có thể xác định chính xác tác nhân gây bệnh và có biện pháp phòng trị hợp lý.

Trong bài báo này, khả năng gây bệnh và độc lực của vi khuẩn *E. ictaluri* trên cá điêu hồng được xác định nhằm cung cấp thông tin cho việc phòng và trị bệnh ở cá điêu hồng có hiệu quả tốt hơn.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

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

Mẫu cá điêu hồng bệnh được thu từ các ao ương giống và bè nuôi thương phẩm ở hai tỉnh Hậu Giang và Vĩnh Long từ tháng 4 đến tháng 8 năm 2017. Sau khi vớt ra khỏi ao chọn những con còn sống để phân lập vi khuẩn. Dùng cồn 70° khử trùng mặt ngoài cơ thể cá rồi mổ cá bằng dao mổ và kéo tiết trùng. Dấu hiệu bệnh lý bên trong cơ thể cá được ghi nhận. 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

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.

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 bản 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.

2.3 Phương pháp mô học

Sau khi phân lập vi khuẩn, mẫu mô thận của cá bệnh đốm trắng nội quan và cá không bệnh 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 lame 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 ươm 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 điều 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: Phục hồi vi khuẩn 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: 3 chủng DH1T, DH1.2T và DH3.4T được chọn để xác định khả năng gây bệnh đốm trắng trên nội quan cá điều hồng bằng phương pháp tiêm (0.1 ml) vào gốc vi ngực với mật độ 10^7 CFU/ml (10^6 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% (LD_{50}) cá cảm nhiễm: 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 10^3 - 10^8 CFU/ml (10^2 - 10^7 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 (LD_{50}) 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 lữ 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%.

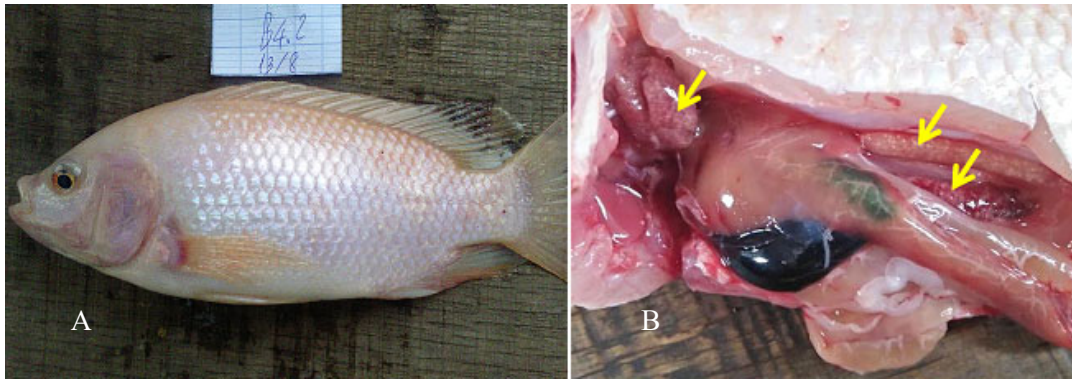
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Dấu hiệu bệnh lý và mô bệnh học

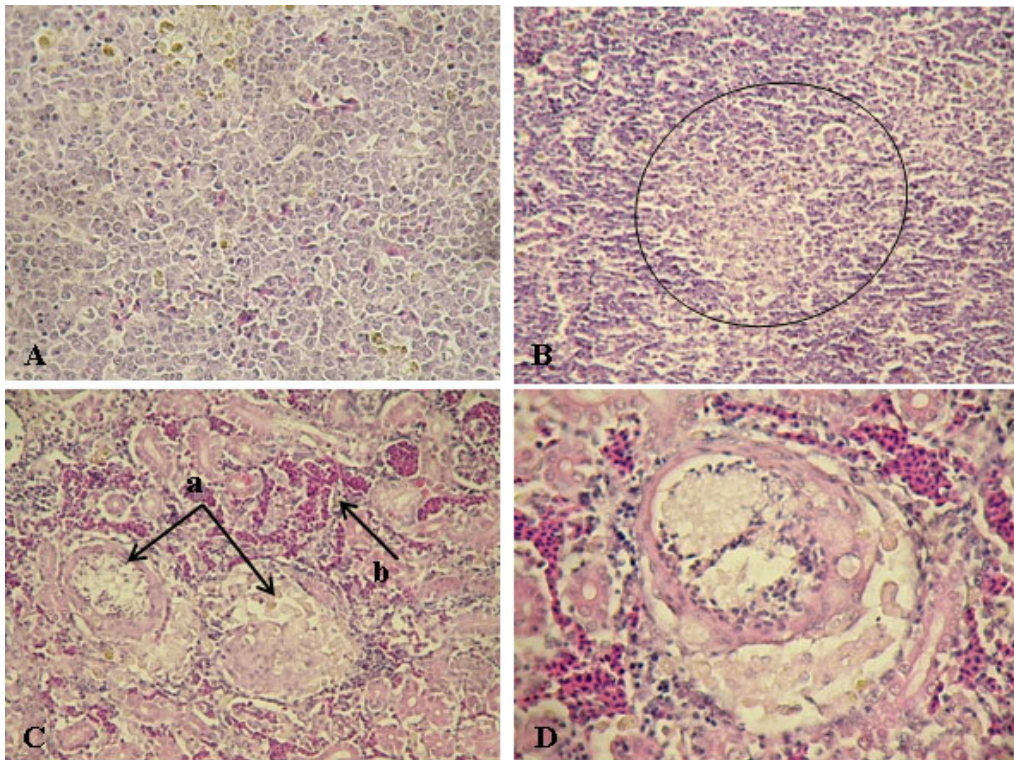
Tổng cộng thu được 25 mẫu cá điều hồng bệnh đốm trắng trên nội quan (gồm 20 mẫu cá giai đoạn nuôi thương phẩm (cỡ 10-15 gram/con) và 5 mẫu giai đoạn ương giống). Cá bệnh bơi lờ đờ trên mặt nước và phản ứng chậm với tiếng động. Cá bệnh không có dấu hiệu bệnh lý bên ngoài rõ rệt (Hình 1A), chỉ ghi nhận được ở vài con có bụng trương to. Trong xoang bụng cá bệnh thì mật và gan sưng, thận (trước và sau) và tỷ tạng có nhiều đốm trắng (Hình 1B).

Mẫu cá điều hồng bệnh thu từ ao ương và 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.

Kết quả phân tích mô học thận cá điều hồng bệnh ghi nhận có nhiều vùng thoái hóa biến đổi cấu trúc và hoại tử dạng hạt (Hình 2B) so với cá không bệnh (Hình 2A). Ngoài ra, ở thận sau có hiện tượng xung huyết, xuất huyết trên vùng mô, đồng thời tương ứng với vị trí các đốm trắng là sự hình thành các u hạt (Hình 2C và 2D).



Hình 1: Cá điêu hồng bệnh đốm trắng trên nội quan thu từ bè nuôi thương phẩm. A: biểu hiện bên ngoài bình thường. B: nhiều đốm trắng xuất hiện trên thận và tỳ tạng



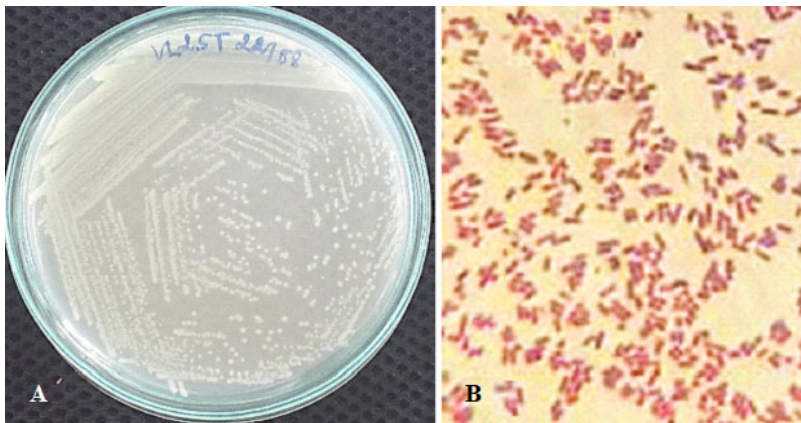
Hình 2: Mô thận cá điêu hồng thu từ bè nuôi, nhuộm với thuốc nhuộm haematocylene và eosin (H&E). (A) Thận trước cá không có đốm trắng (40X). (B) Thận trước cá có đốm trắng với những vùng hoại tử hạt (40X). (C) Thận sau cá có đốm trắng với các u hạt (a) và có hiện tượng xuất huyết (b) (20X); (D) các u hạt và xuất huyết ở thận sau (40X)

Tương ứng với các đốm trắng trên nội quan, kết quả phân tích mô bệnh học ghi nhận sự xuất hiện những vùng mô bị biến đổi cấu trúc, hoại tử và hình thành các ổ viêm dạng u hạt. Theo Shah *et al.* (2017), các u hạt được hình thành gồm lớp các tế bào bạch cầu như đại thực bào hay tế bào lympho bao bọc xung quanh vùng mô bị hoại tử và các tế bào bị tổn thương. Các tế bào này không được loại bỏ ra khỏi cơ thể mà bị xơ hóa và vôi hóa hình thành nên các u hạt. Đây cũng là biểu hiện mô bệnh học đặc trưng ở một số loài cá bị bệnh đốm trắng trên nội quan do nhiễm một số loài vi khuẩn như

Mycobacteria, Nocardiae, Franciellae, E. ictaluri và *Aeromonas schubertii* đã được nhiều nhóm tác giả công bố (Wang *et al.*, 2007; Colquhoun and Duodu, 2011; Soto *et al.*, 2013; Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trọng Nghĩa, 2016).

3.2 Phân lập và định danh vi khuẩn

Từ các mẫu cá điêu hồng bệnh đã phân lập được 22 chủng vi khuẩn từ thận. Vi khuẩn phát triển trên môi trường TSA sau 36-48 giờ ở 28°C, tạo những khuẩn lạc màu kem, hình tròn hơi lồi, có đường kính từ 0.5 – 1 mm (Hình 3A).



Hình 3: (A) Khuẩn lạc trên môi trường TSA. (B) Vi khuẩn hình que, Gram âm (100X)

Chúng đều là vi khuẩn Gram âm có hình que, có khả năng di động, cho phản ứng dương tính với catalase nhưng âm tính với oxidase. Tất cả đều cho phản ứng decarboxylase dương tính với lysine nhưng âm tính với arginine và ornithine. Chúng

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 (Bảng 1).

Bảng 1: 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

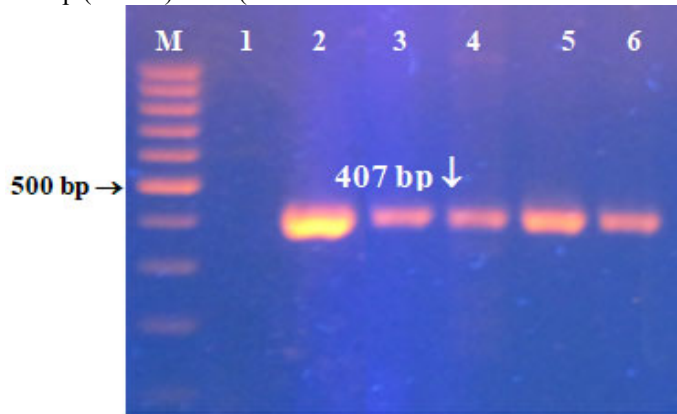
Chỉ tiêu	Vi khuẩn phân lập từ cá điêu hồng bệnh đốm trắng trên nội quan (n=22)	Chủng chuẩn (Hawke, 1981)
Nhuộm Gram	-	-
Hình dạng	Que	Que
Di động	+	+
Sinh catalase	+	+
Sinh oxidase	-	-
Phản ứng lên men yếm khí	+	+
Phản ứng lên men hiếu khí	+	+
Sinh beta – galactosidase	-	ND
Arginine	-	-
Lysine	+	+
Ornithine	-	-
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

Các chủng vi khuẩn phân lập từ cá điêu hồng bệnh được định danh là vi khuẩn *E. ictaluri* dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa. Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hoá của các chủng vi khuẩn 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).

Kết quả PCR ghi nhận tất cả các chủng vi khuẩn đều hiện vạch ở vị trí 407 bp (Hình 4). Mỗi (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 *Edwardsiella 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* (Panagala *et al.*, 2007). Kết quả PCR giúp khẳng định các chủng vi khuẩn phân lập được từ cá điêu hồng bệnh đốm trắng trên nội quan là *E. ictaluri*.



Hình 4: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *E. ictaluri*. Giếng M: thang DNA 100 bp (Promega); Giếng (1): đối chứng âm; Giếng (2): đối chứng dương. Giếng 3-6: 3 chủng vi khuẩn phân lập từ cá điêu hồng bệnh đốm trắng trên nội quan

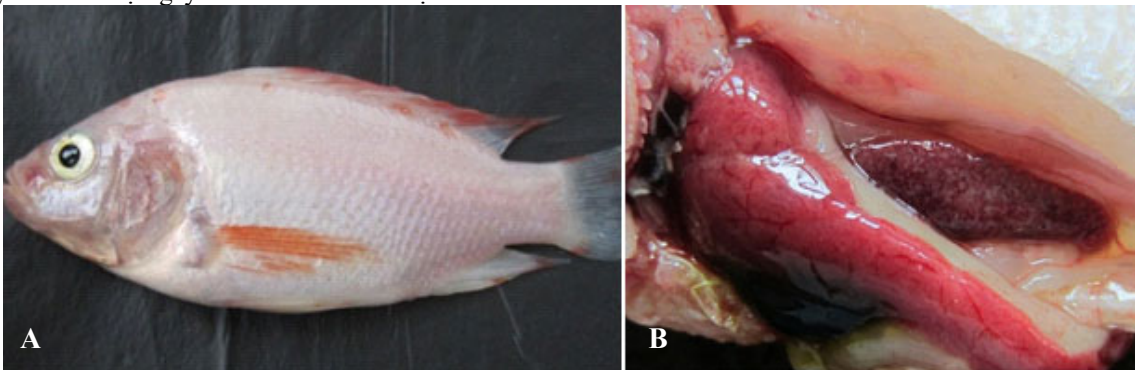
3.3 Khả năng gây bệnh đốm trắng trên nội quan cá điêu hồng của *E. ictaluri*

Thí nghiệm xác định khả năng gây bệnh

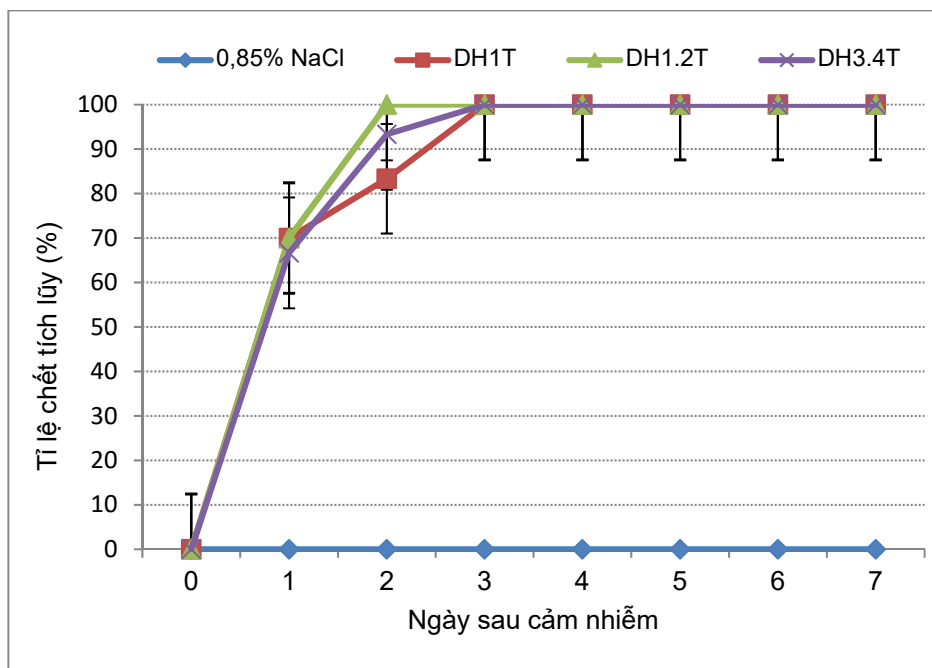
Ba trong các chủng vi khuẩn sau khi định danh là *E. ictaluri* được sử dụng để cảm nhiễm xác định khả năng gây bệnh trên cá điêu hồng khỏe với mật độ là 10^6 CFU/cá (cỡ 7,5 - 10 g/con). Dấu hiệu bệnh lý của cá được gây cảm nhiễm là bơi lội lờ đờ và

kém linh hoạt. Các nội quan là thận và tỳ tạng có nhiều đốm trắng tròn nhỏ (Hình 5).

Sau 1 ngày sau cảm nhiễm chủng DH1T và DH3.4T, cá chết với tỉ lệ chết là 70% và sau 3 ngày tỉ lệ cá chết khi tiêm 2 chủng này là 100%. Cá tiêm chủng DH1.2T có tỉ lệ chết là 100% sau 2 ngày cảm nhiễm (Hình 6).



Hình 5. Dấu hiệu bệnh lý cá điêu hồng cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri*. (A): Cá không biểu hiện dấu hiệu bên ngoài rõ ràng. (B): các nội quan gan, thận và tỳ tạng sưng và thận có nhiều đốm trắng



Hình 6: Tỉ lệ cá chết (%) tích lũy theo ngày gây cảm nhiễm xác định khả năng gây bệnh
 Thí nghiệm xác định liều gây chết 50% (LD₅₀) cá điều hồng cảm nhiễm *E. ictaluri*

Từ kết quả thí nghiệm xác định khả năng gây bệnh, chủng *E.ictaluri* DH1.2T được chọn để xác định liều gây chết 50% (LD₅₀) cá điều hồng cảm nhiễm. Sau 14 ngày theo dõi, không có cá chết ở nghiệm thức đối chứng tiêm nước muối sinh lý, cá ở trạng thái sinh lý bình thường trong suốt thời gian thí nghiệm (tỉ lệ sống của cá là 100%). Ở các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn chủng *E. ictaluri*, cá chết với tỉ lệ tăng dần theo mật độ vi khuẩn cảm nhiễm (Hình 7). Cá chết ở các nghiệm thức cảm nhiễm có dấu hiệu bệnh lý là bụng trương, xoang bụng chứa dịch màu vàng, thận và tỳ tạng sưng, có nhiều đốm trắng trên thận và tỳ tạng giống như cá ở thí nghiệm xác định khả năng gây bệnh và cá bệnh thu từ bè nuôi.

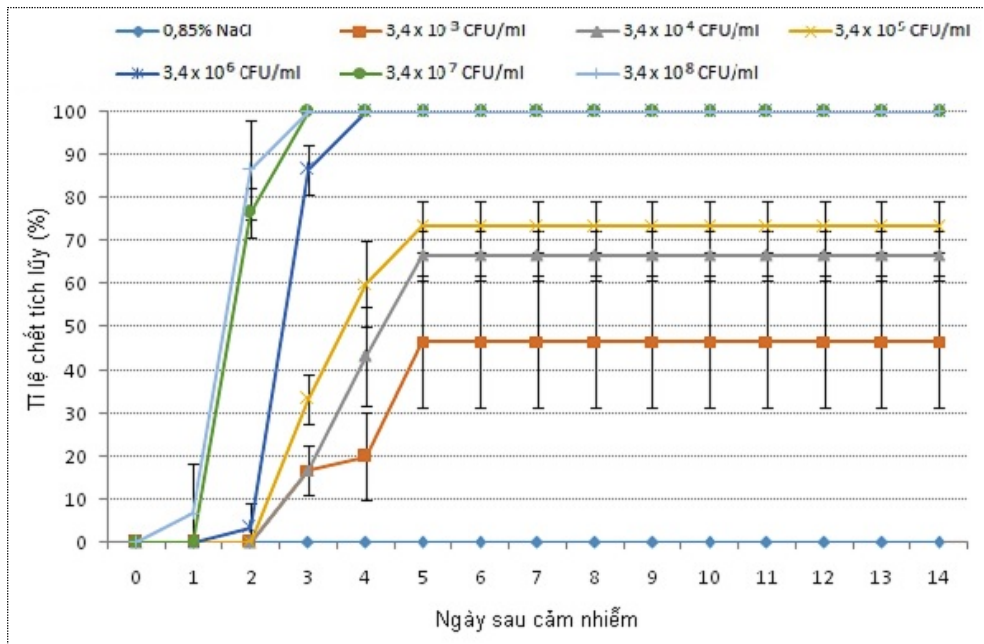
Thời gian cá cảm nhiễm bắt đầu chết là 10 giờ ở nghiệm thức tiêm vi khuẩn với mật độ 3,4x10⁸ CFU/ml. Tỉ lệ cá chết là 100% sau 48 giờ. Ở nghiệm thức tiêm vi khuẩn với mật độ 3,4x10⁷ và 3,4x10⁶ CFU/ml thì các bắt đầu chết sau 24 giờ cảm nhiễm. Tỉ lệ cá chết 100% sau 48 giờ ở nghiệm thức tiêm 3,4x10⁷ và 72 giờ ở nghiệm thức tiêm 3,4x10⁶. Các nghiệm thức tiêm vi khuẩn với mật độ từ 3.4x10⁵, 3.4x10⁴ và 3.4x10³ CFU/ml cá bắt đầu chết sau 72 giờ cảm nhiễm. Sau 5 ngày, tỉ lệ cá chết ở các nghiệm thức này lần lượt là 73,3%, 66,7% và 46,7%. Cá ngừng chết từ ngày thứ sáu sau cảm nhiễm đến khi kết thúc thí nghiệm.

Từ kết quả thí nghiệm gây cảm nhiễm xác định được giá trị LD₅₀ của chủng vi khuẩn *E.ictaluri* DH 1.2T ở cá điều hồng (cỡ 7,5 - 10 g/con) là 4,7x10³ CFU/ml.

Các chủng *E.ictaluri* có khả năng gây bệnh với tỉ lệ chết 100% sau 3 ngày tiêm vi khuẩn với mật độ 3,4 x 10⁶ CFU/cá. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Soto *et al.* (2012) khi gây cảm nhiễm cá rô phi vằn với chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá bệnh đốm trắng trên nội quan (mật độ 10⁶ CFU/cá), cá thí nghiệm chết 100% sau 7 ngày cảm nhiễm.

Một số các nghiên cứu khác chứng minh *E.ictaluri* phân lập từ các loài cá khác với cá rô phi cũng có khả năng gây bệnh trên các loài cá rô phi. Plumb and Sanchez (1983) cảm nhiễm (bằng phương pháp tiêm) cá rô phi xanh *O. aureus* với vi khuẩn *E.ictaluri* phân lập từ cá nheo Mỹ (liều 10⁸ CFU/cá) cho kết quả gây chết 70%.

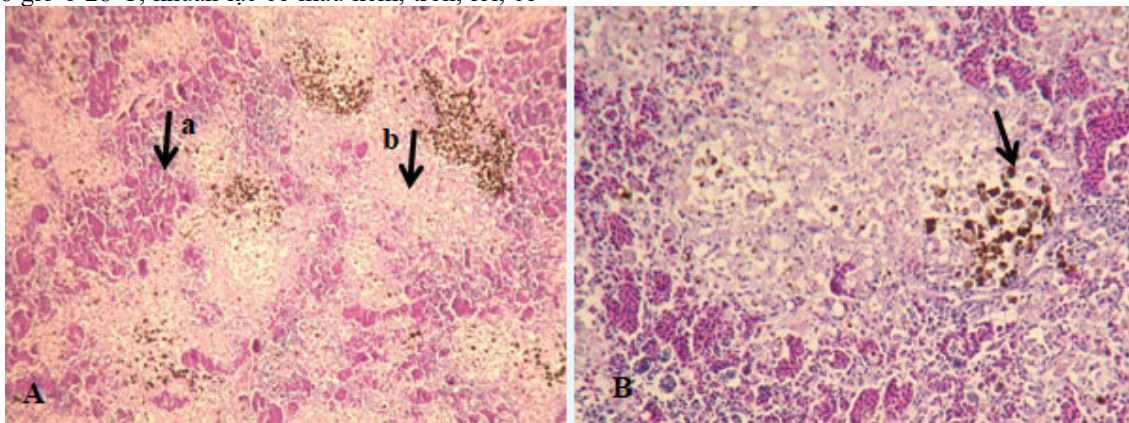
Phân tích mô bệnh học thận cá điều hồng cảm nhiễm với *E. ictaluri* ghi nhận được các biến đổi tương tự ở cá điều hồng bệnh trong bè nuôi như xuất huyết và xuất hiện nhiều vùng hoại tử tại vị trí các đốm trắng, đồng thời xuất hiện nhiều trung tâm đại thực bào sắc tố (Hình 8).



Hình 7: Tỉ lệ cá chết (%) tích lũy theo ngày 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 điều hồng bệnh thu từ bè nuôi. Vi khuẩn tái phân lập từ cá cảm nhiễm được xác định là *E. ictaluri* bằng phương pháp PCR.



Hình 8: Mô thận cá điều hồng cảm nhiễm với *E. ictaluri*. A. có hiện tượng xuất huyết nặng (a) và hoại tử (b) (H&E, 10). B. xuất hiện nhiều trung tâm đại thực bào sắc tố (mũi tên) (H&E 20X).

Như vậy, tác nhân gây bệnh đốm trắng trên nội quan ở cá điều hồng là vi khuẩn *E. ictaluri* giống như tác nhân gây bệnh đốm trắng trên nội quan ở cá tra nhưng khác với tác nhân gây bệnh đốm trắng trên nội quan cá lóc là vi khuẩn *Aeromonas schubertii* (Chen *et al.*, 2012; Liu and Li, 2012; Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trọng Nghĩa, 2016).

4 KẾT LUẬN

Vi khuẩn *E. ictaluri* là tác nhân gây bệnh đốm trắng trên nội quan ở những mẫu cá điều hồng thu được từ ao ương và từ bè nuôi thương phẩm. Giá trị

LD₅₀ của chủng *E. ictaluri* ở cá điều hồng (cỡ 7,5-10 g/con) khoảng $4,7 \times 10^3$ CFU/ml. Cá điều hồng bệnh đốm trắng trên nội quan có dấu hiệu bệnh lý bên ngoài không đặc trưng. Dấu hiệu bệnh lý bên trong là các đốm trắng ở thận và tỳ tạng. Biến đổi mô học đặc trưng là sự tạo thành các u hạt trong các nội quan.

LỜI CẢM ƠN

Các nội dung nghiên cứu trong bài báo này được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài “Nghiên cứu, đề xuất quy trình chẩn đoán, phòng và trị bệnh cá

Điều hồng (*Oreochromis* sp.) nuôi trong bè ở tỉnh Vĩnh Long” (Hợp đồng số: 02/HĐ-2017 do Sở Khoa học và Công nghệ Tỉnh Vĩnh Long cấp kinh phí.

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., Dickson, C., Cnockaert, M., Swings, J., Phuong, N. T. và Teale, A., 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.
- Colquhoun, D.J., and Duodu, S., 2011. Francisella infections in farmed and wild aquatic organisms. *Veterinary research*. 42:47.
- Coolidge and Howard, R.M., 1979. Animal Histology Procedures, 2nd edition). National Institutes of Health. Bethesda.
- Chen, Y.F., Liang, R.S., Zhuo, X.L., Wu, X.T., and Zou, J.X., 2012. Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculata* (Lacepède). *Journal of Fish Diseases*. 35 (6): 421-430.
- Crumlish, M., Dung, T.T., Turnbull, J.F., Ngọc, 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: 733-736.
- 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, Viet Nam. *Journal of Fish Diseases*. 24: 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: 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.
- Liu, J.Y., and Li, A.H., 2012. First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor). *China Journal of Fish Diseases*. 35 (5): 335-342.
- Nguyễn Quốc Thịnh, Dung, T.T., Ferguson, H.W., 2004. Nghiên cứu mô bệnh học cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bệnh trắng gan. *Tạp chí khoa học. Đại Học Cần Thơ. Số đặc biệt (chuyên ngành thủy sản)*: 120-125.
- 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.
- 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.
- Plumb, J. A., and Sanchez, D. J., 1983. Susceptibility of five species of fish to *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Fish Diseases*. 6: 261-266.
- Reed, L.J., and Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*. 27(3): 493-497.
- 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
- Lawrence, M.L., Cooper, R.K., and Thune, R.L., 1997. Attenuation, persistence and vaccine potential of an *Edwardsiella ictaluri* purA Mutant. *Infection and Immunity*. 65(11): 4642-4652.
- 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.
- Shah, K., Pritt, K., B. S. and Alexander, M. P., 2017. Histopathologic review of granulomatous inflammation. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*. 7: 1-12.
- 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. Đại Học Cần Thơ. Số đặc biệt (chuyên ngành thủy sản)*: 137-142.
- Wang, X., Jin, s., and Yuan, s., 2007. Nocardiosis in snakehead, *Ophiocephalus argus* cantor. *Aquaculture*. 271(1-4):54-60.